

**ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DAS PROPRIEDADES
FÍSICO-QUÍMICAS DO ORGANO-GEL ATRAVÉS DE REAÇÕES
CATALISADAS PELA CV LIPASE**

LUCIA MARIA ZANATTA DE AGUIAR

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

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

Bruno Spoganicz
Prof. Dr. Bruno Spoganicz
(coordenador)

banca examinadora:

Faruk Nome
Prof. Dr. Faruk Nome

Alfredo Tiburcio Nunes Pires
Prof. Dr. Alfredo Tiburcio Nunes Pires

Aos meus pais, Ernesta e José;

**Ao meu eterno companheiro,
Marcos Wilson;**

com amor.

AGRADECIMENTOS

**Agradeço a todos aqueles
que direta ou indiretamente contribuíram
para a execução deste trabalho e, em especial,
à Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento,
ao Prof. Dr. Alfredo Tiburcio Nunes Pires,
ao Prof. Dr. Faruk Nome e
ao Prof. Dr. Cesar Zucco.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

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

***ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DAS PROPRIEDADES
FÍSICO-QUÍMICAS DO ORGANO-GEL ATRAVÉS
DE REAÇÕES CATALISADAS
PELA CV LIPASE***

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

LUCIA MARIA ZANATTA DE AGUIAR

**FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA - BRASIL
SETEMBRO DE 1992**

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho é estudar a utilização da enzima CV lipase em síntese orgânica, através da sua imobilização em sistema de organo-gel de ciclohexano.

Inicialmente, fez-se um levantamento bibliográfico detalhado sobre a utilização de enzimas em reações em solvente orgânico. Os principais trabalhos de pesquisadores desta área foram discutidos, no que tange às suas idéias, hipóteses, experimentos e teorias que se tornaram as bases deste campo de conhecimento.

O foco principal do estudo é a caracterização do sistema de organo-gel, no que concerne às suas propriedades físico-químicas, bem como a sua posterior utilização na imobilização da enzima CV lipase para a síntese de ésteres alquílicos, tioésteres alquílicos e arílicos, e amidas.

Nas reações de síntese de ésteres alquílicos, parâmetros como o número de carbonos, ramificações e insaturações na cadeia dos ácidos foram associados com a eficiência catalítica da enzima CV lipase. O efeito do solvente foi também estudado, com relação à eficiência da reação de esterificação do ácido oléico com o álcool 1-pentanol, visando estabelecer uma correlação entre a polaridade do solvente e a otimização do meio reacional. As reações de síntese de tioésteres e amidas foram executadas para se verificar a atividade da enzima CV lipase frente a substratos contendo os grupamentos SH e NH₂ nas reações com ácido oléico.

Os resultados destas sínteses foram comparados entre si e com dados da literatura para se estabelecer a eficiência da enzima CV lipase em relação a outras enzimas, e também a eficiência deste sistema frente a outras metodologias já descritas na literatura para a síntese enzimática em solvente orgânico.

ABSTRACT

This work studies the utilization of the CV lipase enzyme in organic synthesis, immobilized in a microemulsion-based organo-gel of cyclohexane.

Initially, a detailed literature review on the application of enzymes in organic synthesis is presented. The main works that investigated this area are discussed with respect to their ideas, hypotheses, experiments and theories which made up the basis of this field of knowledge.

The main research focus is the characterization of the microemulsion-based organo-gel as regards its physicochemical properties along with its subsequent use in the CV lipase immobilization. The resulting medium is, thus, used for executing syntheses of esters, thioesters and amides.

In the ester syntheses, parameters such as numbers of carbons, branches and insaturation of acid chains were associated with the catalytical efficiency of the CV lipase. The solvent effect was also studied concerning its relation to the efficiency of esterification reactions, aiming to identify the relation between the solvent polarity and the reactional medium optimization. Syntheses of amide and thioester were used for verifying the CV lipase activity concerning the substrates which contain SH and NH₂ functional groups.

The results of those syntheses were compared with each other and with data obtained from the literature, in order to analyse the efficiency of the CV lipase compared to other enzymes, and the efficiency of the microemulsion-based organo-gel compared to the remaining methodologies prescribed for enzymatic synthesis in organic solvents.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ENZIMAS.....	1
1.2. ENZIMA EM SOLVENTE ORGÂNICO.....	2
1.2.1. Sistema Bifásico.....	2
1.2.2. Enzimas Fisicamente Imobilizadas ou Quimicamente Modificadas.....	3
1.2.3. Enzimas em Suspensão.....	4
1.2.4. Enzimas em Micelas Reversas.....	6
1.2.5. Enzimas em Organo-gel.....	16
1.3. LIPASE.....	23
1.3.1. Estrutura Tridimensional e Sítio Ativo.....	23
1.3.2. Mecanismo de Ação.....	26
1.3.3. Utilização em Síntese Orgânica.....	28
1.4. PLANO DE PESQUISA.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31

2.1. COMPONENTES DO ORGANO-GEL.....	31
2.2. REAGENTES E SOLVENTES.....	31
2.3. PREPARAÇÃO DO ORGANO-GEL.....	32
2.3.1. Procedimento Geral.....	32
2.3.2. Composição dos Diversos Organo-Géis.....	34
2.4. DIAGRAMA DE FASES DO ORGANO-GEL EM CICLO- HEXANO.....	35
2.5. ESTABILIDADE TÉRMICA DO ORGANO-GEL.....	35
2.6. MEDIDAS DE pH DO ORGANO-GEL.....	35
2.7. REAÇÕES.....	36
2.7.1. Preparação do Meio Reacional.....	36
2.7.2. Teste de Estabilidade do Organo-gel Frente a Substratos e Solventes.....	36
2.7.3. Purificação dos Produtos.....	38
2.7.4. Identificação dos Produtos.....	38
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	39
3.1. DIAGRAMA DE FASES DO ORGANO-GEL DE CICLO-HEXANO.....	39

3.1.1. Regiões de Separação de Fase.....	41
3.1.2. Região da Solução Micelar Líquida.....	42
3.1.3. Regiões de Formação do Organo-gel.....	42
3.1.4. Análise Comparativa.....	44
3.2. ESTABILIDADE TÉRMICA DO ORGANO-GEL.....	48
3.3. MEDIDAS DE pH DO ORGANO-GEL.....	49
3.4. ESTABILIDADE DO ORGANO-GEL FRENTE A SUBSTRATOS E SOLVENTES.....	51
3.5. TESTE DE EFICIÊNCIA DA CV LIPASE.....	55
3.6. RETENÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO NO ORGANO-GEL.....	57
3.7. REAÇÕES.....	58
3.7.1. Síntese de Ésteres a partir de Diversos Ácidos.....	59
3.7.2. Síntese de Tioésteres a partir de Diversos Tióis.....	65
3.7.3. Síntese de Amidas através da Acilação Enzimática de Aminas.....	70
3.8. EFEITO DO SOLVENTE NA EFICIÊNCIA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELA CV LIPASE EM SISTEMA DE ORGANO-GEL.....	71

3.9. RESUMO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	73
4. CONCLUSÃO.....	77
4.1. CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA DE ORGANO-GEL.....	77
4.2. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA CV LIPASE E UTILIZAÇÃO EM REAÇÕES	78
4.3. OTIMIZAÇÃO DO MEIO REACIONAL CONTENDO ORGANO-GEL	79
4.4. ANÁLISE COMPARATIVA DOS SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA UTILIZAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA.....	81
5. BIBLIOGRAFIA.....	83

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Estrutura da micela reversa de AOT [36].....	7
1.2. Diagrama de fase de uma solução de água/óleo/surfactante [37].....	8
1.3. Estrutura do surfactante AOT (Di-2-etihexil sulfosuccinato de sódio).....	9
1.4. Efeito da quantidade de água e surfactante em sistema de micela reversa [41].....	10
1.5. Dependência da concentração máxima de proteína com o grau de hidratação do surfactante [41].....	11
1.6. Representação da interação de moléculas de substrato distribuídos num sistemas de micelas reversas com enzimas hidrofílicas, enzima interfacial e enzimas hidrofóbicas [41].....	12
1.7. Modelo de solubilização de moléculas protéicas em micelas reversas [41].....	13
1.8. Esquema da expulsão da água da cavidade da micela reversa de AOT (modelo do tamanho fixo) [41].....	14
1.9. Esquema da eliminação da flutuação espontânea da estrutura protéica dentro de uma micela reversa [41].....	15
1.10. Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (modelo da percolação) [50].....	18

1.11. Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (modelo de rede de gelatina) [58].....	20
1.12. Modelos propostos para a estrutura do organo-gel [61].....	21
1.13. Estrutura da lipase do <i>Mucor miehei</i> [63].....	24
1.14. Estrutura do sítio ativo da lipase do <i>Mucor miehei</i> na presença do N-hexilclorofosfonato de etila [64].....	25
1.15. Estrutura atômica da molécula da lipase nativa e do complexo enzima-substrato [64].....	26
1.16. Representação esquemática do complexo tetraédrico enzima-substrato da lipase <i>Mucor miehei</i> (adaptada de [64]).....	26
1.17. Mecanismo da formação do intermediário acil-enzima (adaptado de [9]).....	27
2.1. Preparo do organo-gel e do meio reacional.....	33
2.2. Execução da reação, purificação e identificação do produto.....	37
3.1. Diagrama de fases do organo-gel de ciclo-hexano.....	40
3.2. Diagrama de fases do sistema de organo-gel em iso-octano [49].....	44
3.3. Comparação entre ácidos lineares como substratos para reações de esterificação e hidrólise catalisada pela CV lipase.....	60
3.4. Comparação entre ácidos lineares como substratos para reações de esterificação catalisada por três tipos de lipases.....	63

3.5. Relação do rendimento da reação de esterificação entre o ácido oléico e o 1-pentanol com log P (coeficiente de partição) dos solventes utilizados.....	74
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

3.1. Estabilidade térmica do organo-gel.....	48
3.2. Medidas de pH do organo-gel a 25°C.....	49
3.3. Teste de susceptibilidade do organo-gel frente a diversas substâncias químicas.....	52
3.4. Teste de eficiência da CV lipase em organo-gel.....	56
3.5. Retenção do produto da reação no organo-gel.....	58
3.6. Síntese de éster catalisada pela CV lipase com diferentes ácidos e 1-pentanol.....	59
3.7. Correlação entre log P dos diversos componentes do sistema reacional, utilizado para a síntese de ésteres, a partir do 1-pentanol e de diversos ácidos de cadeia normal.....	62
3.8. Síntese de tioésteres catalisada pela CV lipase com diferentes tiois e ácido olêico.....	66
3.9. Correlação entre log P dos diversos componentes do sistema reacional, utilizado para a síntese de tioésteres, a partir do ácido olêico e de diversos tiois de cadeia normal.....	68
3.10. Comparação entre a utilização do ciclo-hexano e do hexano como solvente na síntese de tioésteres	68

3.11. Correlação entre log P dos diversos componentes do sistema reacional, utilizado para a síntese de tioésteres, a partir do 2-butanotiol e ácido oléico.....	69
3.12. Síntese de amidas catalisada por CV lipase com diversas aminas e ácido oléico.....	70
3.13. Efeito do solvente na reação de esterificação do ácido oléico com o álcool 1-pentanol.....	72
3.14. Indicadores de medidas da polaridade dos solventes.....	73

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O objetivo deste Capítulo é relatar a história da utilização de enzimas em síntese orgânica, dando ênfase a reações executadas em solventes apolares. O Capítulo apresentará, em ordem cronológica, os trabalhos dos pesquisadores desta área, suas idéias e hipóteses, técnicas e experimentos e, conseqüentemente, suas conclusões, em forma de teorias que se tornaram as bases deste campo da Química Orgânica.

Serão descritas, as técnicas de utilização de enzimas em síntese orgânica, a saber: enzimas em sistemas bifásicos, enzimas fisicamente imobilizadas, enzimas quimicamente modificadas, enzimas em suspensão, enzimas em micelas reversas e, finalmente, enzimas em organo-gel.

A evolução das técnicas caracteriza a busca de metodologias cada vez mais aperfeiçoadas de utilização das enzimas em síntese orgânica. Assim, com o passar do tempo, as falhas ou desvantagens das técnicas já existentes foram sendo eliminadas com alterações no procedimento de execução das mesmas ou através da sua substituição por técnicas mais avançadas.

Este capítulo, neste contexto, introduz os conhecimentos necessários para o entendimento dos demais capítulos que irão abordar a utilização da enzima *Chromobacterium viscosum* lipase (CV lipase), imobilizada em sistema de organo-gel, na execução de sínteses de ésteres, tioésteres e amidas, dando ênfase aos aspectos gerais do sistema de organo-gel e aos efeitos dos solventes nas reações executadas.

1.1. ENZIMAS

As enzimas sempre constituíram um grupo de proteínas muito especial desde a sua descoberta na natureza, tendo sido utilizadas em vários campos de conhecimento científico. Sua utilização em reações de síntese é particularmente vantajosa devido à sua alta eficiência catalítica e à sua capacidade de reagir em condições muito suaves de temperatura e pH. Porém, a maior vantagem das enzimas reside na sua alta, muitas vezes absoluta, estereo e regioespecificidade [1].

As enzimas são comumente utilizadas em reações em meio aquoso, devido à sua

alta solubilidade e atividade nesse meio, e por este ser o meio no qual as enzimas são encontradas na natureza (atividade biológica).

O interesse na utilização de enzimas em meio não aquoso é devido às diversas vantagens que este meio proporciona. Algumas dessas vantagens foram apresentadas por Zaks e Klibanov [2], sendo listadas a seguir:

- alta solubilidade da maioria dos compostos orgânicos em solventes não aquosos;
- alta estabilidade das enzimas em solventes orgânicos;
- possibilidade de executar reações inviáveis em água, devido a restrições cinéticas e termodinâmicas;
- relativa facilidade de isolamento dos produtos do meio orgânico, em comparação com a água;
- insolubilidade das enzimas em solvente orgânico, facilitando o seu isolamento do meio e reutilização, eliminando assim a necessidade de imobilização;
- prevenção de reações colaterais, como a hidrólise causada pela água.

1.2. ENZIMA EM SOLVENTE ORGÂNICO

Os principais sistemas para utilização de enzimas em solvente orgânico são: sistema bifásico, enzimas fisicamente imobilizadas ou quimicamente modificadas, enzimas em suspensão, enzimas em micelas reversas e enzimas em organo-gel.

1.2.1. Sistema Bifásico

O primeiro trabalho utilizando enzimas em solvente orgânico foi desenvolvido por Reese e Mandels em 1958 [3]. O trabalho consistiu num sistema bifásico contendo água e solvente orgânico imiscível em água, utilizado para sínteses em média escala preparativa. O sistema era composto de uma coluna na qual a fase estacionária consistia em uma solução aquosa de enzima adsorvida em celulose e a fase móvel consistia em um solvente orgânico com os substratos e produtos nele dissolvidos.

Em 1977, Klibanov [4] utilizou enzimas em sistema bifásico composto por água

e solvente orgânico imiscível em água. Neste sistema, a enzima é dissolvida na fase aquosa, o que a protege de uma possível desnaturação causada pelo solvente orgânico do sistema. Os substratos ficam dissolvidos no solvente orgânico que, por agitação, são transferidos para a fase aquosa, onde são catalisados pela enzima. Os produtos formados retornam para a fase orgânica. O equilíbrio químico da reação neste sistema bifásico é controlado por diferentes coeficientes de partição dos substratos e produtos.

Uma revisão razoavelmente completa dos diversos trabalhos que utilizaram este sistema é apresentada por Carrea [5] e Seminov [1].

As principais vantagens do sistema bifásico são [5]:

- reações de substratos insolúveis em água podem ser feitas em um volume substancialmente reduzido da mistura reagente;
- o produto pode ser facilmente separado do biocatalisador;
- a inibição enzimática causada por substratos ou produtos é minimizada, devido à baixa concentração dos mesmos na fase aquosa, lugar onde se situa a enzima;
- reações termodinamicamente desfavoráveis em meio aquoso tornam-se viáveis. Por exemplo, enzimas hidrolíticas podem ser utilizadas em reações de esterificação, transesterificação e síntese de peptídeos.

As desvantagens deste sistema são:

- desativação ou inibição da enzima pelo solvente (que pode ser minimizada pela escolha adequada do solvente [5]);
- necessidade do sistema ficar sob agitação permanente para acelerar a reação [1];
- alta concentração de enzima no sistema, variando de 5 a 20 mg/ml [6];
- perda da atividade enzimática cada vez que o sistema é utilizado para síntese em repetidas reações (Kirchner [6] observou uma perda de cerca de 10% em cada reação efetuada).

1.2.2. Enzimas Fisicamente Imobilizadas ou Quimicamente Modificadas

Em 1976, Blain e colaboradores [7] usaram micélio liofilizado de fungo em suspensão em solvente orgânico. O sistema foi descrito [8] como tendo a enzima

convenientemente imobilizada numa fase sólida (micélio). Em decorrência, o sistema é de fácil preparação, eliminando ainda a necessidade de purificação e imobilização da enzima. Gancet, utilizando o mesmo sistema [9], concluiu que a célula morta do micélio constitui uma forma de enzima imobilizada muito ativa em solvente orgânico.

Em 1983, Inada e colaboradores [10] promoveram a modificação química da enzima com polietileno glicol, um composto com propriedades anfífilas. A natureza hidrofílica do polietileno glicol possibilita solubilizar enzimas em soluções aquosas. Sua natureza hidrofóbica torna a enzima modificada capaz de atuar em ambientes hidrofóbicos [11]. A enzima assim modificada tem 80% da atividade da enzima não modificada, sendo ativa em vários solventes orgânicos.

Em 1985, Marlot [12] fez reações com enzimas em solvente orgânico, utilizando uma técnica de imobilização de enzima em suportes sólidos hidrofílicos, tais como: spherosil XOB015 e XOB075, poulenc, celite, vidro poroso, alumina e titânia. Outros autores utilizaram a técnica de imobilização física utilizando os seguintes suportes: sílica gel [13] [14], vidro poroso [15], agarose [16], nylon [17], hyflo super cell [18].

Suckling [19] analisou os dois métodos acima e suas conclusões foram as seguintes: as técnicas de imobilização física impõem uma barreira para os substratos encontrarem o sítio ativo da enzima; as técnicas de modificação química além de modificarem o ambiente da molécula da enzima também restringem o acesso do substrato ao sítio ativo.

A estabilidade das enzimas fisicamente imobilizadas é maior que as quimicamente modificadas. As técnicas de imobilização não aumentam a estabilidade térmica das enzimas, mas podem aumentar a faixa de pH ótimo ou mudá-lo para outro valor de pH.

Quanto mais solúvel for o suporte da enzima no meio reagente, mais reativa será a preparação. Em contrapartida, um suporte insolúvel tem a conveniência de ser mais prático na recuperação da enzima para reutilização.

1.2.3. Enzimas em Suspensão

Em 1986, Klibanov [20] propôs a utilização de enzimas em seu estado sólido para reações em meio orgânico. A este sistema foi dada a denominação de "reações

enzimáticas em suspensão em solventes orgânicos”. Neste mesmo ano, o autor publicou uma revisão dos primeiros trabalhos realizados pelo seu grupo de pesquisa, utilizando a esta metodologia [21].

Desde então, muitos outros pesquisadores vêm utilizando enzimas em suspensão para os mais diversos tipos de reação de síntese em solvente orgânico [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31].

Quando uma enzima em pó é adicionada em um solvente orgânico, ela apresenta uma atividade catalítica aceitável, especialmente se as seguintes condições forem atendidas [32]:

- solventes hidrofóbicos são preferidos aos hidrofílicos, embora algumas enzimas permaneçam cataliticamente ativas mesmo em solventes orgânicos hidrofílicos;
- algumas enzimas requerem a adição de água ao solvente orgânico seco;
- as enzimas em pó são preparadas (liofilizadas) a partir de soluções aquosas a um pH ótimo para a atividade enzimática;
- como as enzimas são quase todas insolúveis em solventes orgânicos, as partículas da enzima devem ser suficientemente pequenas e sua suspensão deve ser continuamente agitada para minimizar limitações difusionais.

As vantagens deste sistema quando comparado com o sistema bifásico são as seguintes [21]:

- simplicidade metodológica: a enzima e os substratos são adicionados ao solvente orgânico;
- possibilidade de aumento na estabilidade da enzima;
- possibilidade de mudança na especificidade do substrato;
- facilidade de isolamento da enzima no meio reagente (por filtração) e sua subsequente reutilização [2].

As desvantagens deste sistema são as seguintes:

- inibição da atividade enzimática pelo solvente (cada enzima possui uma sensibilidade diferente para cada solvente);
- necessidade de agitação da suspensão para a obtenção de melhores resultados;

- alta concentração enzimática relativa, variando de 2 mg/ml a 50 mg/ml [24] [29] [31];
- perda em massa da enzima cada vez que a mesma é filtrada do meio reacional para a sua subsequente reutilização.

1.2.4. Enzimas em Micelas Reversas

O primeiro trabalho mostrando a possibilidade de solubilizar enzimas em micelas reversas foi publicado em 1977 por Martinek [33]. Neste método, a enzima fica dissolvida na porção aquosa do centro da micela reversa, onde ela retém suas propriedades catalíticas originais e fica protegida da ação do solvente orgânico, que permanece do lado de fora da micela. Além disso, todas as características das sínteses em solventes orgânicos hidrofóbicos também são mantidas, a saber: efeitos da solvatação, solubilidade dos componentes e efeitos termodinâmicos [34].

Nos 15 anos que se seguiram a este primeiro trabalho, o campo de enzimas imobilizadas em micelas reversas foi extensivamente pesquisado, sendo que várias revisões bibliográficas estão disponíveis na literatura [34] [35] [36]. A descrição a seguir procura elucidar alguns aspectos associados a micelas reversas e à sua utilização na imobilização enzimática.

A estrutura da micela reversa é descrita [34] como uma associação de moléculas do surfactante em um solvente apolar. A parte interna da micela reversa é formada pela parte polar do surfactante e é capaz de solubilizar substâncias polares como a água. A parte exterior da micela reversa é formada pela parte hidrofóbica do surfactante (cadeia hidrocarbônica) que fica em contato com o solvente ao seu redor (Figura 1.1).

A formação da micela reversa é dependente da concentração dos seus três componentes, água, óleo (solvente orgânico) e surfactante de um sistema de microemulsão. Na realidade, a micela reversa é uma das muitas possibilidades que um sistema de microemulsão pode assumir [37] - Figura 1.2.

Uma das características mais apreciáveis nas micelas reversas é que o interior da sua cavidade central é um micro-meio aquoso com propriedades físico-químicas muito diferentes dos sistemas aquosos comuns. Esta é uma das razões pelas quais a micela

reversa é tão eficiente em acelerar a velocidade de reações [38]. Esta aceleração pode ser explicada pelo fato dos reagentes tornarem-se concentrados, devido: ao seu confinamento na micela; à ação catalítica dos grupos polares das moléculas do surfactante; à fixação rígida e/ou orientação das moléculas do reagente no interior da cavidade da micela.

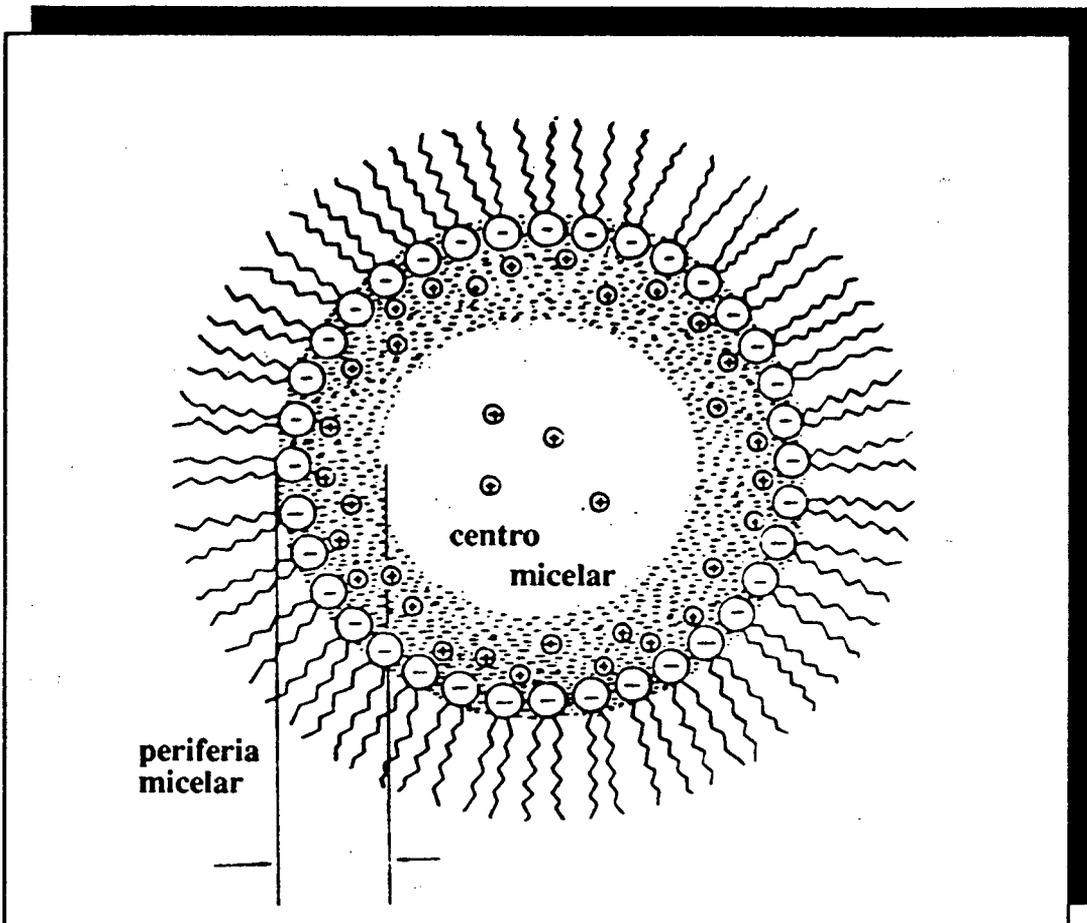


FIGURA 1.1 - Estrutura da micela reversa de AOT [36]

Além disso, dentro da cavidade da micela reversa existem diferenças de propriedades físico-químicas de um ponto para outro, com diferentes polaridades e viscosidades. Essas diferenças são explicadas pela presença de camadas de água de hidratação ligadas em diferentes níveis [34].

O trabalho mais recente nesta área [39] mostra que existem três tipos diferentes

de água dentro da micela reversa. O primeiro tipo é a água “ligada”, que compõe a camada de hidratação primária e secundária do surfactante. O segundo tipo é a água “livre”, que fica preenchendo o restante da cavidade da micela reversa. O terceiro tipo é a água “bloqueada” na interfase.

O pH da água da cavidade da micela reversa é diferente do pH da água de origem (água que foi utilizada para se fazer a solução micelar), devido à alta concentração de cargas elétricas provenientes da ionização dos grupos polares das moléculas do surfactante [34].

A atividade nucleofílica da água solubilizada por uma micela reversa de Aerosol OT (Di-2-etilhexil sulfosuccinato de sódio - AOT) é pelo menos 10^3 a 10^6 vezes mais alta do que na água comum [40] [41].

Um dos surfactantes mais utilizados para se obter micelas reversas é o AOT - Figura 1.3.

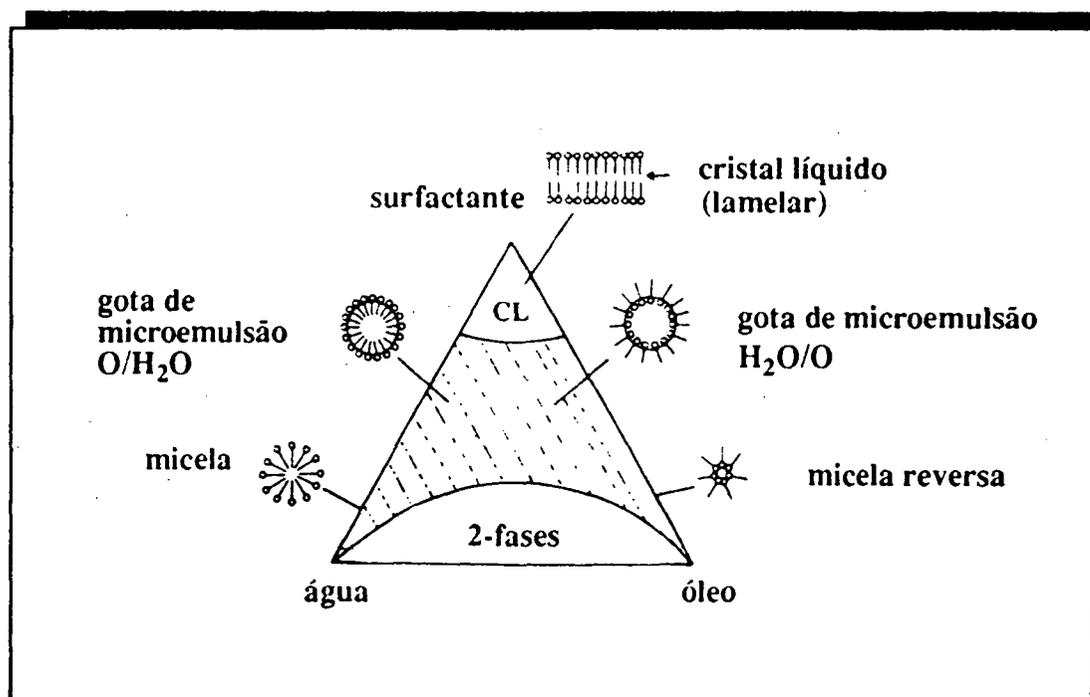


FIGURA 1.2 - Diagrama de fase de uma solução de água/óleo/surfactante (a região sombreada denota a microemulsão) [37]

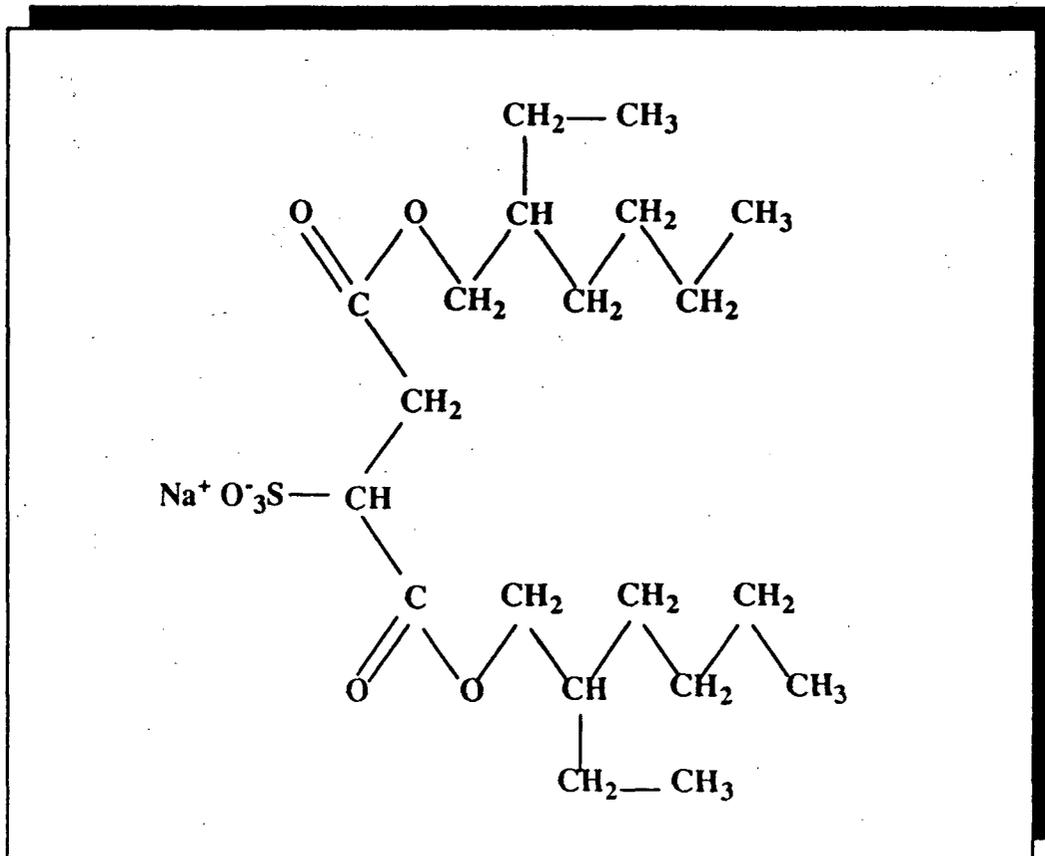


FIGURA 1.3 - Estrutura do surfactante AOT (Di-2-etihexil sulfosuccinato de sódio)

Suas principais características são [42]:

- 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 curvaturas [35];
- uma molécula de AOT é hidratada por 12 moléculas de água (água ligada) [39].

Um dos parâmetros dos sistemas de microemulsão é o W_0 , que é a razão molar

entre $[H_2O]$ e $[\text{surfactante}]$). Se o W_0 for mantido constante, o raio da micela também permanecerá constante, independentemente dos demais parâmetros do sistema. O aumento das quantidades de água e surfactantes, de forma a manter W_0 constante, implica no aumento do número de micelas.

Quando a quantidade de água aumenta em relação à quantidade de surfactante, levando a um aumento de W_0 , o tamanho da micela aumenta. A título de ilustração, quando W_0 aumenta de 0 a 50, há um aumento no raio da micela de 17 para 120 Å [34].

Com o aumento da quantidade de água no centro da micela, as diferenças em propriedades físico-químicas entre a água micelar e a água comum ficam menos pronunciadas [41] - Figura 1.4.

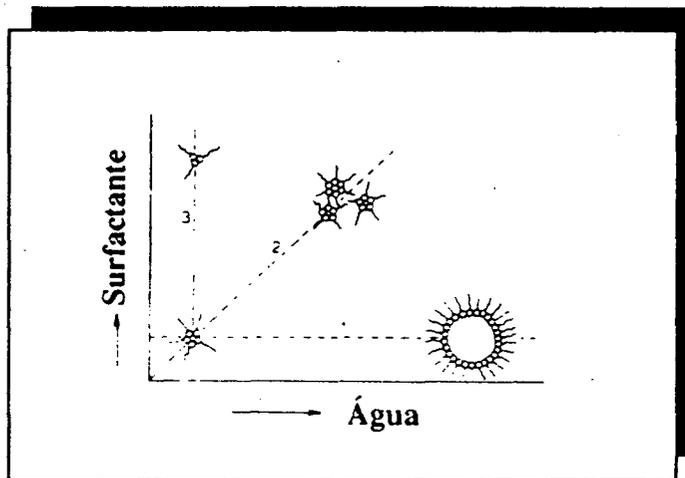


FIGURA 1.4 - Efeito da quantidade de água e surfactante em sistema de micela reversa [41]: (1) $[\text{surfactante}]$ é constante, $[H_2O]$ aumenta: dimensão micelar aumenta; (2) $[[\text{surfactante}]$ e $[H_2O]$ aumentam em igual proporção: dimensão micelar é constante, mas o número de micelas aumenta; (3) $[\text{surfactante}]$ aumenta, $[H_2O]$ é constante: dimensão micelar diminui e o número de micelas aumenta.

A solubilização de proteína em micela reversa ocorre espontaneamente [41]. A simples adição da enzima liofilizada ou a injeção de uma solução de proteína dentro de um sistema contendo surfactante, solvente orgânico e água é suficiente para que solubilização se complete. A agitação do sistema ajuda a estabelecer o equilíbrio mais rapidamente.

Neste contexto, alguns fatos devem ser observados. Quando W_0 é muito baixo (menor que 2), as proteínas são pouco solúveis em micelas reversas. A solubilização

começa a partir de um certo valor de W_0 , além do qual o aumento da hidratação do surfactante é acompanhado por um aumento linear de solubilidade da proteína, até alcançar uma concentração comparável à obtida em água pura. Após um certo valor de W_0 a quantidade proteica solubilizada permanece constante, o que indica a existência de um limite de solubilidade do sistema, que é determinado por uma quantidade mínima de surfactante necessária para solubilizar a molécula da proteína [43] - Figura 1.5.

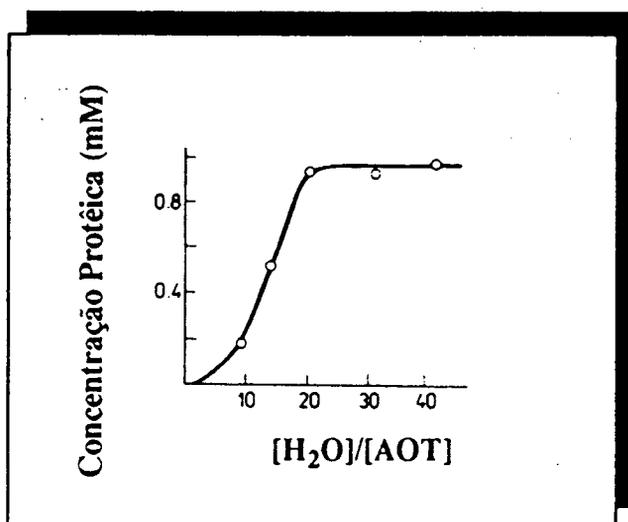


FIGURA 1.5 - Dependência da concentração máxima de proteína com o grau de hidratação do surfactante (quimiotripsina solubilizada num sistema AOT 0,1 M em octano) [41]

Segundo Martinek [41], a localização da enzima dentro da micela depende da sua natureza. Assim, a enzima hidrofílica localiza-se no centro da micela e rodeada por uma camada de água e outra de surfactante que protege a enzima contra a inativação pelo solvente orgânico. Uma enzima interfacial interage com a camada interfacial da micela, e uma enzima hidrofóbica fica, em princípio, em contato com o solvente orgânico (Figura 1.6).

Alguns modelos foram sugeridos para descrever a estrutura organizacional de uma micela contendo enzima, por exemplo, uma enzima hidrofílica.

Luisi [36] sugeriu que a incorporação da molécula da proteína é invariavelmente acompanhada por um aumento no tamanho da micela, e 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 de camada de água).



FIGURA 1.6 - Representação da interação de moléculas de substrato (S) distribuídos num sistemas de micelas reversas com enzimas hidrofílicas (E1), enzima interfacial (E2) e enzimas hidrofóbicas (E3) [41]

Martinek [44] sugeriu que o aumento em tamanho só ocorre quando a cavidade da micela vazia é menor que a molécula da proteína. Nesse caso, há um aumento no número de agregação, bem como no grau de hidratação do surfactante (modelo do tamanho induzido). Por outro lado, se o interior da micela for aproximadamente igual ao tamanho da molécula da proteína, nenhuma mudança substancial deveria ocorrer no tamanho da micela (modelo do tamanho fixo) - Figura 1.7.

O modelo do tamanho fixo apresenta um aspecto que foi muito discutido quando da sua apresentação, que é o desaparecimento da água que estava no interior da micela vazia, que tem o seu lugar tomado pela molécula de proteína. Martinek [41] [45] usou métodos físicos (Espalhamento de Neutrons, Espectroscopia e ^{13}C - NMR) para elucidar o rearranjo estrutural que ocorre na micela com a inserção de proteína. O resultado obtido foi o seguinte: com o intuito de se manter íntegras todas as dimensões da micela, a camada de água deve ser expelida do centro da micela, penetrando na camada do surfactante. O centro da micela, por sua vez, fica quase que totalmente ocupado pela proteína (Figura 1.8).

O trabalho mais recente nesta área [46] faz uma revisão de todos os modelos

propostos e expõe as suas ambigüidades. Além disso, ele desenvolve um modelo termodinâmico para prever os tamanhos das micelas com ou sem proteína, com base nos seguintes parâmetros: força iônica, tamanho e carga protéica, concentração protéica e conteúdo de água na fase micelar. O modelo foi testado e validado através de um experimento que utilizou Espalhamento de Neutrons (SANS) na monitoração do tamanho das micelas.

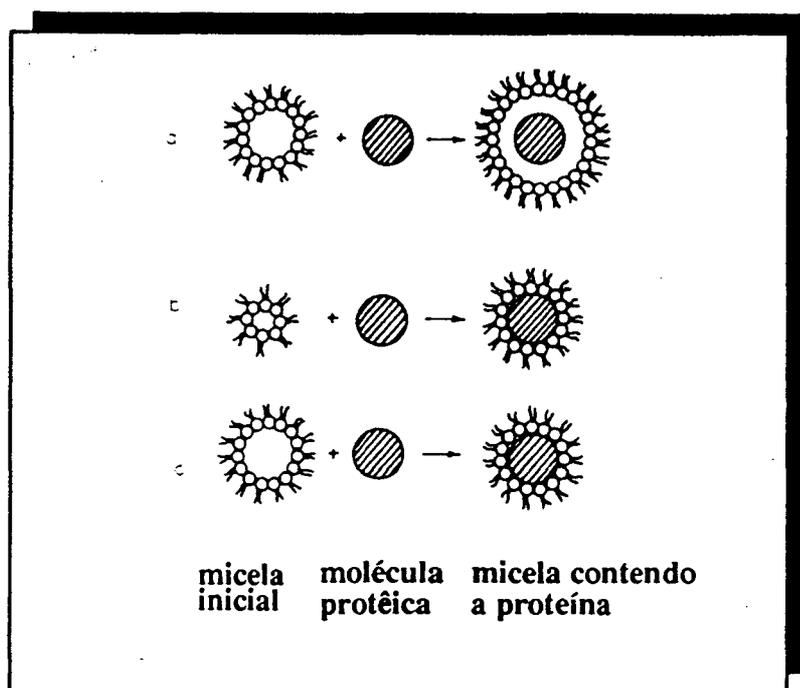


FIGURA 1.7 - Modelo de solubilização de moléculas protéicas em micelas reversas [41]: (a) Modelo da camada de água; (b) Modelo do tamanho induzido; (c) Modelo do tamanho fixo.

Os resultados mostraram que o tamanho das micelas contendo proteína pode ser menor ou maior que o das micelas sem proteína, e que 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 e entre as cargas das proteínas e das micelas como a maior força eletrostática atuante responsável pela solubilização protéica nesse sistema de microemulsão carregado. A presença de um corpo de baixa constante dielétrica (a proteína) dentro da micela abaixa a energia eletrostática livre o suficiente para que até

uma proteína carregada (condição desfavorável) possa ser dissolvida.

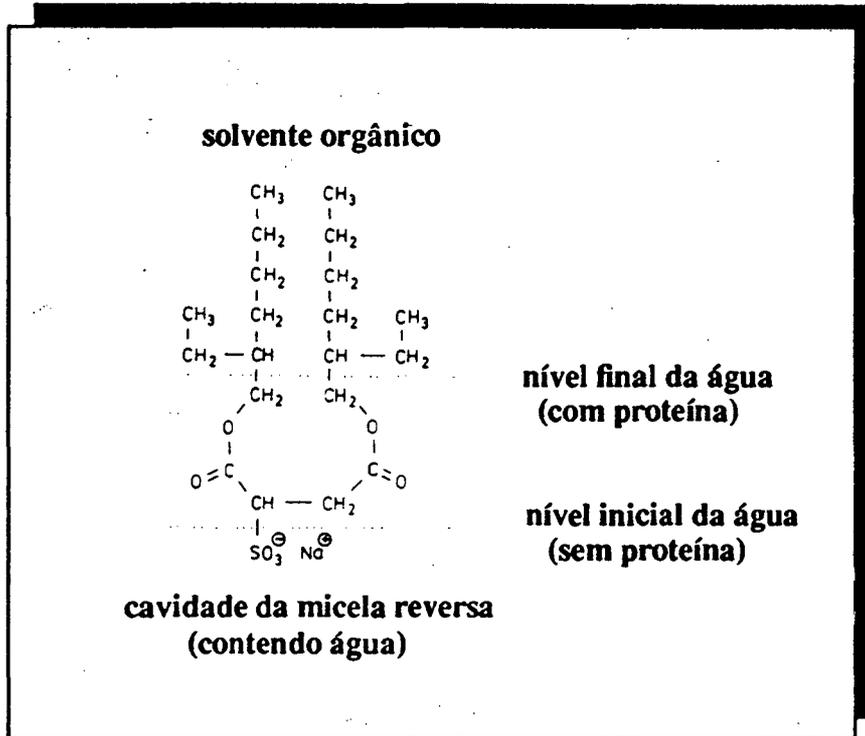


FIGURA 1.8 - Esquema da expulsão da água da cavidade da micela reversa de AOT (Modelo do tamanho fixo) [41]

Apesar das discussões sobre como a proteína afeta o sistema de microemulsão (e.g., afetando o tamanho da micela reversa), outra observação muito importante é que os sistemas com micelas reversas afetam muito a atividade das enzimas neles dissolvidas. A atividade enzimática em micelas reversas é muito maior que a atividade em meio aquoso.

Martinek [41] propôs uma hipótese para explicar a superatividade das enzimas em micelas reversas. Segundo Martinek, a superatividade é devido à alta rigidez da camada de surfactante que envolve a enzima. Esta camada absorveria a excessiva flutuação na organização da molécula da enzima, flutuação esta que é responsável pela destruição da conformação catalítica da enzima em água (Figura 1.9). Esta hipótese se baseia no fato de que a atividade da enzima é dependente do W_0 . Cada enzima tem um W_0 ótimo e, nessas condições, o diâmetro da micela vazia é praticamente do tamanho da molécula da enzima.

Os trabalhos mais recentes [47] sobre superatividade das enzimas em micelas reversas mostram que o aumento da atividade é causado pelos seguintes fatores:

- o aumento da concentração de substratos nas imediações 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.

Assim, quando W_0 aumenta muito a atividade diminui por causa do aumento do centro da micela (implicando na diminuição da concentração do substrato no interior da mesma) e do aumento da carga absoluta da superfície da micela.

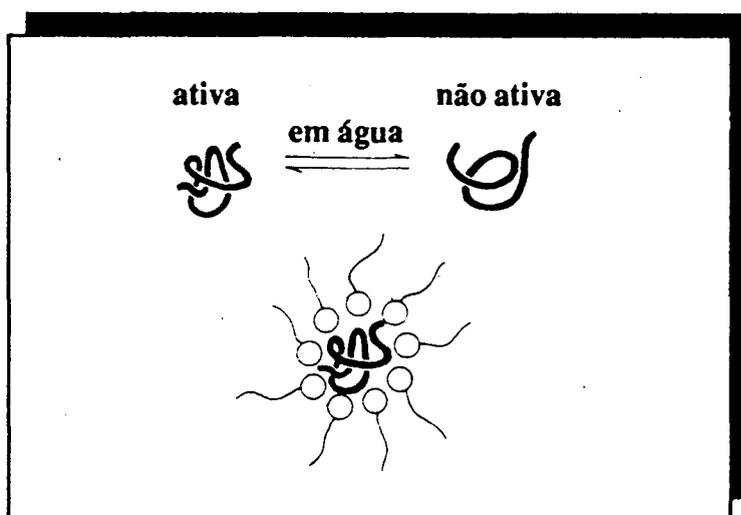


FIGURA 1.9 - Esquema da eliminação da flutuação espontânea da estrutura protéica dentro de uma micela reversa [41]

Outros fatores que diminuem a atividade das enzimas em micelas reversas são o aumento da constante dielétrica do meio e o aumento da concentração dos eletrólitos em solução.

A concentração do surfactante também influencia muito o nível de atividade da enzima. A superatividade só é observada em uma pequena concentração do mesmo.

Quando essa concentração aumenta muito, a atividade enzimática pode ser até menor do que a observada em solução aquosa. Isto é devido ao fato de que em grandes concentrações de surfactante o substrato particiona-se na camada do surfactante, e uma

menor quantidade de substrato é disponível para a reação no interior da micela.

As vantagens deste sistema são:

- a eliminação da necessidade de agitação (o sistema é homogêneo);
- a sua transparência óptica, o que o torna conveniente para estudos espectroscópicos;
- a sua fácil reprodutibilidade em termos de estrutura e dimensões;
- a sua estabilidade termodinâmica [37];
- a apresentação de uma área interfacial muito grande, o que torna a transferência de massa dos substratos e produtos mais eficiente que em outros sistemas bifásicos.

As desvantagens deste sistema são:

- a dificuldade de recuperação da enzima do meio para uma possível reutilização [48];
- uma maior dificuldade de isolamento dos produtos em relação a outros sistemas bifásicos.

1.2.5. Enzimas em Organo-gel

Em 1986, Haering e Luisi [49], investigando a solubilização de gelatina em micelas reversas, depararam-se com um fato que marcou o início de uma nova metodologia para imobilização de enzimas.

Os autores queriam investigar como o meio micelar poderia alterar o comportamento gelificante da gelatina. Sua expectativa era de que a formação do gel ocorresse dentro das micelas, resultando, eventualmente, numa solução micelar opaca e, possivelmente, numa separação de fase do gel aquoso. Porém, algo completamente diferente ocorreu: toda a solução micelar tornou-se gel. O fenômeno de gelificação mostrou-se reversível, isto é, acima de 40 °C o gel se liquefaz e esta solução pode ser transformada em gel novamente, tendo-se o cuidado de agitá-lo durante o resfriamento, caso contrário, ocorre a separação de fase.

Os autores descreveram ainda a preparação do organo-gel, que consiste basicamente em: adicionar a gelatina à solução micelar numa faixa de temperatura de

40 a 45 °C e agitar a mistura até esfriar. Um aspecto que intrigou os pesquisadores foi que a gelificação não ocorreu em todas as concentrações de gelatina e/ou água. A gelatina deve se encontrar em uma quantidade ligeiramente acima da sua solubilidade máxima. Em quantidade de água muito pequena (valores de W_0 abaixo de 20, independentemente da concentração de surfactante) não há formação do gel, devido à gelatina não poder ser dissolvida em quantidade suficiente para gelificar todo o sistema. Outro dado importante é que a gelificação só ocorre acima de uma certa concentração de surfactante.

Haering e Luisi [49] ficaram impressionados com o fenômeno da gelificação da solução, que consistia em mais de 80% de solvente orgânico, e descreveram uma hipótese para explicar o fato. Assumindo que a gelatina é hidrossolúvel, a mesma ficaria inicialmente confinada no interior das micelas. Como a concentração de surfactante (AOT) é relativamente alta, a distância entre as micelas de microemulsão é pequena. Assim, eles assumiram que existia um contato intermicelar e a percolação da gelatina, já que esta se encontra em excesso na solução. As moléculas de gelatina ligariam uma micela a outra. Inicialmente, isto ocorre de maneira dinâmica. Depois, com a gelificação da gelatina na microfase aquosa, todo o sistema ficaria rígido. A transição parece ser muito complexa, por necessitar de agitação constante para a formação do gel. Os autores também sugeriram a utilização deste sistema para a imobilização de enzimas.

No mesmo ano, Quillet e Heicke [50] estudaram o mesmo sistema e descreveram o processo de gelificação como tendo três etapas. Primeiro, a gelatina se dissolveria no interior aquoso da micela e formaria o que denominaram de "nanogel". Este processo seria idêntico à gelificação da gelatina em água: formação de ligações intra e intermolecular da gelatina através da formação de segmentos helicoidais tipo colágeno. Depois, haveria a percolação das nanofases e uma enorme aglomeração de nanofases seria formada. Por último, ocorreria a transição sol-gel, envolvendo as nanofases interconectadas por pontes de hélices tipo colágeno. Estes resultados foram obtidos por técnicas de Condutividade Elétrica, Dicroísmo Circular, Espalhamento de Luz e Rotação Óptica. Quillet e colaboradores reafirmam esta estrutura em 1987 [51], 1989 [52], 1990 [53] e 1991 [54] - Figura 1.10.

Em 1987, Luisi e colaboradores [55] estudaram o gel com técnicas de NMR. Apesar da viscosidade do gel ser muito alta (perto de 1000 P), a mobilidade do solvente

(iso-octano) medida no organo-gel foi muito próxima à do solvente puro. O tempo de relaxação do surfactante AOT obtido foi próximo do valor do AOT em soluções micelares líquidas.

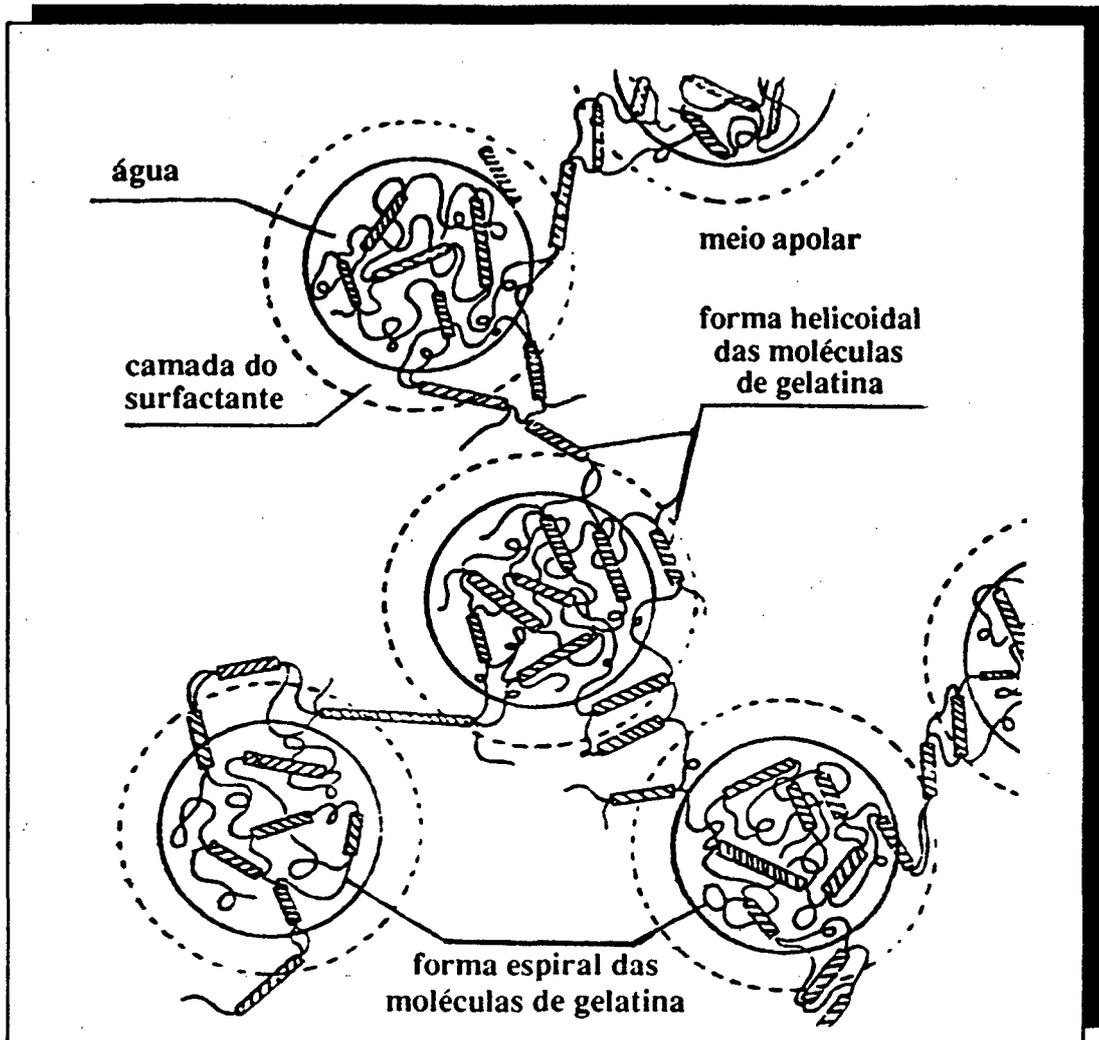


FIGURA 1.10 - Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (Modelo da percolação) [50]

Em 1988, Luisi e colaboradores [56] voltaram a confirmar os resultados anteriores e mostraram que o deslocamento químico da água é muito similar ao de dados publicados para micelas com alta concentração de água. Baseados nesses resultados, eles propuseram uma estrutura composta de uma rede muito rígida com cavidades muito grandes. Eles assumiram que a gelatina, que é insolúvel em solvente orgânico, forma uma estrutura rodeada por moléculas de AOT, e que a água ficaria

entre as moléculas de gelatina e AOT.

Neste mesmo ano, Atkinson e colaboradores [57], através de medidas de condutividade e espalhamento de neutrons, propuseram uma estrutura em que a gelatina, que possui propriedades tensoativas, tem um papel interfacial junto com o AOT. Atkinson não acreditava que a gelatina entrasse em contato com a fase oleosa, como seria requerido para ligar as micelas no modelo de Quillet. Ele sugeriu que o excesso de água e surfactante podem coexistir na forma de micelas em equilíbrio dinâmico com a rede hidratada de gelatina.

Em 1989, o mesmo grupo de pesquisadores [58] publicou resultados adicionais na área e concluiu que ocorre uma mudança na microestrutura da microemulsão quando a mesma é gelificada. Isto é, ocorre a formação de uma extensa rede de canais de gelatina e água rodeados por uma camada de surfactante e que esta estrutura estaria em equilíbrio com as gotas de solução micelar (Figura 1.11). Atkinson e colaboradores reafirmaram esta estrutura em suas publicações posteriores (1991) [59] [60].

Os trabalhos mais recentes sobre a estrutura do organo-gel foram publicados por Petit [61] [62]. Estes trabalhos analisaram os três modelos propostos para a estrutura do organo-gel (Figura 1.12). Seus resultados foram os seguintes:

- a. **Modelo da Estrutura Cilíndrica (modelo de Luisi e colaboradores):** este modelo é composto de uma microestrutura de moléculas de gelatina agregadas em uma rede rígida rodeada por água e AOT (Figura 1.12.a). Para os proponentes deste modelo, a estrutura da gelatina é essencialmente conservada na água, sendo que o papel da água é hidratar a gelatina. Os cilindros conectados de gelatina são, subsequentemente, rodeados por uma mono-camada de AOT e pelo solvente hidrofóbico. Este modelo é consistente com os valores de condutância elétrica, mas não permite uma explicação para a separação de fase observada no diagrama de fase.

- b. **Modelo da Estrutura Cilíndrica e Micelas Reversas (modelo de Atkinson e colaboradores):** neste modelo, a rede de gelatina e as micelas reversas são independentes (Figura 1.12.b). As micelas esféricas de AOT são fixadas pela rede de gelatina protegidas pelo surfactante, independentemente das suas posições, como

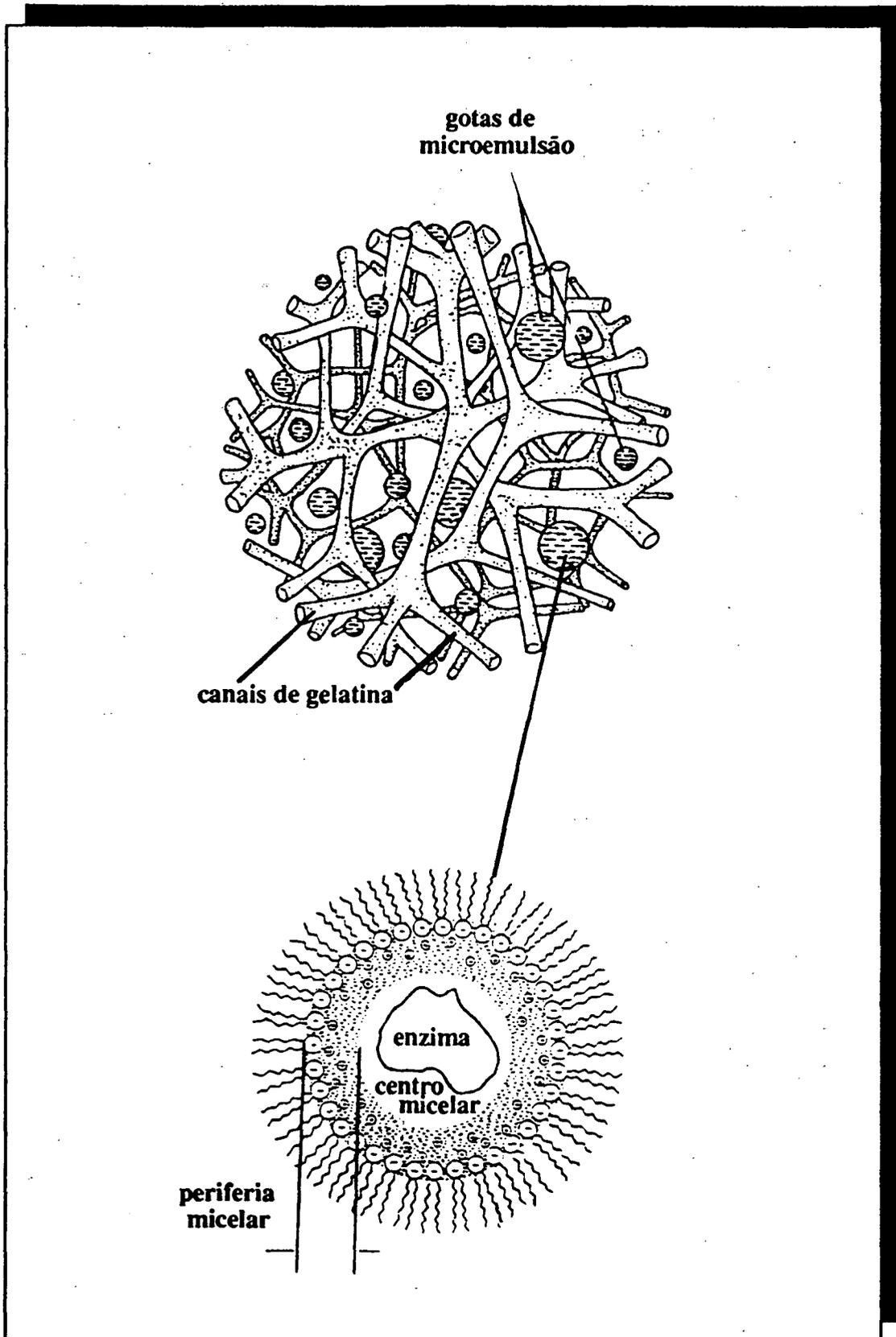


FIGURA 1.11 - Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (Modelo de rede de gelatina) [58]

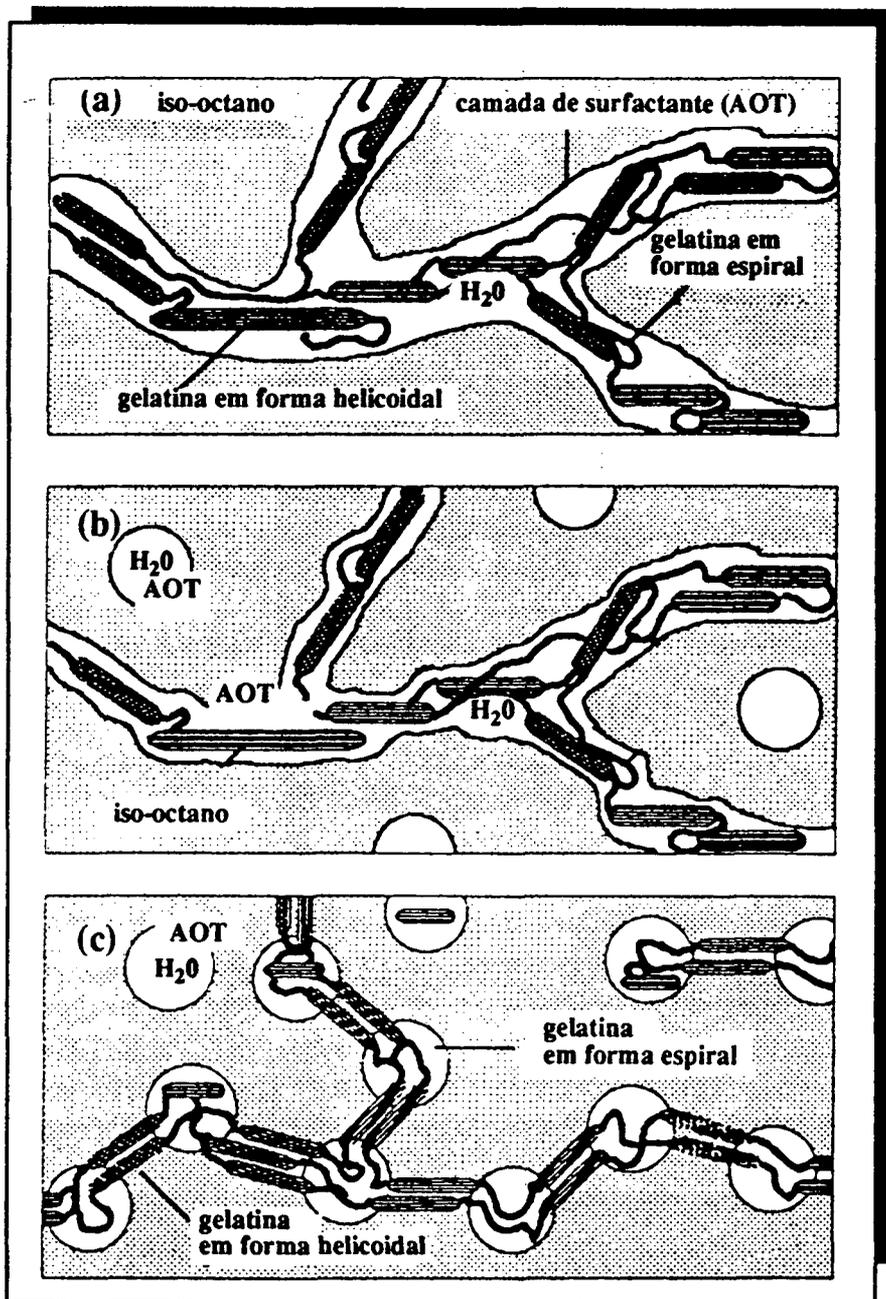


FIGURA 1.12 - Modelos propostos para a estrutura do organo-gel [61]: (a) Modelo da estrutura cilíndrica; (b) Modelo da estrutura cilíndrica e micelas reversas (c) Modelo das micelas reversas interconectadas pelos canais de Gelatina.

se estas não fossem conectadas pelos centros que contém água. As partes hidrofílicas da gelatina são cobertas pelo AOT. Este modelo permite explicar a forma do diagrama de fases, mas não prediz a percolação elétrica.

c. Modelo das Micelas Reversas Interconectadas por Canais de Gelatina (modelo de percolação de Quillet e colaboradores): este modelo é composto de micelas contendo água e parte da gelatina. Estas micelas reversas de AOT são conectadas pela gelatina, sendo arranjadas em cordões helicoidais. Porém, elas não são cobertas pelo surfactante (Figura 1.12.c). Para este sistema de micelas interconectadas, a estrutura das micelas e a característica do sistema água/AOT/iso-octano são retidas durante todo o processo de gelificação.

Segundo Petit, todas estas estruturas podem a priori existir em uma parte do diagrama de fase. Os espectros de espalhamento de raio X (sensíveis para a gelatina e água) e os espectros de neutrons (só sensíveis ao centro aquoso da micela), obtidos pelos seus respectivos proponentes, são consistentes com os modelos acima referidos¹. Entretanto, os espectros são quantitativamente diferentes, apesar de serem qualitativamente similares.

Petit realizou os seus experimentos de condutividade e espalhamento de raio X, de neutrons e de luz com géis com composição igual ao ponto de saturação do diagrama de fase. O ponto de saturação, segundo Petit, é o ponto no diagrama de fase onde ocorre a junção das diferentes regiões do mesmo, e onde toda a água e toda a gelatina estão comprometidas com a estrutura. Os resultados de seus experimentos mostraram que, no ponto de saturação, a estrutura do gel esta de acordo com o modelo de Quillet. Porém, Petit ressalta que as medidas que Atkinson realizou em 1989 [58] foram feitas com gel com composição muito diferente da do ponto de saturação.

No experimento de Atkinson, o gel tinha composição igual a da fase de gel transparente no diagrama de fases ($[AOT] = 0,1 \text{ M}$, $W_0 = 55$ e $3,5\%$ de gelatina). A área superficial da rede de gelatina era de $10^5 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ e a do filme do surfactante era de $3 \cdot 10^5 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. Nestas condições, o modelo da estrutura cilíndrica e micelas

1. Petit não deixa claro se todos os experimentos foram realizados para os três modelos apresentados.

reversas pode ser adotado, devido à existência de uma quantidade de surfactante suficiente para cobrir toda a gelatina e as micelas reversas independentes.

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

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

1.3. LIPASE

Segundo Gancet [9], a lipase é uma hidrolase classificada como esterase (hidrolisa ligações éster). Esta enzima possui peso molecular entre 40 e 50 kDa, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. A lipase é uma glicoproteína na qual a parte glicosilada hidrófila é posicionada opostamente à região hidrofóbica que circunda o sítio ativo.

1.3.1. Estrutura Tridimensional e Sítio Ativo

Apesar da lipase ser amplamente utilizada nas mais variadas aplicações desde a sua descoberta, somente em 1990 é que a sua estrutura tridimensional foi apresentada em um trabalho realizado por Brady [63]. Brady, através de cristalografia de raio X, determinou a estrutura da lipase proveniente do fungo *Mucor miehei*. Esta lipase é constituída por uma cadeia protéica simples, contendo 269 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de 29.472. Seu centro catalítico é composto de 3 aminoácidos: Ser 144, His 257, Asp 203 (Figura 1.13). O centro catalítico está localizado perto da superfície da molécula da proteína, mas não é completamente exposto ao solvente. O centro ativo está coberto por um segmento espiral curto da molécula como se fosse uma tampa.

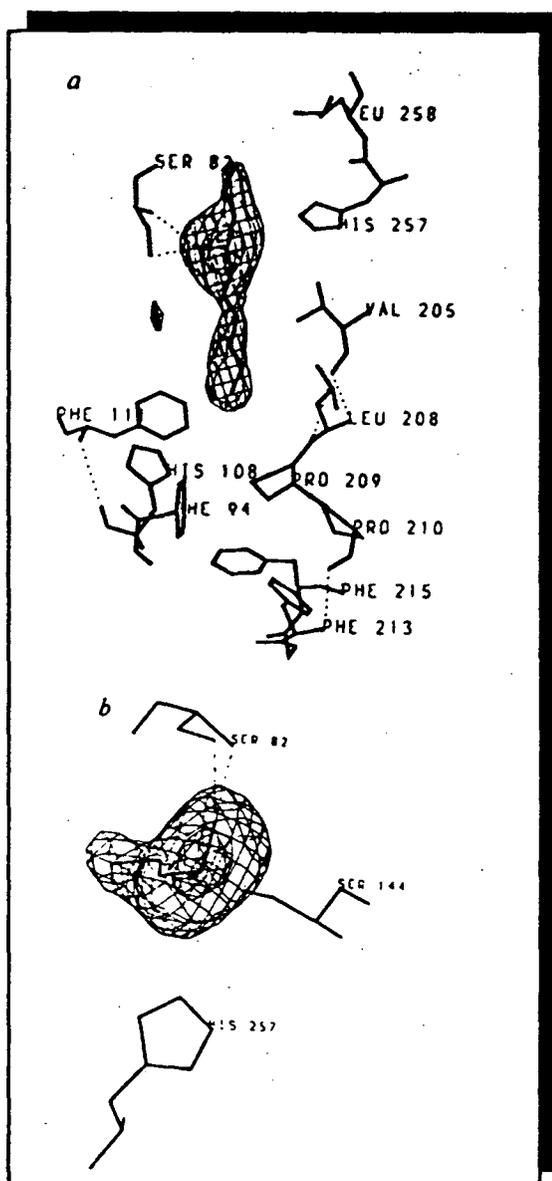


FIGURA 1.14 - Estrutura do sítio ativo da lipase do *Mucor miehei* na presença do N-hexilclorofosfonato de etila.

a) sítio ativo completo e inibidor

b) seção transversal mostrando apenas a interação do inibidor com Ser 82, Ser 144 e His 257 [64].

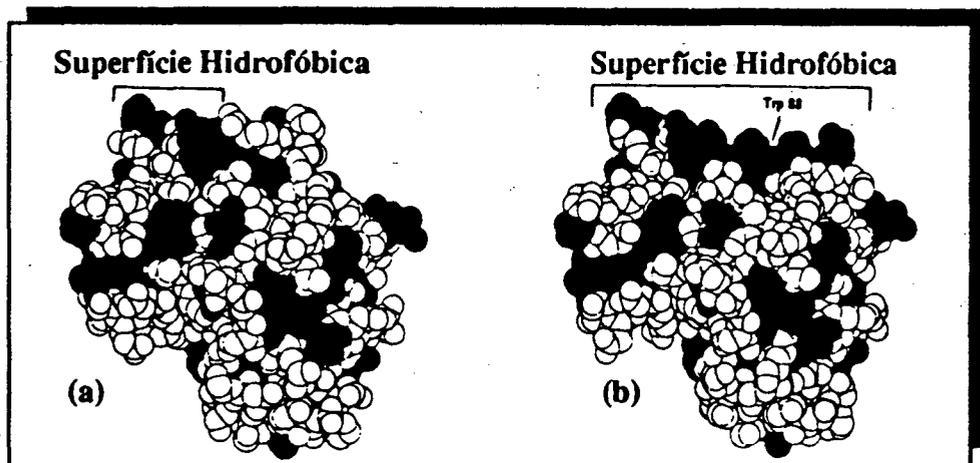


FIGURA 1.15 - Estrutura atômica da molécula da lipase nativa (a) e do complexo enzima-substrato (b). Os átomos apolares estão sombreados. O aumento da superfície apolar é nítida. O inibidor está mascarado pelo Trp 88 [64]

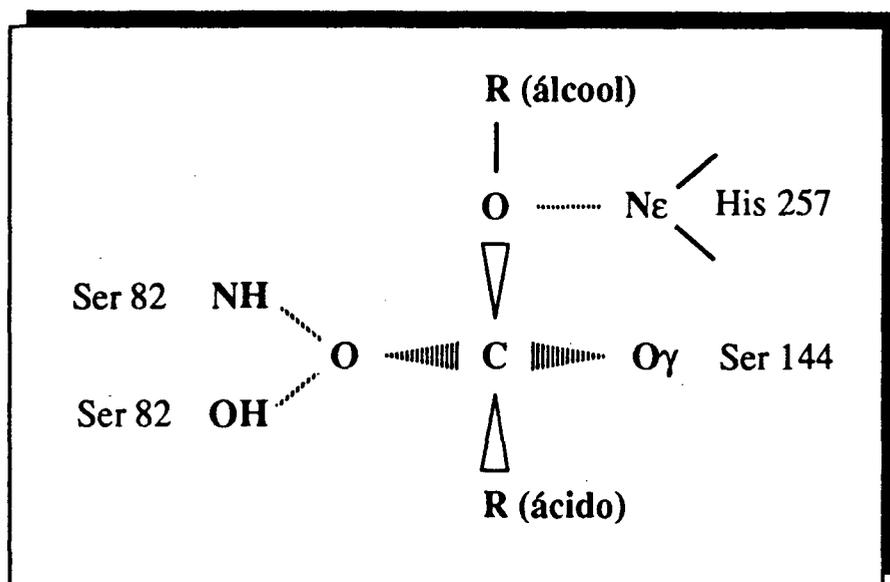


FIGURA 1.16 - Representação esquemática do complexo tetraédrico enzima-substrato da lipase *Mucor miehei* (adaptada de [64])

1.3.2. Mecanismo de Ação

O mecanismo mais provável de ação da lipase foi proposto por Gancet [9]. Segundo este mecanismo, a lipase forma um intermediário com o substrato,

denominado acil-enzima, como mostra a Figura 1.17. Após a sua formação, o intermediário é atacado pelo nucleófilo que pode ser um álcool, um tiol ou uma amina. No caso da hidrólise de ésteres, o nucleófilo é a água.

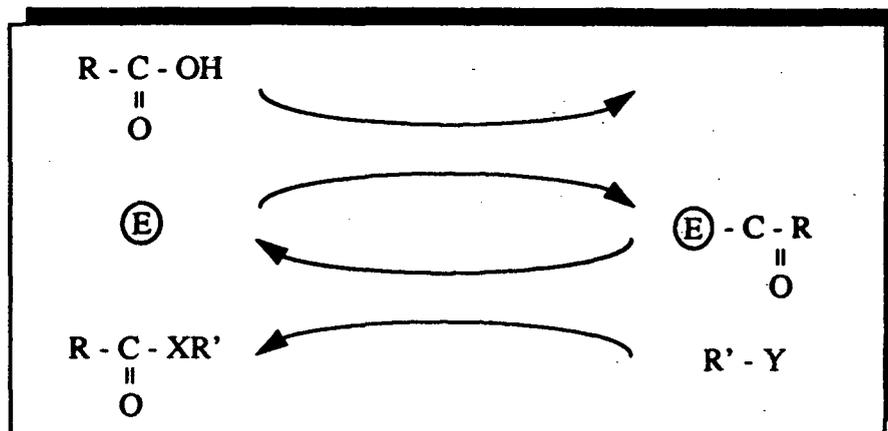


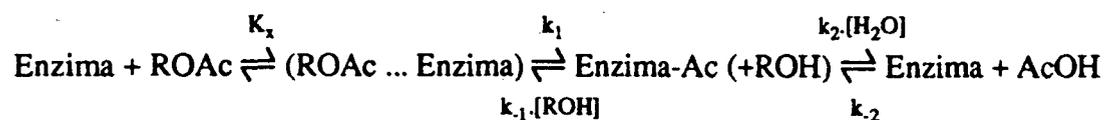
FIGURA 1.17 - Mecanismo de formação do intermediário acil-enzima (adaptado de [9]).

X = O, NH, S

Y = OH, NH₂, SH

(E) : enzima

Laumen [65], estudando a hidrólise de ésteres, propôs o mecanismo de ação enzimática indicado no esquema abaixo. Este mecanismo revelou que a etapa determinante da reação é a transformação do complexo enzima-substrato no intermediário acil-enzima.



Diferentes velocidades de hidrólises foram observadas para cada um dos acetatos estudados por Laumen, o que indica que a hidrólise do intermediário acil-enzima não é a etapa determinante. Em consequência, pode-se concluir que a transformação do complexo enzima-substrato no intermediário acil-enzima (k_1) é a etapa determinante de toda a reação.

Todas essas considerações devem também ser válidas para a síntese de ésteres, já que o mecanismo de ação da esterificação é o mesmo da hidrólise, porém no sentido oposto.

1.3.3. Utilização em Síntese Orgânica

A Lipase é uma enzima da classe das hidrolases, que tem como função biológica a hidrólise e síntese de triacilgliceróis [16]. Ela é encontrada na natureza em seres inferiores (i.e. bactérias e fungos), bem como em seres superiores (i.e. plantas e animais). A Lipase é muito utilizada em síntese orgânica, devido à sua grande disponibilidade e baixo custo, sendo ainda muito estável, além de não requerer a utilização de co-fatores [66].

Em 1900, Kastle e Loevenhart [67] descreveram a síntese do butirato de etila, usando um extrato de pâncreas de porco, e acreditaram que a reação tinha sido catalisada pela ação da lipase pancreática. Outras publicações se seguiram usando preparações não purificadas de lipases, principalmente na preparação de ésteres como os glicerídeos. Só mais tarde, em 1964, é que a síntese de glicerídeos e monoésteres de ácidos graxos foi catalisada por lipase purificada, proveniente de um fungo chamado *Aspergillus niger*, num trabalho de Iwai e colaboradores [68].

A síntese de ésteres de ácido olêico e álcoois alifáticos primários e secundários ou álcoois terpênicos catalisados por lipases foi descrita por Okumura e colaboradores em 1979 [69] e Iwai e colaboradores em 1980 [70].

Zaks e Klibanov [71] demonstraram, em 1984, a utilização de lipase em sistemas com uma quantidade diminuta de água. Anos antes, em 1981, Martinek [72] havia relatado a utilização de lipase em reações com solventes imiscíveis em água.

O primeiro trabalho utilizando lipase em micelas reversas data de 1985, e foi realizado por Han e Rhee [73]. A partir desta data vários autores utilizaram este sistema para realizar sínteses catalisadas por lipases [74] [75] [76] [77] [78].

A escolha da utilização de lipase em sistemas que são compostos por micelas reversas é devido ao fato de que a enzima é ativa quase que exclusivamente na interface [79]. Assim, esses sistemas que são compostos por uma área interfacial muito grande, possibilitam um contato muito extenso entre enzima e substrato.

A utilização de lipase em sistema de organo-gel foi publicada muito recentemente, em 1991, por Rees e Nascimento [80] [81]. Este foi o primeiro trabalho em que uma lipase foi imobilizada nesse sistema para a utilização na execução de reações de esterificação.

As principais reações em que lipases são utilizadas como catalisadores em solventes orgânicos são: esterificação e transesterificação [9] [11] [12] [13] [14] [17] [82] [83], sínteses enantioseletivas [18] [22] [23] [26] [27] [30] [31] [65] [84] [85] [96], síntese de amidas [28] [29], síntese de glicerídeos [8].

1.4. PLANO DE PESQUISA

O objetivo deste trabalho é estudar em maiores detalhes a enzima *Chromobacterium viscosum* (CV) lipase imobilizada em sistema de organo-gel, e a sua utilização em síntese orgânica. Uma maior ênfase será dada ao estudo da importância do efeito do solvente na eficiência das reações desenvolvidas.

O solvente selecionado para a maioria dos experimentos foi o ciclo-hexano, devido à sua disponibilidade e em função de não existir nenhum relato de sua utilização em organo-gel na literatura. Assim, serão analisadas as características do organo-gel de ciclo-hexano, bem como o seu desempenho comparativamente a outros solventes que foram previamente utilizados na literatura, como é o caso do n-heptano, do n-hexano¹ e do iso-octano.

Uma das características do organo-gel de ciclo-hexano a ser estudada consiste na identificação das proporções nas quais o solvente entraria em equilíbrio com os demais elementos participantes do sistema de organo-gel, resultando em um gel com características ideais para ser utilizado em reações (gel sólido transparente). Para isso, desenvolver-se-á um sistema onde a variação da quantidade de gelatina será estudada em relação à variação da quantidade de água. Esta avaliação permitirá o levantamento das diversas fases que o sistema de organo-gel pode assumir, de acordo com o equilíbrio entre seus componentes. Os resultados poderão ser mostrados em um diagrama onde as diversas fases do organo-gel serão delimitadas e identificadas. Comparações com diagramas de fase de organo-géis de outros solventes serão efetuadas e seus resultados discutidos.

Outra característica do organo-gel de ciclo-hexano que será investigada é a sua

1. O n-hexano é estudado no trabalho de tese de mestrado de Roberto Dalla Vecchia.

susceptibilidade a diversos solventes de uso comum em síntese orgânica, bem como a diversos reagentes que poderiam servir como substratos de reações de esterificações.

Testes com o gel serão também efetuados para elucidar-se algumas questões referentes à sua estabilidade térmica e o seu pH.

A enzima CV lipase será imobilizada no organo-gel de ciclo-hexano e será estudada com relação à sua atividade e especificidade em reações de esterificação. Para tal, reações com diversos ácidos e 1-pentanol serão executadas. Além disso, utilizar-se-á a enzima para se realizar a síntese de tioésteres e amidas.

Com o intuito de se estudar o efeito do solvente na eficiência da reação de esterificação catalisada por CV lipase imobilizada em organo-gel, a reação entre o ácido oléico e o álcool 1-pentanol será tomada como modelo. Neste sentido, um sistema de organo-gel, obtido com ciclo-hexano, será avaliado frente aos seguintes solventes: n-hexano, ciclo-hexano, n-heptano, n-octano, iso-octano, éter de petróleo, tetracloreto de carbono, tolueno, clorofórmio, 1,4-dioxano, éter etílico, benzeno, xileno e n-hexadecano. Este conjunto de reações permitirá o levantamento da dependência, se existir, entre a eficiência da reação e parâmetros tais como: polaridade, constante dielétrica, momento de dipolo, coeficiente de difusão, dentre outros.

Espera-se, com estas investigações conhecer melhor o sistema de organo-gel e identificá-lo mais adequadamente para utilização em síntese de ésteres, tioésteres e amidas, em laboratório de química orgânica.

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo descreverá em detalhes os experimentos realizados na investigação dos tópicos de interesse, mencionados no Plano de Trabalho (Capítulo 1). O procedimento experimental é apresentado através da indicação:

- dos componentes, reagentes e solventes utilizados;
- do procedimento de preparação dos diversos tipos de organo-géis;
- da preparação do meio reacional;
- dos métodos de obtenção do diagrama de fase, das medidas de pH e estabilidade térmica, dentre outras.

O texto a seguir procura abordar cada um desses aspectos.

2.1. COMPONENTES DO ORGANO-GEL

Os componentes do organo-gel foram obtidos das seguintes fontes:

- Di-2-etilhexil sulfosuccinato de sódio (Aerosol OT) e gelatina tipo A (Bloom 300) foram obtidos da Sigma e foram utilizados sem nenhuma purificação adicional.
- CV lipase (lote 6465) foi obtida da Genzyme Biochemicals Ltd. (Inglaterra), apresentando uma atividade específica de 3335 unidades mg^{-1} do pó.
- Água bi-destilada.

2.2. REAGENTES E SOLVENTES

Os demais reagentes e solventes utilizados consistiram nas seguintes marcas comerciais:

- Merck: n-hexano, ciclo-hexano, iso-octano, tolueno, clorofórmio, benzeno, n-hexadecano, 1-butanol, 1-pentanol, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido

láurico, fenilamina, dodecilamina, etanotiol, 1-propanotiol, 2-butanotiol, 1-dodecanotiol, tiofenol, p-metil tiofenol, sílica 60 HF 245 (para c. c. d.), sílica 60 PF254 + 366 (para cromatografia de coluna).

- Sigma: ácido palmítico, ácido sórbico, ácido 4-metil valérico.
- Riede - De Haen: n-octano, ácido oléico, benzilamina.
- Vetec: éter de petróleo, 1, 4-dioxano, 1-pentanol.
- Aldrich: p-clorotiofenol.
- Ecibra: xileno.
- Quimidrol: éter etílico.
- Reagen: tetracloreto de carbono.
- BDH: 1-decanol.
- J. T. Baker: n-heptano.
- FLUKA: p-toluidina.

As fórmulas químicas dos reagentes e solventes acima estão apresentadas no Anexo 2.

2.3. PREPARAÇÃO DO ORGANO-GEL

2.3.1. Procedimento Geral

O procedimento geral para a preparação do organo-gel está apresentado esquematicamente na Figura 2.1.a, consistindo basicamente no seguinte.

A gelatina foi misturada com água a frio e colocada para dissolver a uma temperatura de 55 °C, até a obtenção de uma solução líquida homogênea.

Uma segunda solução de AOT em solvente orgânico foi preparada e colocada para estabilizar termicamente a 55 °C por aproximadamente 5 minutos. A segunda solução foi então adicionada à primeira e agitada manual e vigorosamente, até atingir a temperatura ambiente.

A solução de AOT foi obtida adicionando-se uma certa quantidade de uma solução estoque de AOT a 0,5 M em solvente, mais uma certa quantidade do referido solvente puro, até atingir-se a concentração de AOT desejada, o que varia de um

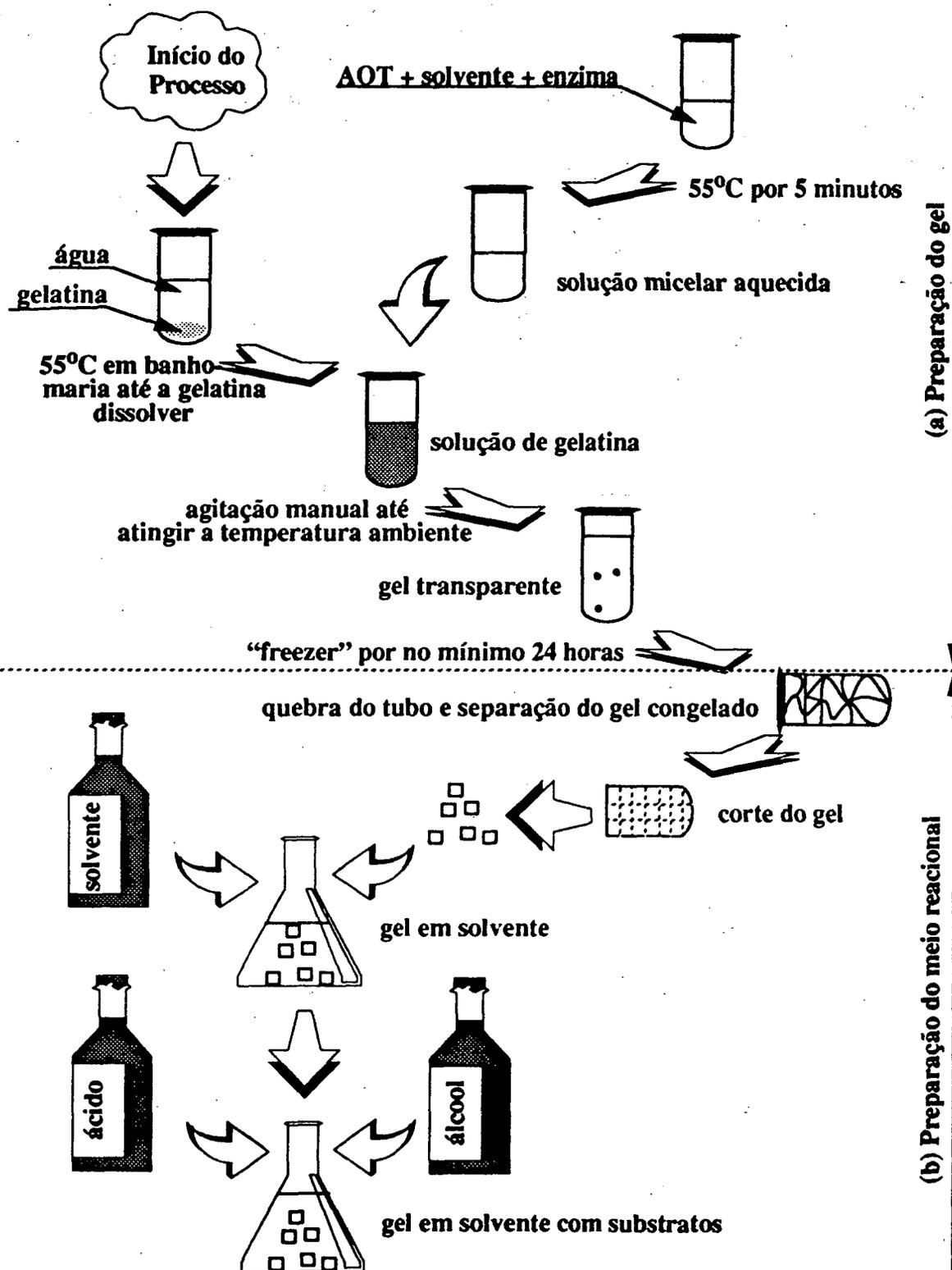


FIGURA 2.1 - Preparo do organo-gel e do meio reacional

solvente para outro.

Os organo-géis utilizados em sínteses continham ainda 0,25 ml de uma solução de CV lipase em água numa concentração de 10 mg/ml. Esta solução foi previamente injetada na solução de AOT em solvente orgânico. Uma solução transparente foi obtida após uma leve agitação. A concentração de enzima no organo-gel foi de 0,25 mg/ml.

Os géis, após estabilizarem em temperatura ambiente, foram preservados em "Freezer" a -20°C até a sua utilização nas reações.

2.3.2. Composição dos Diversos Organo-Géis

A composição para cada tipo de organo-gel para as reações foi a seguinte:

a. Organo-gel de Ciclo-Hexano:

O organo-gel de ciclo-hexano continha 1,4 g de gelatina, 2,5 ml de água, 3,0 ml de solução de AOT 0,5 M em ciclo-hexano e 3,1 ml de ciclo-hexano. O gel apresentou $W_0 = 92,59$ e uma concentração final de AOT = 0,15 M.

b. Organo-gel de Heptano:

O organo-gel de heptano continha 1,4 g de gelatina, 2,0 ml de água, 4,0 ml de solução de AOT, 0,5 M em heptano e 2,6 ml de heptano. O gel apresentou $W_0 = 55,55$ e concentração final de AOT = 0,2 M.

c. Organo-géis de Hexano, Octano e Iso-Octano:

Os géis de hexano, octano e iso-octano continham cada um 1,4 g de gelatina, 2,15 ml de água, 4,0 ml de solução de AOT, 0,5 M em cada solvente e 2,2 ml do respectivo solvente. O gel apresentou $W_0 = 59,72$ e concentração final de AOT = 0,2 M.

d. Organo-gel de Xileno:

O organo-gel de xileno continha 1,4 g de gelatina, 1,8 ml de água, 4,0 ml de solução de AOT 0,5 M em xileno e 2,8 ml de xileno. O gel apresentou $W_0 = 50,00$ e concentração final de AOT = 0,2 M.

2.4. DIAGRAMA DE FASES DO ORGANO-GEL EM CICLO-HEXANO

Para obter-se o diagrama de fases do organo-gel, vários géis foram preparados com quantidades variáveis de gelatina e de água. A concentração de AOT do sistema foi sempre mantida constante em 0,1 M no volume final do gel. O modo de preparação do gel foi idêntico ao procedimento descrito no item 2.3.1. Contudo, nesse experimento os géis não continham enzima.

Após a preparação do gel, o mesmo foi deixado em repouso por 24 horas a temperatura ambiente. O aspecto macroscópico do sistema foi analisado por avaliação visual. Traçou-se um diagrama de percentual de gelatina em função de W_0 , a partir do qual as áreas das diferentes fases do gel foram delimitadas.

2.5. ESTABILIDADE TÉRMICA DO ORGANO-GEL

Alguns géis com diversas concentrações de gelatina e com W_0 distintos foram preparados e deixados a temperatura ambiente para estabilizar. Após 24 horas, os géis foram colocados em banho-maria a 55 °C até liquefazerem-se. Em seguida, o sistema foi agitado vigorosamente até alcançar a temperatura ambiente. O sistema permaneceu a temperatura ambiente por 24 horas, tendo o seu aspecto macroscópico sido analisado por avaliação visual, após este período.

Este ciclo foi repetido tantas vezes quantas se fizeram necessárias. Algumas vezes, o gel foi mantido a -20°C por 24 horas. Após este período o gel foi novamente dissolvido a 55°C e deixado a temperatura ambiente para posterior avaliação visual.

2.6. MEDIDAS DE pH DO ORGANO-GEL

Géis com diferentes concentrações de gelatina, diferentes valores de W_0 e baixa viscosidade foram preparados para medidas de pH.

Após repouso de 24 horas a temperatura ambiente, o pH do gel foi medido, utilizando-se um pHmetro Micronal B-374.

O eletrodo do pHmetro foi calibrado com soluções padrão. O pH do gel foi medido colocando-se o eletrodo diretamente no tubo de ensaio que o continha.

2.7. REAÇÕES

2.7.1. Preparação do Meio Reacional

O procedimento de preparação do meio reacional para as reações de esterificação, tioesterificação e síntese de amidas segue a mesma representação esquemática das Figuras 2.1.b e 2.2.a, consistindo basicamente no seguinte.

O gel foi retirado do “freezer”, separado do tubo de ensaio e cortado ainda congelado em secções de aproximadamente 125 mm^3 . Imediatamente em seguida, o gel foi colocado em um erlenmeyer contendo 30 ml do solvente que seria utilizado na reação. Deixou-se o gel a temperatura ambiente até a temperatura do mesmo estabilizar-se (aproximadamente $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Os substratos foram adicionados na proporção 1:1 (0,01 mol na maioria das reações). O sistema foi então deixado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas (30 dias no caso da tioesterificação) sob agitação suave (agitador magnético marca Micro-Química, modelo AMA 102).

Decorrido o tempo de reação, os produtos e substratos remanescentes foram separados do gel, através da decantação da solução reacional. A extração do produto retido no gel foi realizada por sucessivas lavagens do mesmo com o solvente orgânico puro.

Reações controle foram executadas paralelamente, utilizando-se géis sem enzima.

2.7.2. Teste de Estabilidade do Organo-gel frente a Substratos e Solventes

Antes de proceder a preparação do meio reacional, o gel foi testado em relação a cada componente do mesmo.

Algumas secções do gel, preparado com a mesma composição do gel que foi utilizado para as reações, porém não contendo a enzima, foram colocadas em contato

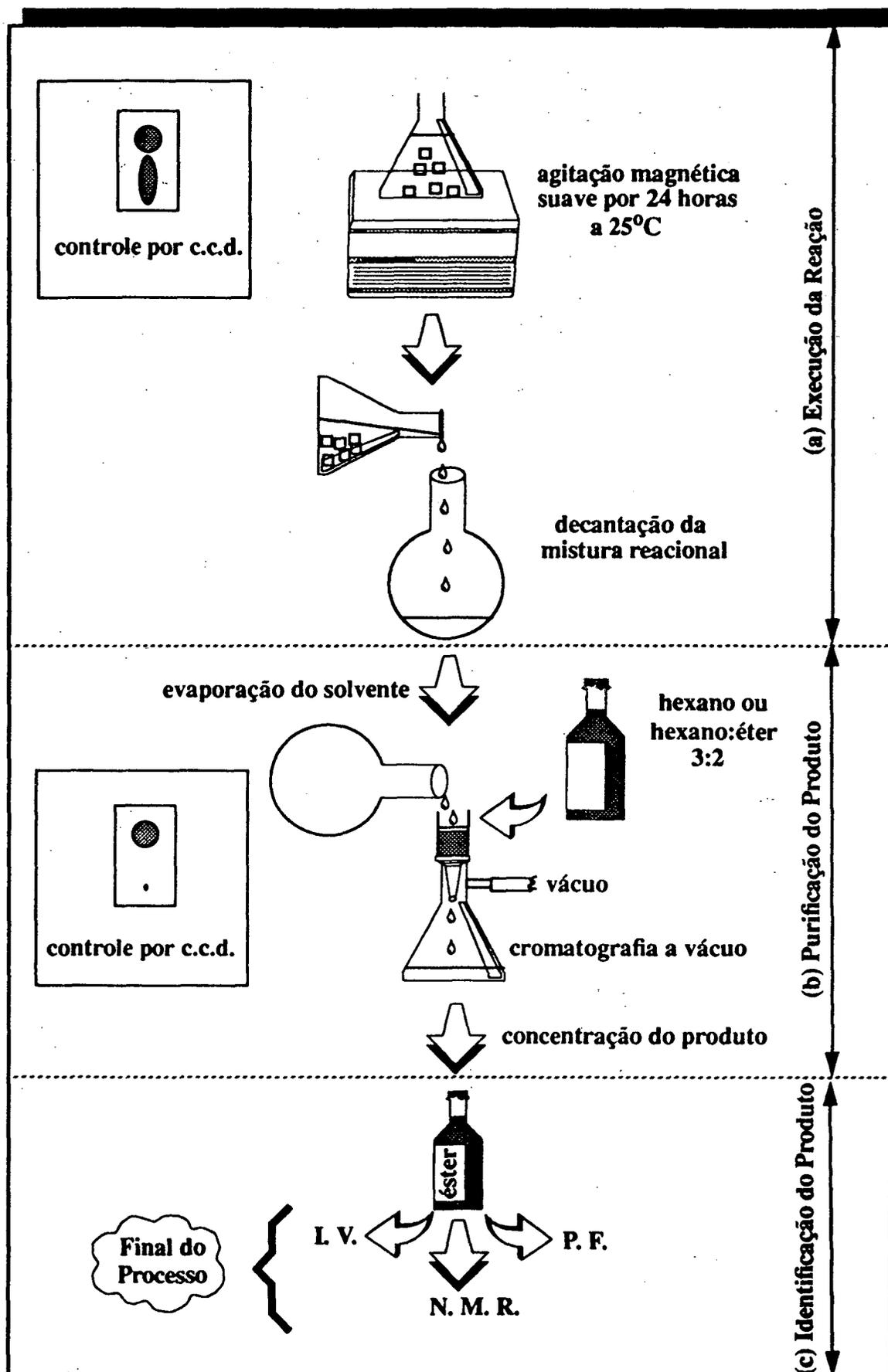


FIGURA 2.2 - Execução da reação, purificação e identificação do produto

com cada substrato e solvente isoladamente. O sistema foi deixado por 24 horas em repouso, após o qual suas características macroscópicas foram avaliadas visualmente.

Os solventes e substratos que causavam danos ao gel foram rejeitados, tendo sido utilizados nas reações somente os solventes e substratos que não causavam danos à estrutura macroscópica do gel.

2.7.3. Purificação dos Produtos

O procedimento de purificação dos produtos está representado esquematicamente na Figura 2.2.b.

Primeiramente, a solução reacional foi concentrada em rotavapor (marca Buche, modelo RE 111). O concentrado foi tratado com 1 ml de trietilamina por alguns minutos. Em seguida, 50 ml de hexano foram adicionados para promover a precipitação do sal do ácido formado. Quando necessário, a solução foi colocada no freezer para facilitar a precipitação. A solução foi, então, filtrada e o filtrado foi concentrado em rotavapor. Finalmente, o produto foi separado dos reagentes remanescentes, através de cromatografia rápida a vácuo ("Flash chromatography") com sílica 60 PF 254 + 366. O solvente utilizado foi o hexano ou uma mistura de hexano e éter etílico (3:2 V/V).

2.7.4. Identificação dos Produtos

O procedimento de identificação dos produtos está representado esquematicamente na Figura 2.2.c.

A identificação dos produtos durante as reações e durante a purificação foi feita por cromatografia de camada delgada (c. c. d.). Utilizou-se placas de sílica (60 HF 254) e uma mistura de hexano e éter etílico 3:2 V/V como eluente.

A identificação dos produtos purificados foi feita por espectroscopia de infravermelho em aparelho Perkin Elmer - modelo 781, e por ressonância nuclear magnética de próton (^1H RNM) em aparelho Varian EM 360L.

Medidas de ponto de fusão (PF) foram feitas em aparelho de determinação do Ponto de Fusão (APF-301).

CAPÍTULO 3 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

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

A cada conjunto de resultados obtidos são associados comentários que procuram comparar os mesmos com dados disponíveis na literatura. Como resultado dessas comparações e de uma série de análises, algumas conclusões e sugestões são apresentadas.

Todos os resultados obtidos com os experimentos laboratoriais são apresentados e discutidos, sejam eles decorrentes de experimentos bem sucedidos ou não. Esta abordagem foi adotada com o intuito de se executar um estudo razoavelmente completo do objeto de pesquisa. Assim, alguns aspectos que aparentemente possam parecer negativos, contribuíram sem dúvida alguma para o entendimento das características do organo-gel e da sua utilização potencial na síntese de ésteres, tioésteres e amidas.

3.1. DIAGRAMA DE FASES DO ORGANO-GEL DE CICLO-HEXANO

O experimento de execução do diagrama de fase é de grande importância, pois ele é o primeiro passo no estudo do sistema de organo-gel. O experimento em si foi um trabalho árduo, lento e minucioso, cujos resultados obtidos para o organo-gel de ciclohexano estão sintetizados no diagrama da Figura 3.1.

Na delimitação das áreas deste diagrama, cerca de 260 preparações diferentes de organo-gel foram preparados. A avaliação de cada um desses sistemas possibilitou, assim, distinguir-se seis regiões distintas, onde os componentes do sistema podem ou não estar em equilíbrio e, conseqüentemente, podendo ou não formar o gel. As diferentes fases do sistema de organo-gel têm uma relação estreita com a composição de seus componentes.

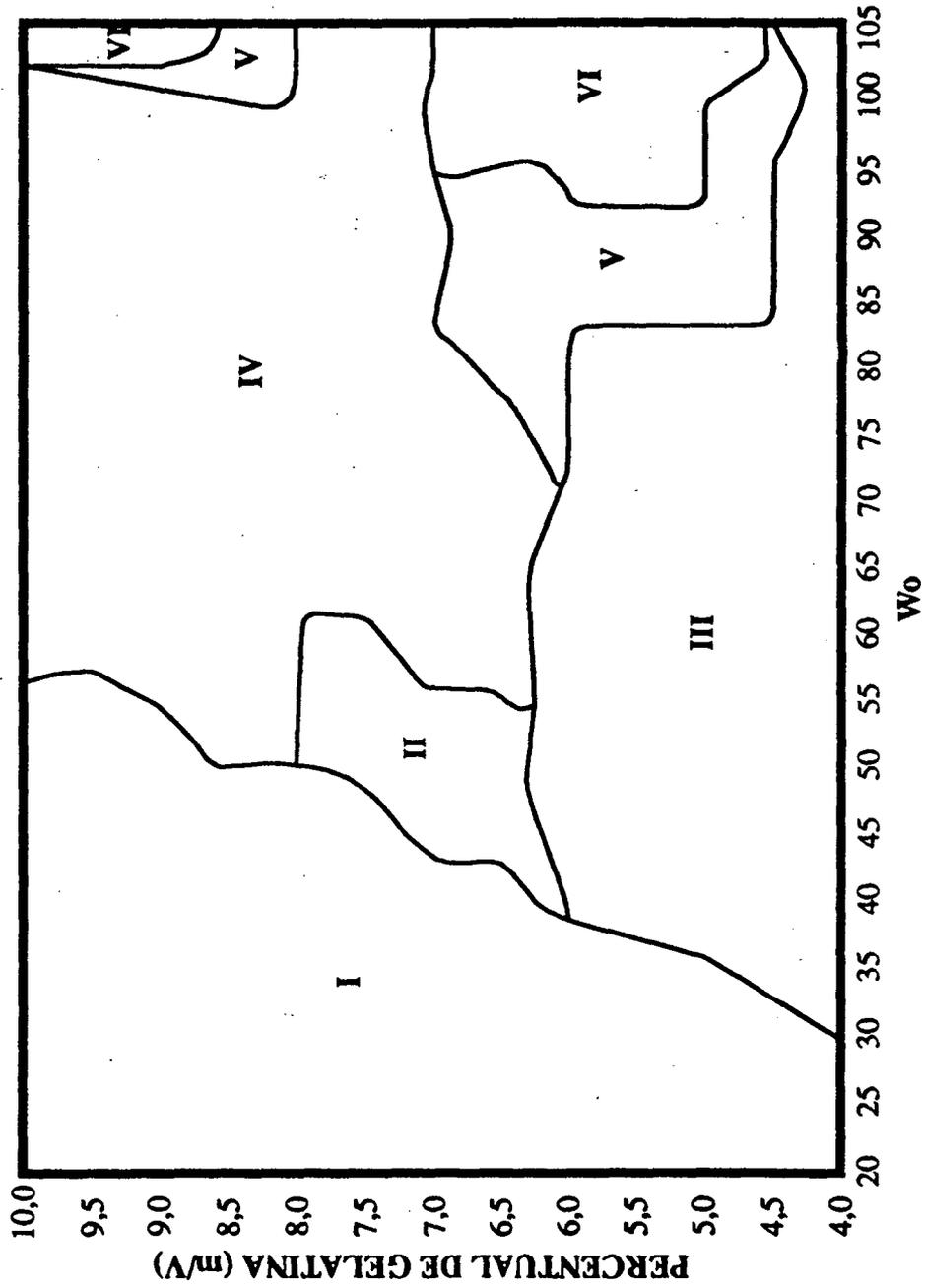


FIGURA 3.1 - Diagrama de fases do organo-gel de ciclo-hexano/AOT (0,1 M): (I) Separação de fase (o solvente separa-se da gelatina sólida); (II) Separação de fase (o solvente separa-se do gel); (III) Solução micelar líquida; (IV) Gel transparente; (V) Gel levemente opaco; (VI) Gel opaco.

Os itens a seguir discutem os aspectos relevantes do diagrama da Figura 3.1.

3.1.1. Regiões de Separação de Fase

a. Região I

No diagrama da Figura 3.1, a região I é denominada “separação de fase”, e é onde o solvente orgânico não se mistura à gelatina hidratada. Esta região se situa numa faixa de valores de W_0 muito baixos, onde a quantidade de água é insuficiente para dissolver a quantidade de gelatina presente no sistema.

A concentração de surfactante (AOT) na determinação do diagrama de fases foi mantida constante. Assim, o aumento de W_0 está relacionado diretamente com o aumento de água no sistema, já que $W_0 = [H_2O]/[AOT]$.

A linha de separação desta fase no diagrama possui uma inclinação, mostrando uma relação entre o aumento da quantidade de gelatina e o aumento de água. Assim, quando a quantidade de gelatina é de 4,0%, a separação de fase ocorre para valores de W_0 menores que 30,0. Porém, com o aumento da quantidade de gelatina para 9,5%, a separação de fase passa a ocorrer para valores de W_0 de até 57,5.

b. Região II

A separação de fase também ocorre na região II. Esta é uma região de transição entre a região I e a região do gel transparente (região IV). Nesta região, uma pequena quantidade de solvente se separa do organo-gel. Existe uma semelhança na inclinação na linha de separação desta região com a região IV, e a inclinação da linha de separação entre a região I e esta região. Isto mostra a dependência entre a quantidade de gelatina e a quantidade de água. A única diferença é que nesta região a água já é suficiente para solubilizar a gelatina e formar o gel, enquanto que na região I isto não ocorre.

A separação do solvente é explicada devido à quantidade de gelatina ser insuficiente para gelificar todo o sistema. Isso é particularmente visível na forma pela qual esta região é delimitada na sua parte superior. Quando a quantidade de gelatina é

inferior a 8,0%, ocorre a separação de fase numa faixa de W_0 que varia de 50 a 61. Quando a quantidade de gelatina ultrapassa 8,0% nesta mesma faixa de W_0 , o gel se forma.

3.1.2. Região da Solução Micelar Líquida

A região III é a região onde o sistema forma uma solução micelar líquida transparente, em função dos seus componentes se encontrarem em concentrações que possibilitem a formação de um sistema opticamente transparente e termodinamicamente estável.

Nesta região, a concentração de água já é suficiente para solubilizar toda a gelatina, porém, esta última está em quantidade muito baixa para gelificar o sistema. O sistema permanece líquido, possuindo uma só fase, com quantidade de gelatina em torno de 6,0%, numa faixa de W_0 de 37 a 83. Acima de $W_0 = 83$, um fenômeno interessante ocorre: há a gelificação do sistema (formação de um gel ligeiramente opaco - região V) numa concentração de gelatina acima de 4,5% (ao redor de 4,3% de gelatina, quando W_0 esta entre 95 e 103). Este fato demonstra que a quantidade de água do sistema é também um fator determinante no processo de gelificação. Assim, uma quantidade de gelatina que, a priori, era insuficiente para gelificar o sistema, passa gelificá-lo com o aumento de sua hidratação.

3.1.3. Regiões de Formação do Gel

a. Região IV

A região IV é a região onde há a formação do gel transparente, sendo muito ampla no sistema de organo-gel de ciclo-hexano, quando comparado com sistemas de organo-géis de outros solventes. Esta é a região onde os componentes do gel estão todos em equilíbrio, formando assim uma só fase contínua, sólida e transparente.

A formação do gel transparente ocorre numa quantidade de gelatina: acima de 8,0%, para W_0 acima de 50; ao redor de 6,2%, para W_0 acima de 55; entre 6,0 a 7,0%,

quando W_0 varia de 70 a 83, e acima de 7,0%, quando W_0 é superior a 83. Estas variações na formação do gel são decorrentes dos diversos pontos de equilíbrio que o sistema atinge, quando as proporções de seus componentes são alteradas. No primeiro segmento, quando W_0 está entre 50 e 55, a quantidade de gelatina necessária para gelificar o sistema é maior (acima de 8,0%) do que quando W_0 está acima de 55. Nesta região, mais uma vez, a quantidade de água tem um papel determinante na gelificação do sistema (ver item 3.1.2). Pode-se dizer que a hidratação da gelatina tem uma função muito importante na gelificação, assim como a concentração absoluta da gelatina.

b. Regiões V e VI

No segmento em que W_0 varia de 70 a 83, observa-se a transição do gel transparente para gel levemente opaco, quando a quantidade de gelatina varia de 6,0 para 7,0%. Nesta região, novamente, o efeito da quantidade de água é observado. O sistema sai do seu equilíbrio quando se aumenta muito o seu grau de hidratação. Assim, o gel que era transparente passa a ficar ligeiramente opaco (o sistema deixa de ter uma só fase, ou seja, deixa de ser uma solução micelar gelificada para ser uma suspensão gelificada).

A inclinação da linha de separação entre as regiões IV e V mostra que existe uma dependência entre o aumento da quantidade de gelatina e o aumento da quantidade de água. O sistema permanece transparente quando a quantidade de gelatina aumenta proporcionalmente à quantidade de água. O sistema perde a transparência quando a concentração de gelatina é mantida constante ao mesmo tempo em que se aumenta a concentração de água.

Quando a quantidade de gelatina é superior a 7,0%, o sistema fica equilibrado, mesmo com o aumento de água (W_0 variando de 83 a 105). O sistema só sai de equilíbrio novamente quando a quantidade de gelatina ultrapassa 8,0%, numa faixa de W_0 entre 100 e 105, sendo que o gel torna-se levemente opaco.

A transição da região V (gel levemente opaco) para a região VI (gel opaco) ocorre, principalmente, com o aumento da quantidade de gelatina. Porém, em um pequeno segmento do diagrama (quando W_0 está situado entre 101 a 103) o grau de hidratação do sistema também determina a transição da região V para a região VI.

3.1.4. Análise Comparativa

O diagrama de fases varia de um solvente para outro. Na literatura, o diagrama de fases do iso-octano mostra-se consideravelmente diferente do diagrama de ciclo-hexano aqui apresentado.

Haering e Luisi [49] mostraram a existência de 4 regiões distintas nos seus experimentos (Figura 3.2).

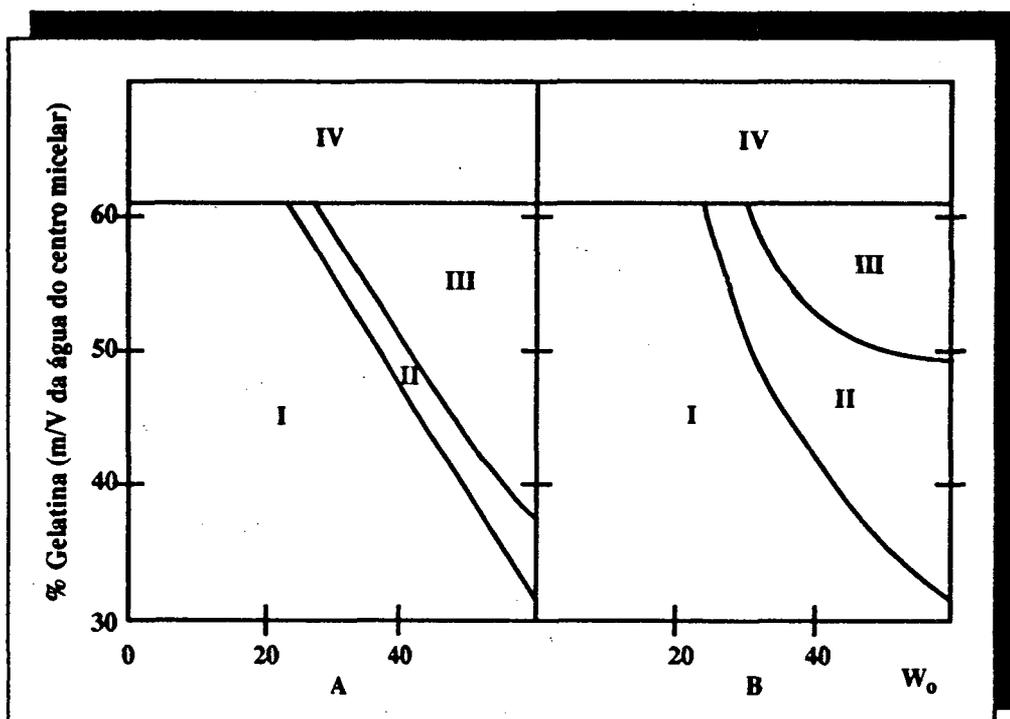


FIGURA 3.2 - Diagrama de fases do sistema de organo-gel em iso-octano, com (A) 0,1 M e (B) 0,14 M AOT. Regiões: (I) solução micelar líquida; (II) gel transparente; (III) separação de fase (o solvente separa-se do gel); (IV) separação de fase (o solvente separa-se da gelatina sólida) [49].

A distribuição das diversas regiões do organo-gel de iso-octano é muito diferente das regiões do organo-gel de ciclo-hexano. O gel transparente de ciclo-hexano forma-se numa quantidade mínima de 6,2% de gelatina e $W_0 = 55$, sendo que o gel transparente de iso-octano forma-se numa quantidade mínima de 6,5% de gelatina e $W_0 = 25$, ambos sujeitos a um sistema com concentração de AOT = 0,1 M. Como a

concentração de gelatina não se apresenta muito diferente, a gelificação dos dois sistemas está mais relacionada com a sua composição em água e solvente orgânico. Assim, para gelificar-se, o organo-gel de ciclo-hexano necessita de mais água e, conseqüentemente, menos solvente do que o organo-gel de iso-octano.

O diagrama de fases do iso-octano cobre uma faixa de valores de percentual de W_0 menores do que as apresentadas no diagrama de fases do ciclo-hexano. Isso pode explicar o fato das regiões V e VI não aparecerem no diagrama do iso-octano de Haering e Luisi [49].

Quellet e Eicke [50] publicaram um diagrama de fase do organo-gel de iso-octano com concentração de AOT = 0,1 M e $W_0 = 60$ no qual, conforme a quantidade de gelatina progressivamente aumentava, o sistema ia passando pelas seguintes fases:

- I. Solução micelar líquida transparente (com concentração de gelatina até 2,5%);
- II. Região de transição onde agregados macroscópicos gelificados coexistem com o solvente (concentração de gelatina entre 2,5 e 2,6%);
- III. Gel sólido transparente (concentração de gelatina de 2,6 a 3,6%);
- IV. Região de separação de fase com o solvente separando-se do gel (quando a concentração de gelatina é superior a 3,6%).

Porém, Quellet [50] não deixa clara se a região de transição II é equivalente a qualquer uma das regiões de instabilidade do sistema de ciclo-hexano (i. e., regiões I, II, V e VI).

Nos dois diagramas de fase do sistema de iso-octano fica claro que, acima de uma certa quantidade de gelatina, o gel transparente passa a apresentar separação de solvente do gel, o que não ocorre no sistema de ciclo-hexano (para as condições e concentrações estudadas). No diagrama do ciclo-hexano, a região de separação do solvente do gel fica localizada antes da região de formação do gel.

No diagrama de Haering e Luisi [49], a partir de uma certa quantidade de gelatina (superior a 8,0% m/V do gel - que corresponde a 60% m/V da água do centro micelar - tanto com [AOT] = 0,1 M ou 0,14 M), ocorre a separação de fase da gelatina sólida, independentemente de W_0 . Isto não ocorre no diagrama de ciclo-hexano (ver item 3.1.1).

O diagrama de fase do sistema de organo-gel de hexano¹ também é distinto dos diagramas de ciclo-hexano e iso-octano.

A principal conclusão que pode ser deduzida dessas análises comparativas, até o momento, é de que cada solvente interage no sistema de organo-gel de uma forma peculiar às suas estrutura e propriedades físico-químicas. Isto fica bem evidente quando da preparação dos géis para serem utilizados em meios reacionais (item 2.3.2). Para poder ser cortado e permanecer sem alteração quando em meio reacional, o gel precisa apresentar boa consistência. A consistência do gel depende das proporções dos seus componentes. Para se poder estudar os diversos géis em reações, alguns de seus componentes foram mantidos constantes, como a concentração de gelatina a 1,4 g/10 ml de gel e a concentração de AOT = 0,2 M (com exceção do organo-gel de ciclo-hexano, onde [AOT] = 0,15 M). A consistência adequada foi obtida variando-se a quantidade de água, que é proporcional aos valores de W_0 .

Assim, os géis de hexano, octano e iso-octano obtiveram uma boa consistência, a um $W_0 = 59,72$. O géis de heptano e ciclo-hexano, por sua vez, apresentaram boa consistência a $W_0 = 55,55$ e $W_0 = 92,59$, respectivamente. O organo-gel de xileno, mesmo em $W_0 = 50$, não apresentou consistência adequada para ser cortado e utilizado em reações.

Neste ponto, uma vez mais se manifesta o fenômeno no qual, para uma concentração determinada de gelatina e concentrações de AOT não muito diferentes, o organo-gel de ciclo-hexano possui características similares às dos demais organo-géis em faixas de W_0 muito diferentes.

Dois aspectos importantes foram observados, como conclusão do experimento e das análises feitas até então. Primeiro, a formação do gel depende do ajustamento das quantidades de seus componentes, a saber: água, surfactante, solvente (óleo) e gelatina. Segundo, as condições de equilíbrio entre esses componentes variam de um solvente para outro.

Todas as avaliações apresentadas nos itens 3.1.1 a 3.1.3 são baseadas apenas na

1. O diagrama de fase do sistema de organo-gel com hexano é estudado no trabalho de tese de mestrado de Roberto Dalla Vecchia.

estrutura macroscópica do sistema. Para uma avaliação da estrutura microscópica ou molecular, experimentos físico-químicos como RNM, espalhamento de luz, SANS, dentre outros, se fazem necessários. Contudo, tais experimentos transcendem o escopo do presente trabalho.

A título de ilustração a seguir é apresentado um exemplo da literatura no qual a análise do diagrama de fases do ciclo-hexano poderia ter complementado os resultados obtidos e, conseqüentemente, levado a conclusões mais completas.

Atkinson, no seu trabalho mais recente [60] fez um estudo comparativo da estabilidade térmica de sistemas de microemulsão de n-heptano com ou sem gelatina. Atkinson resolveu, então, substituir o n-heptano por ciclo-hexano, já que este último pode formar sistema de microemulsão estável a temperaturas superiores ao sistema de microemulsão de n-heptano. O objetivo dessa substituição foi o de analisar o comportamento dos dois sistemas a diferentes temperaturas, quando da adição de gelatina. Porém, as análises não puderam ser realizadas pois, segundo Atkinson, “o gel não pode ser formado” com o ciclo-hexano e que “o sistema permanece como um fluido de baixa viscosidade em toda a faixa de W_o ” utilizado (W_o variou de 40 a 100).

Na realidade o organo-gel de ciclo-hexano não poderia ter se formado devido às condições que Atkinson utilizou para preparar o gel, pois a quantidade máxima de gelatina utilizada não ultrapassou 3,5% (m/V). A partir do diagrama de fases do ciclo-hexano (Figura 3.1) fica claro que a quantidade mínima necessária para a formação do gel transparente é em torno de 6,2% (m/V).

Atkinson poderia ter obtido resultados que permitissem a análise comparativa dos dois sistemas caso tivesse utilizado níveis de concentração de gelatina compatíveis à gelificação de ambos.

A partir do trabalho de Atkinson pode-se também conjecturar a existência de uma relação direta entre a quantidade de gelatina necessária para gelificar o sistema e o “limite superior de temperatura de fase da microemulsão”¹. Assim, o sistema de microemulsão de ciclo-hexano, que possui um “limite superior de temperatura de fase”

1. “limite superior de temperatura de fase da microemulsão” (“Upper temperature phase boundary”) é o limite de temperatura na qual o número de fases da microemulsão passa de um para dois.

à uma temperatura maior do que o sistema com n-heptano, requer mais gelatina para formar o organo-gel. Porém, experimentos adicionais são necessários para se verificar esta suposição.

3.2. ESTABILIDADE TÉRMICA DO ORGANO-GEL

Os resultados quanto à estabilidade térmica do organo-gel de ciclo-hexano estão apresentados na Tabela 3.1.

O sistema de organo-gel de ciclo-hexano apresenta-se como um sistema termicamente reversível, similarmente ao sistema de organo-gel de iso-octano [49]. Isto é, quando o sistema de organo-gel de ciclo-hexano é aquecido a temperaturas superiores a 30 °C, ocorre a liquefação do sistema, sendo que o tempo de liquefação é proporcional à quantidade de gelatina do sistema. O sistema volta às suas características iniciais quando o mesmo é deixado resfriar à temperatura ambiente. Nesta fase de regelificação, a agitação vigorosa do sistema é imperativa para que o mesmo não sofra a separação de fase. Isto é, certo volume de solvente se separa do gel, formando assim um sistema com duas fases.

% Gelatina (m/V)	W_0	Número de Liquefações	Aparência Macroscópica
6,2	72,2	12	não modificada
8,0	72,2	5	não modificada
9,0	61,1	5	não modificada

TABELA 3.1. Estabilidade térmica do organo-gel. Organo-gel de ciclo-hexano com concentração de AOT 0,1 M e temperatura de liquefação 55°C.

A reversibilidade do sistema não depende da quantidade da gelatina nem do valor de W_0 . Qualquer gel pode ser redissolvido e regelificado inúmeras vezes. O única restrição que deve ser observada consiste em manter-se o frasco que o contém hermeticamente lacrado durante os procedimentos, evitando-se assim a evaporação do solvente e da água.

A título de ilustração, no contexto do experimento, o gel com 6,2% de gelatina e $W_0 = 72,2$ foi gelificado e colocado em um "freezer" por 24 horas. Decorrido este período, o gel foi submetido à liquefação a 55 °C. Mesmo nessas condições, nenhuma

mudança no aspecto macroscópico do gel foi observada após a regelificação do sistema.

O gel pode ser estocado por vários meses em “freezer” e descongelado alguns minutos antes de ser utilizado em reações. Para a maioria das reações realizadas neste trabalho foram utilizados géis que permaneceram até seis meses estocados em “freezer”. O aspecto macroscópico dos géis, bem como a atividade da enzima neles contida, não se mostraram diferentes das dos géis recém preparados.

Quando o gel puro é armazenado em frasco hermeticamente lacrado, evitando assim a evaporação de seus componentes, este pode permanecer à temperatura ambiente por vários meses sem que o mesmo apresente danos à sua estrutura macroscópica.

Quando o gel seccionado é armazenado em solvente apropriado (ver Tabela 3.3) e em frasco hermeticamente lacrado, este pode permanecer até doze meses à temperatura ambiente, sem apresentar mudanças na sua estrutura (ver item 3.5).

Concluindo-se, o gel pode ser redissolvido tantas vezes quantas forem necessárias. Isto é particularmente útil especialmente se na primeira gelificação o sistema não tenha ficado bem homogêneo. O gel pode ser estocado à temperatura ambiente ou até $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, de acordo com as necessidades e características da enzima empregada.

3.3. MEDIDAS DO pH DE ORGANO-GEL

Os resultados das medidas do pH do organo-gel de ciclo-hexano estão apresentados na Tabela 3.2.

% Gelatina (m/V)	W_0	pH
6,4	62	4,8
8,5	50	5,2

TABELA 3.2. Medidas de pH do organo-gel a 25°C .
Organo-gel de ciclo-hexano com concentração de AOT 0,1 M.

Estas medidas estão relacionadas com a solução micelar gelificada como um

todo e não com o meio intra-micelar, dado que as medidas foram realizadas através da técnica direta com pHmetro de eletrodo combinado.

Os resultados mostram leituras que são interpretadas como sendo provenientes da dissolução da gelatina no sistema. O pH do ponto isoiónico¹ de uma solução de gelatina em água deionizada situa-se na faixa de 4,8 a 5,0, quando a gelatina é obtida por degradação alcalina do colágeno [88].

Pode-se observar também que os valores de pH não variam muito com a variação da concentração da gelatina no sistema.

O pH do meio intra-micelar não pode ser medido diretamente [78]. Para se poder relacionar as medidas previamente relatadas com o micro-meio intra-micelar onde a enzima esta situada, algumas inferências sobre os dados relatados na literatura fizeram-se necessárias.

Martinek [34], utilizando substâncias indicadoras e comparando suas medidas de pKa quando dissolvidas em água pura e quando solubilizadas em micelas reversas, chegou aos seguintes resultados: o micro-meio intra-micelar é geralmente mais ácido do que a solução aquosa inicial, no caso de um surfactante aniônico, e mais alcalino, no caso do surfactante catiônico. Os valores de pH variam entre 1 a 2 unidades. Quando um surfactante não iônico é utilizado, o pH não varia muito em relação àquele da solução aquosa inicial.

Assim, se o sistema de organo-gel for analisado segundo os dois modelos de estrutura propostos por Quillet e Atkinson, os resultados de pH do micro-meio intra-micelar serão diferentes.

De acordo com o modelo de Quillet, o pH do meio intra-micelar estaria mais próximo do pH da solução da gelatina. Isto se deve ao fato de que este modelo prevê a dissolução da gelatina dentro das micelas.

De acordo com o modelo de Atkinson, o pH do meio intra-micelar estaria mais próximo do pH da água utilizada na preparação do meio. Neste caso, não há a contribuição da gelatina, porque a mesma não se encontra dissolvida no interior das micelas.

Em todo o caso, para qualquer um dos modelos, o pH do micro-meio intra-

1. Ponto isoiónico: pH onde o número de H⁺ removidos da molécula por dissociação é igual à carga total dos grupos ionizados da proteína naquele pH [88].

micelar seria mais ácido do que as soluções iniciais de água e gelatina (modelo Quillet) ou somente de água (modelo Atkinson), porque o surfactante AOT utilizado na preparação do organo-gel é um surfactante aniônico.

3.4. ESTABILIDADE DO ORGANO-GEL FRENTE A SUBSTRATOS E SOLVENTES

Este experimento objetiva verificar a estabilidade do sistema de organo-gel de ciclo-hexano frente a cada um dos componentes do meio reacional. Para isso, o gel foi colocado em contato com diversos solventes, ácidos, álcoois, tióis e algumas aminas. Em cada uma das situações, os testes foram realizados com os substratos dissolvidos em ciclo-hexano. Após 24 horas de contato dos substratos e/ou solventes com o gel, o sistema foi avaliado visualmente. Os resultados das avaliações estão descritos na Tabela 3.3.

Este experimento é de vital importância para se estabelecer de imediato os solventes e substratos que causam danos ao gel, evitando-se assim transtornos futuros quando da preparação do meio reacional. O gel utilizado neste experimento não continha enzima, com o intuito de se evitar o desperdício da mesma.

Os resultados da ação das substâncias sobre o gel foram associados com o coeficiente de partição ($\log P$) das mesmas. Este coeficiente é um indicador da hidrofobicidade das substâncias. Como a hidrofobicidade está relacionada com a polaridade, pode-se assumir $\log P$ como a medida quantitativa da polaridade [89].

Os resultados da Tabela 3.3 mostram que, de um modo geral, as substâncias com $\log P$ de valores muito baixos provocam alterações na estrutura do gel, independentemente da sua classificação como ácido, álcool ou solvente.

No caso dos solventes, observou-se que o gel foi destruído quando $\log P$ era menor ou igual a -1,30 e que, acima deste valor o gel fica opaco. O gel permanece inalterado quando $\log P$ atinge o valor 0,60. Alguns solventes, como é o caso do benzeno, tolueno e tetracloreto de carbono tornaram o gel opaco, mesmo tendo $\log P$ entre 2,00 e 3,00. Nenhuma hipótese foi formulada até o momento para explicar este fato.

Substância	log P	Aspecto Macroscópico do Gel
SOLVENTES		
água	-	destrói o gel
dimetilsulfóxido*	-1,30	destrói o gel
1,4-dioxano*	-1,10	opaco
dimetilformamida*	-1,00	opaco
acetona*	-0,23	opaco
acrilato de metila*	0,60	inalterado
éter etílico*	0,85	inalterado
acetofenona*	1,80	inalterado
clorofórmio*	2,00	inalterado
benzeno*	2,00	opaco
tolueno*	2,50	opaco
tetracloreto de carbono*	3,00	levemente opaco
xileno*	3,10	inalterado
ciclo-hexano*	3,20	inalterado
hexano*	3,50	inalterado
heptano*	4,00	inalterado
octano*	4,50	inalterado
iso-octano	4,51	inalterado
hexadecano*	8,80	inalterado
éter de petróleo*	-	levemente opaco
ÁCIDOS		
acético*	-0,23	destrói o gel
acrílico	0,21	destrói o gel
propiónico*	0,29	destrói o gel
butírico*	0,81	opaco
4-metil-valérico	1,50	inalterado
sórbico	1,69	inalterado
2-etil-hexanóico	2,88	inalterado
canforcarboxílico	3,09	inalterado
citronêlico	3,55	inalterado
láurico	4,95	inalterado
2(p-clorofenoxi)propiónico	5,90	inalterado
mirístico	5,99	inalterado

TABELA 3.3 - Teste de susceptibilidade do organo-gel frente a diversas substâncias químicas.

Substância	log P	Aspecto Macroscópico do Gel
palmítico	7,03	inalterado
olêico	7,70	inalterado
esteárico	8,07	inalterado
ÁLCOOIS		
etileno glicol	- 1,90	opaco
2-dimetilaminoetanol	- 1,11	opaco
metanol*	- 0,76	opaco
etanol*	- 0,24	opaco
n-propanol*	0,28	levemente opaco
3-dietilaminopropanol	0,45	opaco
n-butanol*	0,80	levemente opaco
n-pentanol*	1,30	inalterado
ciclo-hexanol*	1,50	inalterado
n-hexanol*	1,80	inalterado
mentol	1,89	inalterado
n-octanol*	2,90	inalterado
TIÓIS		
2-mercaptoetanol	- 0,43	inalterado
1,2-etanolditiol	1,04	inalterado
etanotiol	1,22	inalterado
1-propanotiol	1,74	inalterado
2-butanotiol	2,26	inalterado
tiofenol	2,46	inalterado
p-metil-tiofenol	3,16	inalterado
p-cloro-tiofenol	3,67	inalterado
1-dodecanotiol	6,41	inalterado
AMINAS		
benzilamina	1,70	inalterado
fetilamina	1,87	inalterado
dodecilamina	5,57	levemente opaco ^a

TABELA 3.3 - Teste de susceptibilidade do organo-gel frente a diversas substâncias químicas.

- * Valores de log P extraídos de [89]. Os demais valores de log P foram calculados a partir das constantes dos fragmentos hidrofóbicos, de acordo com o método de Rekker [90].
- ^a Este resultado se deve, provavelmente, à presença de água na dodecilamina utilizada.

Os ácidos tiveram um efeito mais drástico sobre o gel e o destruíram em log P menor ou igual a 0,29, o que não ocorreu com as demais classes de substâncias utilizadas. Contudo, os efeitos dos ácidos sobre a estrutura do gel foram ainda observados até log P igual a 81, região na qual o mesmo se apresentou opaco.

Os álcoois apresentaram efeitos mais suaves que os ácidos e os solventes, dado que não destruíram o gel mesmo para valores de log P até -1,90.

Os tióis, por sua vez, apresentaram efeitos ainda mais suaves que os álcoois. O gel permanece inalterado na presença de todos os tióis testados, mesmo em log P igual a - 0,43.

Das aminas testadas, somente a dodecilamina apresentou um efeito degenerativo sobre gel. Este resultado pode ser explicado pela ação da água que contaminava a dodecilamina, dado que este reagente estava sendo armazenado por um longo período de tempo e em condições não muito favoráveis.

Laane [89], estudando o efeito de solventes orgânicos em sistemas de biocatalisadores (enzimas), mostrou que a perda da atividade do biocatalisador estava relacionada com a capacidade do solvente perturbar a interação vital e delicada entre água e biocatalisador, através da penetração do solvente dentro da camada de água que estabiliza o biocatalisador ou por retirar esta camada de água.

A partir de seus resultados, Laane formulou as seguintes regras para biocatálise em solvente orgânico:

- I. Solventes que possuem log P inferior a 2 não são adequados para sistemas de biocatálise, porque eles perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando ou desnaturando o biocatalisador.
- II. Solventes que possuem log P entre 2 e 4 perturbam fracamente a interação água-biocatalisador e afetam a atividade do biocatalisador de maneira imprevisível.
- III. Solventes que possuem log P superior a 4 não perturbam a camada de água, deixando o biocatalisador no seu estado ativo.

Todas as informações acima podem servir de base para explicar a ação das substâncias (solventes, ácidos, álcoois) em destruir o gel ou torná-lo opaco.

A estrutura rígida do gel está associada à rede de moléculas de gelatina, que se forma após o resfriamento do sistema à temperatura ambiente.

A estrutura da rede de gelatina é estabilizada por uma camada de água no modelo de Atkinson [57]. No modelo de Quillet [50], a estabilização é devido à gelatina estar dissolvida em água no interior da micela.

A partir dos dados acima, pode-se formular a seguinte hipótese para explicar os efeitos causados ao gel pelas substâncias utilizadas neste trabalho. Possivelmente, as substâncias exercem uma ação sobre a estrutura da rede de gelatina similar àquela exercida sobre as enzimas quando estas são utilizadas em reações em solventes orgânicos. Isto é, a interação entre a água e a gelatina é perturbada, causando a desnaturação da proteína e, com isso, provocando a destruição da estrutura do gel quando esse efeito é máximo.

Percebe-se claramente que, conforme $\log P$ vai diminuindo, a ação sobre a estrutura do gel vai ficando cada vez mais pronunciada. O gel, que é normalmente transparente, vai se tornando gradativamente opaco na medida que $\log P$ diminui, até o mesmo se dissolver completamente. Isto mostra que há uma relação direta entre o aumento do efeito degenerativo e a diminuição de $\log P$.

Conclui-se então que para se ter êxito na confecção do meio reacional, e conseqüente utilização do organo-gel como meio biocatalisador, é necessário que se utilize solventes com $\log P$ maior ou igual a 0,60, ácidos com $\log P$ maior ou igual a 1,50, álcoois com $\log P$ maior ou igual a 1,30 e tióis com $\log P$ maior ou igual a - 0,43.

3.5. TESTE DE EFICIÊNCIA DA CV LIPASE

Para este experimento três tipos diferentes de géis de hexano foram utilizados, sendo que os resultados estão apresentados na Tabela 3.4.

Os géis foram preparados e utilizados em seguida nas reações de esterificação do ácido oléico com os seguintes álcoois: 1-butanol, 1-pentanol e 1-decanol. Após o término das mesmas, os géis foram armazenados em frascos hermeticamente lacrados com uma quantidade de solvente suficiente para cobrir todo o gel. Os géis assim permaneceram por aproximadamente 12 meses a temperatura ambiente. Após este período, novas reações foram executadas, utilizando-se os mesmos substratos

utilizados nas primeiras reações.

Álcool	Tempo de reação do gel recém preparado (dias)	Rendimento do gel recém preparado (%)	Tempo de reação do gel com 1 ano de preparo (dias)	Rendimento do gel com 1 ano de preparo (%)	Eficiência enzimática após 1 ano (%)
1-butanol	9	88 ^a	9	62	70
1-pentanol	13	85 ^b	15	68	80
1-decanol	9	87 ^a	8	76	87

TABELA 3.4 - Teste de eficiência da CV lipase em organo-gel.

As reações foram efetuadas com 10 ml de organo-gel de hexano seccionado em 30 ml de hexano contendo 0,01 mol de ácido oléico e 0,01 mol de álcool, apresentando [CV lipase] = 0,25 mg/ml do gel; [AOT] = 0,2 M e $W_o = 59,72$. As reações foram submetidas a uma temperatura de 25°C. As reações efetuadas com gel de um ano foram submetidas a agitação magnética suave.

- a Resultados cedidos por Paulo C. Jesus [91]
 b Resultados cedidos por Roberto Dalla Vecchia (tese de mestrado em andamento).

Decorrido o período em questão, os géis não apresentaram nenhuma modificação na estrutura macroscópica dos mesmos. Os solventes encontraram-se límpidos. A eficiência da CV lipase permaneceu entre 70 e 87% da eficiência inicial. Isso mostra que o sistema de organo-gel é muito estável, no que tange à conservação da eficiência enzimática, mesmo em um período de tempo prolongado e em condições de armazenamento à temperatura ambiente.

Outro aspecto importante observado foi que a eficiência catalítica da CV lipase, após 12 meses de armazenamento, é semelhante aos valores encontrados por Rees e Nascimento [80], quando da sua utilização em 15 reações consecutivas num período total de 30 dias. A reação utilizada neste experimento foi a de esterificação do ácido decanóico com o n-octanol em sistema de organo-gel em n-heptano a 25 °C. Após 30 dias, a eficiência catalítica da CV lipase foi de 75%, aproximadamente.

Quando a CV lipase foi utilizada em sistema de micela reversa [74], uma perda de 40% na sua eficiência foi observada, após 6 dias de incubação a 35 °C.

Outros métodos usando enzimas em síntese orgânica revelaram uma perda de eficiência similar, como é o caso da *Candida cylindracea* lipase, imobilizada em sílica gel [13], onde 40% de sua eficiência é perdida após 24 dias de uso. Esta mesma enzima, quando utilizada em sistema bifásico [6], perde 10% da sua eficiência a cada reação

executada.

Concluindo-se, o sistema de organo-gel é um sistema que mantém a eficiência da enzima em valores superiores a outros sistemas e por intervalos de tempo também superiores.

3.6. RETENÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO NO ORGANO-GEL

Após o término das reações, o solvente foi decantado e o gel foi lavado com solvente puro, para se retirar os substratos e produtos remanescentes ao redor das secções do gel. O gel, assim limpo, pode ser reutilizado em mais reações. Esta é mais uma das características importantes deste sistema: ser reutilizado inúmeras vezes. Entretanto, para que isso possa ser feito, o gel deve ser deixado imerso em solvente até o momento da sua posterior utilização.

Numa investigação do solvente no qual o gel ficou armazenado, notou-se a existência de traços de substratos e, principalmente, de uma quantidade apreciável de produto. Como o gel tinha sido lavado com o solvente, previamente ao seu armazenamento, a conclusão a que se chegou é que as substâncias encontradas no solvente de armazenamento foram liberadas pelo gel.

Para se determinar a quantidade de produto que fica retida no gel, procedeu-se a sua extração. A extração do produto foi completada em um período de 24 horas. Durante este período, o gel foi deixado em contato com o solvente puro, e este foi trocado 4 ou 5 vezes até o produto não ser mais detectado no seu conteúdo.

Os resultados da Tabela 3.5 mostram que uma quantidade considerável de produtos fica retida no gel após a reação. A difusão do produto de dentro do gel para o solvente do meio reacional não é total. Certa quantidade de produto fica retida na estrutura do gel, mais provavelmente na camada da interfase da micela reversa (camada de AOT), onde a reação é catalisada pela CV lipase. A retenção do produto pode ser explicada como sendo o resultado de um equilíbrio da partição do produto entre a camada do surfactante e o solvente.

Para que todo o produto possa ser removido do gel, a extração com o solvente puro deve ser realizada logo após o término da reação. A extração do produto do gel se

faz necessária para se evitar perdas no rendimento da reação e contaminações das reações subsequentes.

Álcool	Solvente da Reação	Tempo de Reação	Número de Extrações	Rendimento Inicial (%)	Produto Retido no Gel (%)	Rendimento Total (%)
1-pentanol	ciclo-hexano	10 h	4	79	9	88
1-decanol	hexano	8 dias	5	65	11	76

TABELA 3.5 - Retenção do produto da reação no organo-gel.

As reações foram efetuadas com 10 ml de organo-gel de hexano seccionado em 30 ml de solvente contendo 0,01 mol de ácido olêico e 0,01 mol de álcool, apresentando $[CV \text{ lipase}] = 0,25 \text{ mg/ml}$ do gel; $[AOT] = 0,2 \text{ M}$ e $W_o = 59,72$. As reações foram submetidas a agitação magnética suave a 25°C . A extração foi realizada com o mesmo solvente da reação. O gel ficou em contato com o solvente sobre agitação magnética até a extração se completar (período de 24 horas).

Todas as reações apresentadas neste trabalho foram realizadas com o gel rigorosamente isento de remanescentes de reações anteriores. Usando-se para isso o método de extração descrito acima.

3.7. REAÇÕES

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados obtidos das reações catalisadas pela CV lipase em sistema de organo-gel de ciclo-hexano.

Primeiramente, serão abordadas as reações de esterificação entre o 1-pentanol e diversos ácidos de cadeias lineares longas, onde será estudada a eficiência da reação de esterificação com relação ao número de carbonos da cadeia do ácido utilizado. Alguns comentários sobre a eficiência das reações de esterificação, utilizando ácidos de cadeias ramificadas e cadeias insaturadas, também serão encontradas neste ítem.

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nas reações de esterificação do ácido olêico com diversos tióis. Nesta parte serão desenvolvidas análises comparativas entre a eficiência das reações de esterificação descritas na literatura utilizando álcoois e a das reações com os tióis apresentadas neste trabalho.

Por último, os resultados das reações de síntese de amidas serão apresentados e discutidos. Análises comparativas entre a eficiência destas reações e das reações

descritas na literatura serão desenvolvidas para se determinar o melhor método de síntese de amida, através da acilação enzimática de aminas.

3.7.1. Síntese de Ésteres a partir de Diversos Ácidos

Uma variedade de ésteres utilizando-se ácidos com cadeias variando de 12 a 18 carbonos foi sintetizada pela primeira vez em sistema de organo-gel, com o propósito de se identificar o melhor substrato para a enzima CV lipase.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.6. Estes resultados mostram que a CV lipase catalisa a esterificação de ácidos de cadeias longas com bons rendimentos, e que o melhor substrato foi o ácido láurico.

Ácido	Produto	Rendimento (%)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}$	90
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}$	85
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}$	83
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}$	79
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}$	71
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}$	26
$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}^a$	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}$	7

TABELA 3.6 - Síntese de éster catalisada pela CV lipase com diferentes ácidos e 1-pentanol

As reações foram efetuadas com 10 ml de organo-gel de ciclo-hexano seccionado em 30 ml de ciclo-hexano contendo 0,01 mol de cada substrato, apresentando [CV lipase] = 0,25 mg/ml do gel; [AOT] = 0,15 M e $W_o = 92,59$. As reações foram submetidas a agitação magnética suave, sendo o tempo de reação de 24h a 25°C.

- ^a Solvente = éter etílico.

Uma análise comparativa destes resultados em reações de esterificação foi desenvolvida utilizando-se os resultados da hidrólise catalisada pela CV lipase de um trabalho feito por Sugiura [93] em 1975. A Figura 3.3 mostra o perfil do desempenho da CV lipase em ambas as reações. É interessante ressaltar a mudança de especificidade em relação ao substrato, de acordo com o caminho da reação (síntese ou hidrólise de ésteres). A reação de hidrólise de ésteres é feita em sistema de emulsão e o melhor substrato é o éster proveniente do ácido palmítico. A reação de hidrólise

mostra que a velocidade da reação é proporcional ao número de carbonos. Esta apresenta o seu máximo no ácido palmítico, caindo drasticamente com o aumento da cadeia no ácido esteárico que, aliás, tem o menor valor de todos os demais ácidos.

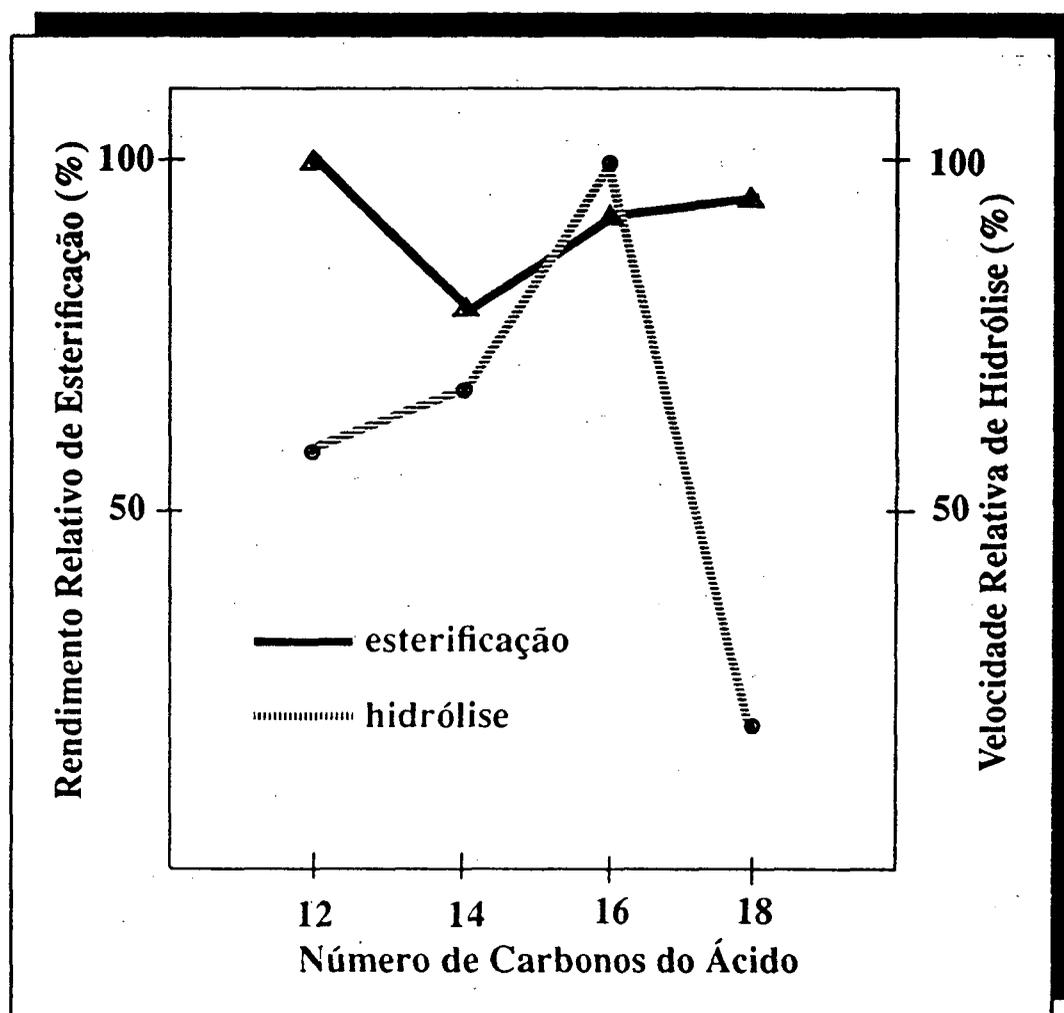


FIGURA 3.3 - Comparação entre ácidos lineares como substratos para reações de esterificação e hidrólise catalisadas pela CV lipase

- **esterificação:** CV lipase imobilizada em organo-gel de ciclo-hexano incubada por 24 horas a 25°C com ácidos e 1-pentanol em ciclo-hexano. O rendimento da esterificação foi expresso como o rendimento relativo (%) do rendimento do laurato de pentila (90%).
- **hidrólise:** emulsão (solução aquosa de polivinil álcool a 2%) de metil éster incubada com CV lipase a 37 °C por 20 minutos. A velocidade de hidrólise foi expressa como velocidade relativa (%) da velocidade do palmitato de metila (800 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) [92].

Na reação de esterificação, contudo, o melhor substrato é o ácido láurico, sendo que seus resultados mostram-se opostos aos da reação de hidrólise.

Como os dois tipos de reações foram executadas pela mesma enzima, esperava-se que a diferença de especificidade estivesse relacionada com a diferença no meio reacional dos dois sistemas. Porém, isso não foi observado. Na reação de hidrólise, o meio é uma emulsão aquosa. Esperava-se que os substratos de cadeias mais curtas fossem mais disponíveis à catálise enzimática. O oposto poderia ser esperado na reação de esterificação em meio de solvente orgânico apolar, onde os substratos de cadeias longas seriam mais disponíveis à catálise.

Porém, como o meio reacional do sistema de organo-gel é muito mais complexo do que um meio contendo somente solvente orgânico, dados referentes apenas à solubilidade do substrato em solvente orgânico não são suficientes para explicar completamente a seletividade da reação.

Em 1987, Laane [89] publicou um trabalho relacionando o coeficiente de partição ($\log P$) com a atividade de biocatalisadores em solvente orgânico. Neste trabalho, o autor mostra que $\log P$ é um indicador mais adequado do que o momento de dipolo (D) e a constante dielétrica (ϵ) para a medida da polaridade, quando correlacionado com a atividade dos biocatalisadores.

Pode-se aplicar os dados relacionados a $\log P$ mesmo em sistemas complexos como micelas reversas, bastando para isso correlacionar os dados de $\log P$ dos substratos ($\log P_s$), dos produtos ($\log P_p$), da interfase ($\log P_i$) e da fase orgânica contínua ($\log P_{sol}$). As correlações são as seguintes:

- I. $|\log P_i - \log P_s|$ deve ser mínimo para se ter uma alta concentração do substrato na interfase e, conseqüentemente, a sua catálise.
- II. $|\log P_{sol} - \log P_s|$ deve ser máximo para manter a concentração do substrato na fase orgânica baixa.
- III. $|\log P_i - \log P_p|$ deve ser máximo e $|\log P_{sol} - \log P_p|$ deve ser mínimo para que o produto passe imediatamente para a fase orgânica após a sua formação.

Estes valores estão relacionados com o coeficiente de partição do substrato e do produto nas diferentes fases do sistema, ou seja, na camada da interfase (surfactante)

ou no meio orgânico (solvente) que contém as micelas.

A partir dessas informações, calculou-se a correlação entre $\log P$ dos diversos componentes do sistema reacional utilizado na reação de esterificação entre o 1-pentanol e os ácidos de cadeia normal. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.7.

Ácido	$\log P$	$ \log P_i - \log P_s $	$ \log P_{sol} - \log P_s $	$ \log P_i - \log P_p $	$ \log P_{sol} - \log P_p $
láurico (C ₁₂)	4,95	0,68	1,75	3,14	4,21
mirístico (C ₁₄)	5,99	1,72	2,79	4,18	5,25
palmítico (C ₁₆)	7,03	2,76	3,83	5,22	6,29
esteárico (C ₁₈)	8,07	3,80	4,87	6,26	7,33

TABELA 3.7 - Correlação entre $\log P$ dos diversos componentes do sistema reacional, utilizado para a síntese de ésteres, a partir do 1-pentanol e de diversos ácidos de cadeia normal

- $\log P_i$ é o $\log P$ da interface que, neste caso, é o $\log P$ do AOT é aproximadamente 4,27.
- $\log P_{sol}$ é o $\log P$ do solvente, isto é, $\log P$ do ciclo-hexano é igual a 3,20.
- $\log P_p$ é o $\log P$ do produto formado na reação ($\log P_{pC12} = 7,41$; $\log P_{pC14} = 8,45$; $\log P_{pC16} = 9,49$, $\log P_{pC18} = 10,53$).

Pode-se observar que o ácido láurico é o melhor substrato, pois este possui o menor valor de $|\log P_i - \log P_s|$. Isto indica que este é o substrato que atinge a maior concentração na interfase da micela e, conseqüentemente, é catalisado mais rapidamente que os demais substratos. Além disso, o ácido láurico possui também o menor valor de $|\log P_{sol} - \log P_p|$. Em conseqüência, o seu produto passa mais rapidamente para a fase orgânica após a sua formação do que os produtos formados pelos demais substratos.

A explicação para a catálise do ácido esteárico ser mais rápida do que a dos ácidos mirístico e palmítico reside no fato de que o mesmo possui o maiores valores para $|\log P_{sol} - \log P_s|$ e $|\log P_i - \log P_p|$. Estes valores estão associados, respectivamente, com a baixa concentração do substrato na fase orgânica e a passagem rápida do produto para a fase orgânica, ao final da reação.

Outro dado interessante pode ser observado quando os resultados da reação de esterificação catalisada pela CV lipase em sistema de organo-gel são comparados com os resultados de reações de esterificação catalisadas por lipases de outras fontes, em meios reacionais diferentes. A Figura 3.4 mostra que o melhor substrato para a reação de esterificação é o ácido láurico, e que este resultado independe da fonte da lipase.

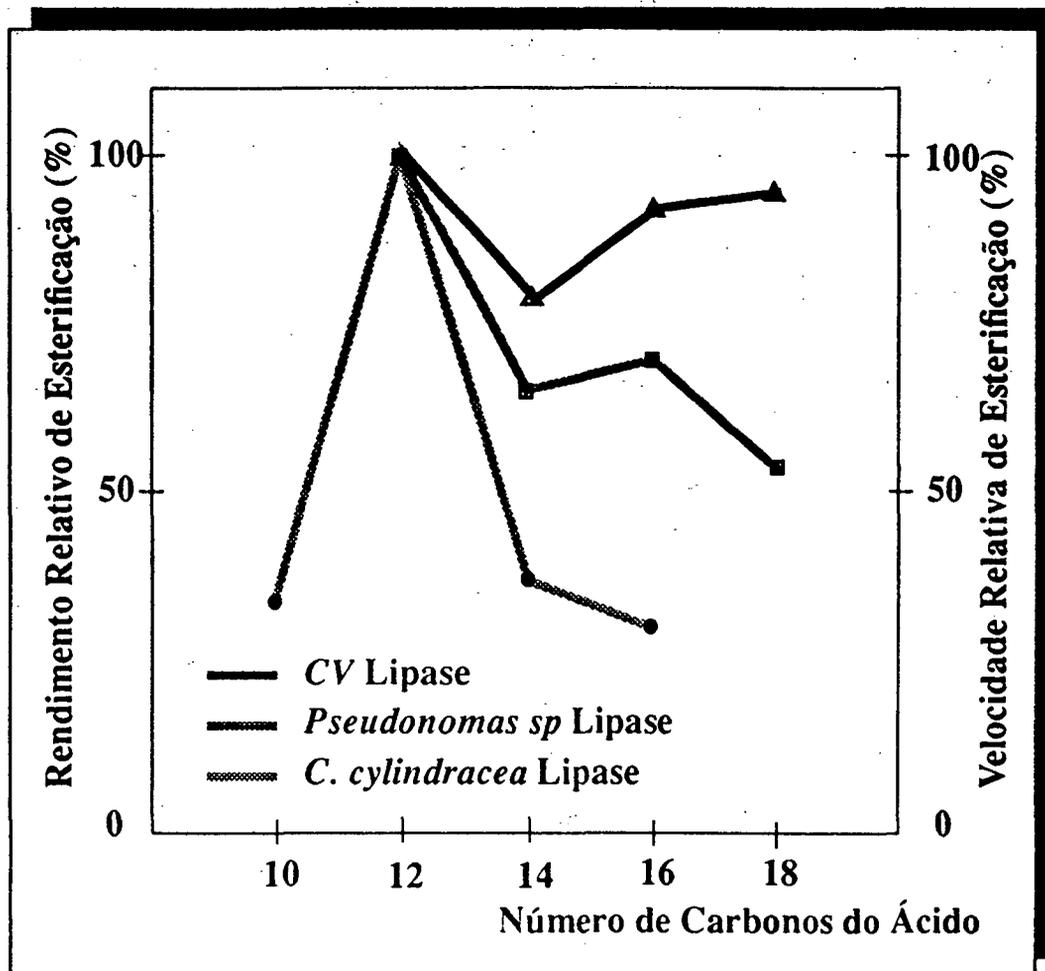


FIGURA 3.4 - Comparação entre ácidos lineares como substratos para reações de esterificação catalisada por três tipos de lipase

- CV lipase imobilizada em organo-gel de ciclo-hexano incubada por 24 horas a 25°C com ácidos e 1-pentanol em ciclo-hexano. O rendimento da esterificação foi expresso como o rendimento relativo (%) do rendimento do laurato de pentila (90%).
- *Pseudomonas sp.* lipase: (+/-) mentol e ácidos foram adicionados ao caldo de cultura da *Pseudomonas sp.* e a mistura foi agitada por 72 horas a 30°C. O produto foi extraído com n-hexano e purificado por cromatografia de coluna com sílica gel [84]. O rendimento de esterificação foi expresso como o rendimento relativo (%) do rendimento do laurato de mentila (53%).
- *Cândida cylindracea* lipase: esterificação do n-hexanol e ácidos em sistema de micela reversa de [AOT] = 0,1 M e iso-octano com $W_o = 11,1$ a 25°C. A velocidade de esterificação foi expressa como a velocidade relativa (%) da velocidade do laurato de hexila [78].

Rees e Nascimento [80] estudaram o comportamento de ácidos com cadeias ramificadas e cadeias cíclicas, em reações de esterificação catalisada pela CV lipase, em sistema de organo-gel de n-heptano. Seus resultados mostram que os ácidos ramificados ou cíclicos sofrem esterificação em velocidade muito mais lenta que a velocidade de esterificação dos ácidos lineares.

No presente trabalho o mesmo efeito foi observado quando da utilização do ácido 4-metil-pentanóico em sistema de organo-gel de ciclo-hexano. A eficiência desta reação de esterificação foi de apenas 26% em 24 horas de incubação, resultado este que é muito semelhante ao encontrado no sistema de organo-gel de n-heptano [80]. A redução da atividade enzimática causada por esses substratos de cadeia ramificada é, muito provavelmente, devido a problemas de acomodação dessas moléculas no sítio ativo da enzima.

Outro aspecto que foi observado, quando da realização das reações de esterificação, foi que um ácido linear com apenas uma insaturação na cadeia carbônica, como o ácido olêico, é um bom substrato para a CV lipase. Este resultado pode ser comparado com os resultados obtidos por Rees e Nascimento [80], quando da utilização de álcoois com uma insaturação na cadeia carbônica. Os resultados obtidos com estes álcoois insaturados não foram diferentes dos obtidos com álcoois de cadeia normal. Adicionalmente, tanto a forma *cis* quanto a forma *trans* possui a mesma eficiência nas reações de esterificação catalisadas pela CV lipase.

Entretanto, quando da utilização de ácido linear com duas insaturações na cadeia, este trabalho mostra uma acentuada queda na eficiência da reação de esterificação. O rendimento da reação de esterificação do ácido sórbico foi de somente 7%.

Nesta reação, o éter etílico foi utilizado como solvente devido a restrições de solubilidade do ácido sórbico. As restrições de solubilidade dos substratos ou produtos implicam na utilização de solventes apropriados para cada composto. Porém, a utilização de diferentes solventes provoca alterações nos rendimentos das reações realizadas em síntese enzimática em sistema de organo-gel. O efeito do solvente na reação de esterificação catalisada pela CV lipase é discutido no Ítem 3.8 deste Capítulo.

Entretanto, pode-se antecipar que há uma queda de 52% no rendimento da reação de esterificação entre o ácido olêico e 1-pentanol, quando o n-octano é substituído pelo éter etílico. A queda do rendimento da reação do ácido sórbico (cadeia com duas

ligações duplas) comparada com a do ácido láurico (cadeia saturada) foi de 92%. Comparando-se as quedas de rendimento obtidas nestas reações, observa-se que além do efeito do solvente (52%) existe uma contribuição adicional (40%) devida, provavelmente, à estrutura do ácido. Ou seja, a queda no rendimento é causada pela ação combinada dos efeitos do solvente e da estrutura do ácido sórbico.

Com relação à estrutura do ácido sórbico, dois fatos podem estar ocorrendo:

- I. O impedimento estérico, causado pelo fato do volume da molécula com duas insaturações ser, como um todo, muito maior que o volume da molécula que possui somente uma insaturação (principalmente porque o ácido sórbico possui configuração *trans, trans*);
- II. A insaturação no ácido sórbico estar mais perto da carbonila, exercendo assim um impedimento estérico muito maior do que no caso do ácido oléico. Este último possui a insaturação entre os carbonos nove e dez que é muito distante da carbonila. Em consequência, ele pode estar sendo "visto" pela enzima como um ácido de cadeia normal, pois esta parte da molécula não interage no sítio ativo da mesma, como acontece com os ácidos com ramificações em carbonos muito afastados da carbonila.

As considerações acima referem-se unicamente ao efeito da estrutura do substrato no rendimento da reação. Contudo, é importante salientar que os efeitos observados são resultantes da ação combinada da estrutura do substrato e do efeito solvente.

3.7.2. Síntese de Tioésteres a partir de Diversos Tióis

Os tióis são substâncias de grande importância na síntese orgânica, porque são reagentes ideais para a preparação de novos compostos que necessitem conter átomos de enxofre. Recentemente, o interesse pelos tioésteres vem aumentando, especialmente no caso dos acetil tioésteres porque essas substâncias são intermediárias na síntese de agentes anti-hipertensivos e outras drogas de interesse clínico [26].

Uma variedade de tioésteres foram sintetizados pela primeira vez neste trabalho em sistema de organo-gel, com o propósito de se verificar a atividade catalítica da enzima CV lipase nessas reações.

Os resultados das sínteses de tioésteres estão apresentados na Tabela 3.8. Estes resultados mostram que a CV lipase catalisa as reações de esterificação entre o ácido oléico e os diversos tióis. Porém, os rendimentos destas reações são muito baixos quando comparados com as reações com álcoois. Além disso, o período de incubação das reações foi de 30 dias, período este muito longo quando comparado com as reações de esterificação comuns catalisadas pela CV lipase.

Tiol	Produto	Rendimento (%)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH=CH(CH}_2)_7\text{CH}_3$	34,0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{SH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH=CH(CH}_2)_7\text{CH}_3$	26,0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH(CH}_3)\text{SH}$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH(CH}_3)\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH=CH(CH}_2)_7\text{CH}_3$	10,0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH=CH(CH}_2)_7\text{CH}_3$	9,7
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-SH}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH=CH(CH}_2)_7\text{CH}_3$	9,0
$\text{p-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{SH}$	$\text{p-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH=CH(CH}_2)_7\text{CH}_3$	6,0
$\text{p-Cl-C}_6\text{H}_4\text{SH}$	$\text{p-Cl-C}_6\text{H}_4\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH=CH(CH}_2)_7\text{CH}_3$	5,0

TABELA 3.8 - Síntese de tioésteres catalisada pela CV lipase com diferentes tióis e ácido oléico.

As reações foram efetuadas com 10 ml de organo-gel de ciclo-hexano seccionado em 30 ml de ciclo-hexano contendo 0,01 mol de cada substrato, apresentando [CV lipase] = 0,25 mg/ml do gel; [AOT] = 0,15 M e $W_0 = 92,59$. As reações foram submetidas a agitação magnética suave, sendo o tempo de reação de 30 dias a 25°C.

A reação se mostra muito sensível a mudanças da estrutura da molécula do tiol. Desta forma, o encurtamento da cadeia carbônica, a presença do anel benzênico, e a existência do grupo SH em carbono secundário provocam uma diminuição no rendimento da reação.

Estes resultados quando analisados com resultados publicados por Rees e Nascimento [80] na utilização da enzima CV lipase em reações de esterificação entre o ácido decanóico e diversos álcoois, mostram que os tióis reagem de maneira semelhante aos álcoois em algumas circunstâncias.

As reações com tióis secundários, similarmente às com álcoois secundários, resultam numa diminuição no rendimento do produto, sendo que a queda no

rendimento da reação do tiol secundário é relativamente mais pronunciada que a do álcool secundário. De qualquer forma, a diminuição da atividade enzimática causada por esses substratos é, muito provavelmente, devido a problemas de acomodação dessas moléculas no sítio ativo da enzima.

As reações com o tiofenol e seus derivados apresentaram uma queda no rendimento dos produtos ainda maior do que no caso dos tióis secundários. Esta queda no rendimento dos tióis que contém o anel benzênico é comparável à diminuição no rendimento da reação do álcool ciclo-hexanol no trabalho de Rees. Em ambos os casos a presença do anel benzênico na molécula do tiol e a presença do ciclo na molécula do álcool devem provocar problemas de acomodação no sítio ativo da enzima, já que os volumes dessas moléculas são, sem dúvida, muito maiores que os volumes dos tióis e dos álcoois secundários.

O comportamento dos tióis de cadeia normal não encontra qualquer semelhança com o comportamento dos álcoois de cadeia normal. Há uma queda no rendimento da reação quando tióis com cadeias mais curtas são utilizados.

Estes resultados podem ser explicados da seguinte maneira. Quando se examina mais atentamente a correlação entre o $\log P$ dos substratos de cadeia normal com os diversos componentes do meio reacional, o que se observa é que o 1-dodecanotiol é sem dúvida o melhor substrato para esta síntese. Na Tabela 3.9 estão apresentados os dados das correlações de $\log P$ para os três tióis de cadeia normal utilizados na síntese de tioésteres em sistema de organo-gel de ciclo-hexano. Analisando-se esses dados, conclui-se que o 1-dodecanotiol é catalisado mais rapidamente porque ele mantém a sua concentração na interfase mais alta, já que possui o valor mais baixo para $|\log P_i - \log P_s|$. Isto significa que o 1-dodecanotiol tem uma afinidade muito maior para se solubilizar na interfase que os outros dois tióis.

Além disso, o 1-dodecanotiol possui o maior valor para $|\log P_{sol} - \log P_s|$, o que significa que a sua concentração na fase orgânica é mantida mais baixa que a dos outros dois tióis. Este comportamento só vem a aumentar o deslocamento do 1-dodecanotiol para a interfase, aumentando ainda mais a sua catálise.

Adicionalmente, o produto formado na reação do 1-dodecanotiol passa mais rapidamente para a fase orgânica, dado que o mesmo possui o maior de $|\log P_i - \log P_p|$. Este dado está relacionado com a maior afinidade do produto em se dissolver no meio

orgânico do que na interfase. Assim, a reação de esterificação deste substrato é deslocada para a formação do produto mais facilmente o que as reações do etanotiol e do propanotiol.

Substrato	$ \log P_i - \log P_s $	$ \log P_{sol} - \log P_s $	$ \log P_i - \log P_p $	$ \log P_{sol} - \log P_p $
etanotiol (C ₂)	3,05	1,98	3,44	4,51
propanotiol (C ₃)	2,53	1,46	3,96	5,03
dodecanotiol (C ₁₂)	2,14	3,21	8,63	9,70

TABELA 3.9 - Correlação entre log P dos diversos componentes do sistema reacional, utilizado para a síntese de tioésteres, a partir do ácido oléico e de diversos tióis de cadeia normal

- log P_i é aproximadamente 4,27.
- log P_{sol} é igual a 3,20.
- log P_p é o log P do produto formado na reação (log P_{pC2} = 7,71; log P_{pC3} = 8,23; log P_{pC12} = 12,90).

Algumas modificações no meio reacional foram realizadas com o intuito de melhorar a eficiência das reações, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.10. Uma melhoria significativa no rendimento da reação foi observada quando da substituição do ciclo-hexano pelo hexano como solvente do meio reacional. O rendimento do produto na reação com o 2-butanotiol passou de 10 para 51%. Este resultado pode ser explicado em função do log P do hexano ser superior ao do ciclo-hexano. De um modo geral, as reações de síntese enzimática em solvente orgânico são mais eficientes na medida em que log P aumenta (ver item 3.8).

Organo-gel	Solvente	Substrato	Rendimento (%)
ciclo-hexano	ciclo-hexano	2-butanotiol	10
ciclo-hexano ^a	hexano	2-butanotiol	51
ciclo-hexano	ciclo-hexano	1-propanotiol	26
hexano	hexano	1-propanotiol	21

TABELA 3.10 - Comparação entre a utilização do ciclo-hexano e do hexano como solvente na síntese de tioésteres.

As reações foram efetuadas com 10 ml de gel seccionado em 30 ml de solvente contendo 0,01 mol de cada substrato, apresentando [CV lipase] = 0,25 mg/ml do gel. Organo-gel de ciclo-hexano apresentando [AOT] = 0,15 M e W_o = 92,59. Organo-gel de hexano apresentando [AOT] = 0,20 M e W_o = 59,72. As reações foram submetidas a agitação magnética suave, sendo o tempo de reação de 30 dias a 25°C.

a Reação submetida a agitação em banho Dubnoff. Resultado cedido por Gelson Emerin Prudêncio (Estágio de Iniciação Científica em andamento).

Além disso, o valor de $|\log P_{sol} - \log P_s|$ para o hexano é maior que o valor para o ciclo-hexano (Tabela 3.11). Isto implica dizer que o substrato é mantido em concentração mais baixa no hexano, deslocando-se para a interfase, onde é catalisado, mais rapidamente do que quando o solvente é o ciclo-hexano.

O valor de $|\log P_{sol} - \log P_p|$ para o hexano é menor que o valor para o ciclo-hexano. Assim, o produto formado pela reação em hexano passa mais rapidamente para o solvente após a sua formação do que quando o solvente é o ciclo-hexano.

Quando da tentativa de se obter resultados superiores com a troca do solvente na execução do gel, a reação do 1-propanotiol não mostrou alterações significativas (Tabela 3.10). Nenhuma hipótese foi formulada até o momento para explicar este fato.

Solventes	$ \log P_{sol} - \log P_s $	$ \log P_{sol} - \log P_p $
hexano	1,24	5,60
ciclo-hexano	0,94	5,90

TABELA 3.11 - Correlação entre $\log P$ dos diversos componentes do sistema reacional, utilizado para a síntese de tioéster, a partir do 2-butanotiol e do ácido oléico.

$\log P_{hexano} = 3,50$; $\log P_{ciclo-hexano} = 3,20$;
 $\log P_{substrato} = 2,26$; $\log P_{produto} = 9,10$.

Avaliando-se os resultados obtidos neste item, percebe-se que o sistema de organo-gel é um bom meio para se proceder a síntese de tioésteres. Porém, a atividade da enzima CV lipase mostrou-se muito baixa para este tipo de síntese.

Bianchi [26], estudando reações de transesterificação com substratos que continham na mesma molécula os grupamentos éster e tioéster, observou que as lipases PPL (lipase pancreática suína) e LP (*Pseudomonas cepacea*) demonstraram alta quimioseletividade para o grupamento tioéster. Esta quimioseletividade estava relacionada tanto com tioésteres provenientes de tióis primários do que com tióis secundários. As reações de Bianchi foram realizadas em sistemas de enzimas em suspensão.

Com base nos resultados de Bianchi, propõe-se a utilização das enzimas PPL e LP em sínteses de tioésteres em sistema de organo-gel, visto que a atividade da CV lipase mostrou-se muito baixa para estes tipos de substratos.

3.7.3. Síntese de Amidas Através da Acilação Enzimática de Aminas

Algumas tentativas de síntese de amidas foram desenvolvidas utilizando CV lipase em sistema de organo-gel em ciclo-hexano, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.12. A eficiência das reações foi muito baixa, apresentando os valores de rendimentos dos produtos inferiores a 5%.

Amina	Produto	Rendimento (%)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2^a$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}-(\text{O}=\text{C})-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	inferior a 5
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{NH}_2^b$	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}-(\text{O}=\text{C})-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	inferior a 5
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{NH}_2^c$	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{N}-(\text{O}=\text{C})-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	inferior a 5

TABELA 3.12 - Síntese de amidas catalisada por CV lipase com diversas aminas e ácido olêico.

As reações foram efetuadas com 10 ml de organo-gel de ciclo-hexano seccionado em 30 ml de ciclo-hexano contendo 0,01 mol de cada substrato, apresentando [CV lipase] = 0,75 mg/ml do gel; [AOT] = 0,15 M e $W_o = 92,59$. As reações foram submetidas a agitação magnética suave a 25°C, com tempos de reação de 53^a, 50^b e 23^c dias, respectivamente.

Estes valores são estimativas, dado que nessas concentrações os produtos não puderam ser purificados pelos métodos utilizados nesse trabalho.

Estes resultados podem ser atribuídos à falta de eficiência da enzima CV lipase em catalisar as reações. Isto pode ser confirmado pelo trabalho de Kitaguchi [24], no qual várias lipases de diversas fontes foram utilizadas na síntese enantioselectiva de amidas, a partir da transesterificação do butirato de fluoretila com a α -metilbenzilamina. As reações foram efetuadas com suspensão de enzimas em vários solventes orgânicos. A lipase mais eficiente foi a PPL e a CV lipase foi a enzima que se mostrou a menos eficiente de todas as seis utilizadas.

Tuccio e colaboradores [28] realizaram sínteses de n-octil-alkilamidas catalisadas por várias lipases em meio orgânico, e os resultados foram de no máximo 50% no rendimento dos produtos, após uma semana de incubação da reação a 40 °C. A enzima mais eficiente foi a lipase proveniente do fungo *Rhizopus arrhizus*. As reações foram executadas em suspensão da enzima em n-hexano.

Como o sistema de organo-gel mostrou-se mais efetivo nas reações de esterificação comuns do que os sistemas em suspensão, propôs-se a sua utilização na síntese de amidas. Porém, conclui-se que outras enzimas devam ser utilizadas para a síntese de amidas, haja visto os resultados insatisfatórios obtidos com a CV lipase.

Como a utilização de outras enzimas não faz parte do escopo desse trabalho, ficam aqui registradas apenas as possíveis enzimas que possam ser utilizadas em síntese de amidas, quando imobilizadas em organo-gel, a saber: PPL, *Rhizopus arrhizus* lipase e Quimiotripsina. Esta última deve ser eficiente porque é uma protease e tem grande atividade em catalisar reações em substratos com grupos funcionais amida.

3.8. EFEITO DO SOLVENTE NA EFICIÊNCIA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELA CV LIPASE EM SISTEMA DE ORGANO-GEL

Os itens anteriores descreveram a utilização do sistema de organo-gel em reações de esterificação, nos aspectos concernentes ao gel propriamente dito e aos diversos substratos utilizados. Para concluir a abordagem do sistema de organo-gel em síntese orgânica, dados referentes à ação dos solventes na eficiência da reação serão aqui descritos.

Vários solventes foram utilizados com o propósito de estudar a eficiência da reação de esterificação entre o ácido olêico e o álcool 1-pentanol. A reação foi catalisada pela CV lipase imobilizada em organo-gel de ciclo-hexano. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3.13.

A partir destes dados pode-se observar uma grande variação na eficiência da reação. Os valores variaram de um máximo de 88% no rendimento do produto, quando o n-octano foi utilizado como solvente, até um valor de 7%, quando os solventes foram o xileno e o 1,4-dioxano.

Na tentativa de relacionar a eficiência da reação com a polaridade do solvente, vários indicadores, como o coeficiente de partição ($\log P$), a constante dielétrica (ϵ) e o momento de dipolo (D) foram utilizados. Estes indicadores estão listados na Tabela 3.14.

Não existe nenhuma correlação da eficiência da reação com os valores da constante dielétrica ou com os valores de momento de dipolo. Entretanto, existe uma correlação nítida entre os valores $\log P$ e os de rendimento dos produtos das reações, que pode ser observada na curva em "S" descrita na Figura 3.5. Curvas similares são

apresentadas por Laane [89], onde esta observação é confirmada pelo autor que $\log P$ é o único indicador da medida da polaridade do solvente que pode ser relacionado com a eficiência dos biocatalisadores em síntese em meio orgânico.

Solvente	Rendimento (%)
n-octano	88
iso-octano	83
n-heptano	82
ciclo-hexano	79
n-hexano	78
éter de petróleo	77
tolueno	70
tetracloroeto de carbono	63
benzeno	45
éter etílico	42
clorofórmio	12
xileno	7
1,4-dioxano	7
n-hexadecano ^a	-

TABELA 3.13 - Efeito do solvente na reação de esterificação do ácido oléico com o álcool 1-pentanol.

As reações foram efetuadas com 10 ml de organo-gel de ciclo-hexano seccionado em 30 ml de solvente contendo 0,01 mol de cada substrato, apresentando [CV lipase] = 0,25 mg/ml do gel; [AOT] = 0,15 M e $W_o = 92,59$. As reações foram submetidas a agitação magnética suave, sendo o tempo de reação de 24h a 25°C.

^a Não foi possível separar o produto do solvente devido ao seu ponto de ebulição ser muito elevado (PE = 287°C) para se utilizar a metodologia descrita no Capítulo 2.

Pode-se observar que quanto maior for o valor de $\log P$ do solvente, maior será a eficiência da reação na qual o solvente participa.

Concluindo-se, os melhores solventes para reações de esterificação catalisadas pela CV lipase imobilizada em sistema de organo-gel são os que possuem valores de

log P maiores ou iguais a 4. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Laane [89], para reações estudadas com enzimas em suspensões em solvente orgânico e com enzimas imobilizadas em micelas reversas.

Solvente	Coefficiente de Partição (log P)	Constante Dielétrica (ϵ)	Momento de Dipolo (D)
octano	4,50	1,950	0,00
iso-octano	4,51	1,940	0,00
heptano	4,00	1,920	0,00
ciclo-hexano	3,20	2,020	0,00
hexano	3,50	1,890	0,08
éter de petróleo	-	-	-
tolueno	2,50	2,568	0,45
tetracloreto de carbono	3,00	2,238	-
benzeno	2,00	2,275	0,00
éter etílico	0,85	4,335	1,15
clorofórmio	2,00	4,810	1,04
xileno	3,10	2,570	0,62
1,4-dioxano	- 1,14	2,209	0,00

TABELA 3.14 - Indicadores de medida da polaridade dos solventes. Os dados de log P foram retirados de [89] e os de constante dielétrica e momento de dipolo foram retirados de [93]

3.9. RESUMO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

As observações e conclusões mais importantes obtidas a partir dos experimentos previamente discutidos são as seguintes:

I. Com relação ao organo-gel de ciclo-hexano:

- O sistema de organo-gel pode ser formado a partir da utilização do ciclo-hexano como fase oleosa da solução micelar de AOT/água, bastando para isso que a concentração de gelatina do sistema esteja acima de 6,0%.
- O gel permanece transparente numa larga faixa de valores de concentração de

gelatina e W_0 .

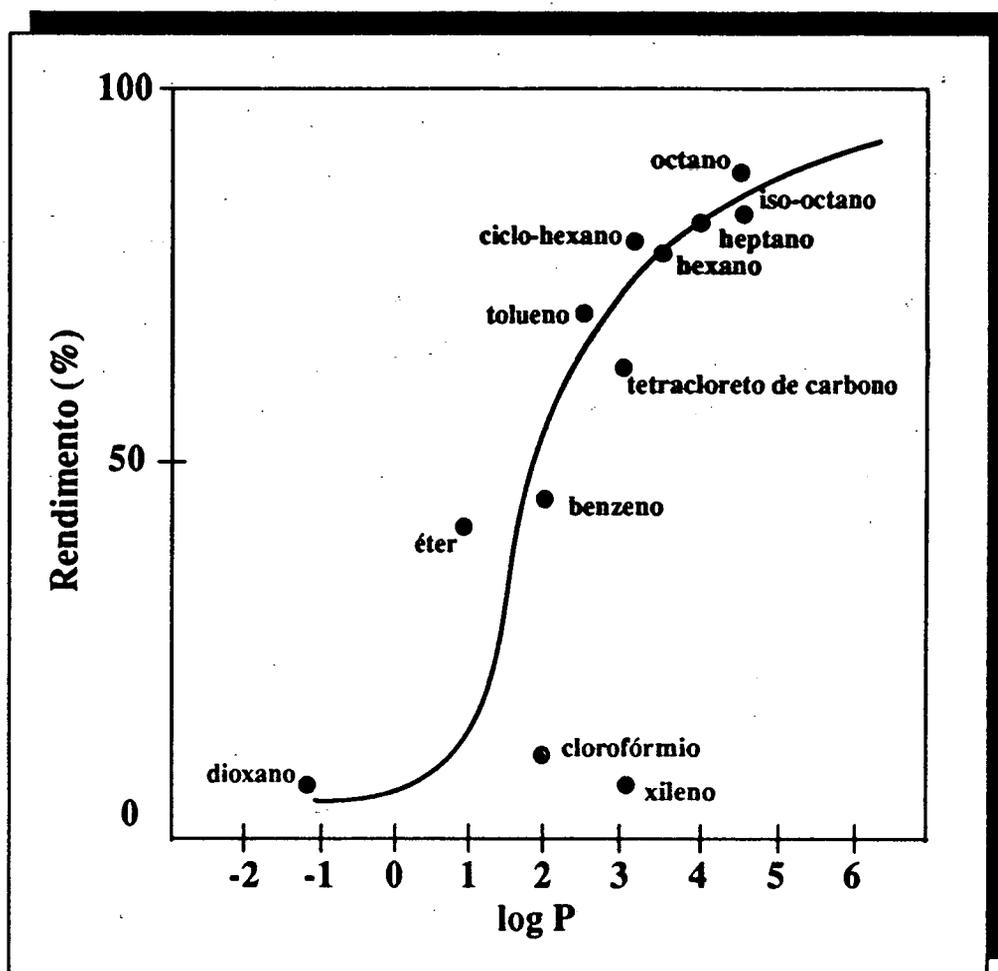


FIGURA 3.5 - Relação do rendimento da reação de esterificação entre o ácido oléico e o 1-pentanol com log P (coeficiente de partição) dos solventes utilizados. Organo-gel de ciclo-hexano, tempo de reação de 24 horas a 25 °C.

- O gel possui consistência apropriada para ser utilizado em reações onde a concentração de gelatina é de 14% (m/V) e $W_0 = 92,59$.
- O gel possui elevada estabilidade e reversibilidade térmica.
- O pH do gel é resultante da dissolução da gelatina no meio.

- O gel é estável quando em contato com: solventes com log P maiores ou iguais a 0,85; ácidos com log P maiores ou iguais a 1,50; álcoois com log P maiores ou iguais a 1,30; e tióis com log P maiores ou iguais a - 0,43.

II. Com relação à enzima CV lipase imobilizada em sistema de organo-gel:

- A enzima permanece com uma atividade de até 87% quando imobilizada neste sistema por um período de até doze meses.
- A enzima é muito eficiente na catálise de reações de esterificação entre o 1-pentanol e diversos ácidos de cadeia linear. O melhor substrato encontrado para esta enzima nas condições estudadas foi o ácido láurico. Ácidos com cadeias ramificadas ou cadeias com duas insaturações não são substratos muito adequados para a enzima em questão.
- A CV lipase não é muito eficiente na catálise de reações de síntese de tioésteres e de amidas.
- A CV lipase (da Genzyme) é extremamente ativa neste sistema numa concentração de 0,25 mg/ml.

III. Com relação à execução das reações utilizando o organo-gel como suporte sólido para imobilizar enzimas:

- Os melhores solventes para serem utilizados nas reações em organo-gel são aqueles que possuem log P maior ou igual a 4,0.
- O gel deve ser submetido a extração dos possíveis remanescentes dos produtos e substratos após o término da reação, evitando-se assim a contaminação das reações subsequente.

- As regras de otimização de Laane para reações enzimáticas em suspensão em solventes orgânicos ou em micelas reversas podem também ser aplicadas para as reações enzimáticas em organo-gel. Isto é, os substratos devem ser escolhidos de acordo com o surfactante e o solvente utilizados na reação e/ou com o produto que será produzido.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO

Analisando-se os objetivos estabelecidos no Plano de Trabalho (Capítulo 1), observa-se que os mesmos foram plenamente alcançados, no que tange à investigação das propriedades e uso do organo-gel de ciclo-hexano. A seguir estão apresentadas as principais conclusões que foram obtidas a partir da execução deste trabalho. Para que essas informações fossem descritas de forma estruturada, as mesmas foram classificadas nos seguintes tópicos.

- características do sistema de organo-gel;
- imobilização da enzima CV lipase e utilização em reações;
- otimização do meio reacional contendo organo-gel;
- análise comparativa dos sistemas de imobilização enzimática para utilização em síntese orgânica.

4.1. CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA DE ORGANO-GEL

A partir do diagrama de fases do organo-gel, pode-se concluir que a formação do mesmo, para uma concentração determinada de surfactante, depende, de um modo geral, 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. Desta forma, cada solvente interage no sistema de organo-gel de uma forma peculiar às suas estrutura e propriedades físico-químicas.

O organo-gel de ciclo-hexano requer mais gelatina para gelificar-se (6,5% m/V) quando comparado com os organo-géis de heptano (3,5%) [60] e hexano (4,5%)¹; e requer aproximadamente a mesma quantidade de gelatina que o sistema de organo-gel de iso-octano (6,2% m/V) [49]. A quantidade de água que o sistema de organo-gel de ciclo-hexano requer para a sua gelificação é de aproximadamente o dobro das quantidades de água dos demais sistemas.

A partir do diagrama de fases do ciclo-hexano pode-se verificar que este solvente

1. Dissertação de Mestrado de Roberto Dalla Vecchia.

forma um sistema homogêneo e estável (transparente) numa larga faixa de valores de concentração de gelatina e W_0 . Isto é um indicativo de que este solvente tem uma grande capacidade de formar uma estrutura apropriada à manutenção da microemulsão gelificada.

O organo-gel de ciclo-hexano possui características apropriadas para ser utilizado na imobilização de enzimas e, conseqüentemente, ser utilizado em sínteses com solvente orgânico, quando a sua composição é de 14% (m/V) de gelatina e $W_0 = 92,59$. Este sistema tem grande estabilidade e reversibilidade térmica, o que permite a sua fusão a temperaturas superiores a 30°C e a sua regelificação tantas vezes quantas se fizerem necessárias. A estrutura do organo-gel é também muito estável por vários meses, quando armazenado congelado a -20°C , ou a temperatura ambiente, desde que esteja submerso em solvente apropriado.

A estrutura do organo-gel de ciclo-hexano permanece estável (i. e., gel sólido e transparente) na presença de: solventes com $\log P$ maior ou igual a 0,85; ácidos com $\log P$ maior ou igual a 1,50; álcoois com $\log P$ maior ou igual a 1,30; e tióis com $\log P$ maior ou igual a - 0,43. Quando na presença de substâncias mais hidrofílicas que as supra-citadas, o gel é atacado e pode ser até totalmente destruído. O fato do organo-gel ser menos estável na presença de substâncias hidrofílicas é um indício de que uma certa quantidade de água é essencial na estabilização da rede de gelatina do gel; e que o solvente ou o substrato, que compete com a gelatina por esta quantidade de água, pode destruir a rede de gelatina, provocando danos à estrutura do gel. Este fato é muito importante e deve ser considerado quando da preparação do meio reacional para uma determinada síntese. Assim, solventes e substratos devem ser escolhidos não somente de acordo com a reação a ser realizada, mas também considerando-se a sua ação sobre o gel.

4.2. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA CV LIPASE E UTILIZAÇÃO EM REAÇÕES

Quando o sistema de organo-gel é utilizado para imobilizar a enzima CV lipase, esta permanece ativa no sistema por até 12 meses de armazenamento à temperatura

ambiente, sendo que a sua eficiência permanece em torno de 87%.

A enzima CV lipase quando imobilizada em sistema de organo-gel de ciclohexano é muito ativa na catálise de reações de esterificação entre o 1-pentanol e diversos ácidos carboxílicos. Os ácidos alquílicos de cadeia normal são os melhores substratos, por não possuírem nenhum impedimento estérico, interagindo, assim, facilmente com o sítio ativo da enzima. Através deste trabalho, e das análises dos dados da literatura, fica evidente que o melhor substrato para a enzima CV lipase é o ácido láurico, independentemente do sistema utilizado para a imobilização da enzima.

A enzima CV lipase não é muito ativa na catálise de tioésteres. A substituição do átomo de oxigênio do álcool por um enxofre no tiol resulta numa queda de rendimento da reação. A atividade da enzima CV lipase é muito pequena para moléculas contendo enxofre. Isto pode estar associado com a configuração da estrutura do complexo enzima-substrato. A interação dos resíduos dos aminoácidos do sítio ativo é mais efetiva com o oxigênio do que com o enxofre. Isto pode estar associado ao tamanho do átomo de enxofre, que é muito maior do que o de oxigênio.

A enzima CV lipase também mostrou-se pouco efetiva nas reações de acilação de aminas.

4.3. OTIMIZAÇÃO DO MEIO REACIONAL CONTENDO ORGANO-GEL

A partir de todos os experimentos realizados neste trabalho, alguns aspectos a serem considerados na otimização do meio reacional foram levantados. Os principais aspectos são a extração do produto retido no gel e a observação do efeito do solvente no meio reacional.

Quanto à retenção do produto no gel, verificou-se que uma fração do produto da catálise fica retida no gel após o término da reação. Esta retenção é resultado do particionamento do produto entre o solvente da reação e o gel. Desde que a enzima CV lipase localiza-se na interfase (camada de surfactante) da micela reversa, pode-se inferir que o produto fique particionado entre a interfase e o solvente. Para que a difusão do produto para fora do gel seja total, a sua extração com solvente puro se faz

necessária. Este procedimento permite a obtenção de todo o produto sintetizado, além de manter o gel isento de remanescentes da reação, possibilitando a sua reutilização.

Com referência ao efeito do solvente na eficiência da reação de esterificação, detectou-se que os solventes com log P maior que 3 foram os que apresentaram maiores rendimentos. Neste caso, a presença de solventes mais hidrofílicos prejudica a atividade da enzima no sistema. A perda da atividade enzimática está relacionada com a capacidade dos solventes mais hidrofílicos desestabilizarem a interação entre a água e a enzima. Com isso, os solventes provocam a perda da estrutura quaternária da enzima e, em consequência, a conformação do sítio ativo é destruída, resultando na sua inativação. Assim, o solvente, dependendo da sua hidrofobicidade, pode causar dano à estrutura do gel e à estrutura da enzima, sendo que a estrutura da enzima é muito mais sensível a este efeito que a estrutura do gel¹.

Além de ter apresentado reações inéditas com o sistema de organo-gel, este trabalho compilou um conjunto de regras práticas resultantes da análise combinada de dados experimentais e da literatura, úteis à otimização do rendimento das reações com o organo-gel. Estas regras práticas são basicamente as seguintes:

- o solvente e os substratos devem ter uma hidrofobicidade adequada para não reduzirem a atividade enzimática e não provocarem danos à estrutura do gel;
- os substratos devem ser escolhidos de acordo com o surfactante utilizado no organo-gel, com o solvente utilizado na reação e com o produto da reação.

As regras práticas acima são derivadas das regras de otimização de Laane [84], que levam em consideração os valores de log P de cada componente do sistema. Assim, pode-se, de maneira teórica, prever o comportamento de um dado meio reacional através dos cálculos de log P de seus componentes. Caso a reação não se mostre teoricamente eficiente com os componentes calculados, pode-se melhorá-la com a troca de qualquer um dos componentes do sistema, de forma a obter-se uma

1. Os dados experimentais, análises e conclusões associados ao efeito do solvente fazem parte de um "paper" em publicação no "Tetrahedron Letters", sob o título "Enzyme-Catalysed Esterifications in Microemulsion-Based Organo-gels". Os demais assuntos deste trabalho são tratados em um segundo "paper" submetido ao "Journal of Colloid Interface Science", sob o título "The Preparations of Microemulsion-based Gels of n-Hexane or Cyclohexane for Enzyme Immobilization".

combinação adequada de componentes. Desta forma, pode-se economizar tempo e reagentes, além de se otimizar a quantidade de reações necessárias para se sintetizar o produto de interesse.

4.4. ANÁLISE COMPARATIVA DOS SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA UTILIZAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA

Finalmente, com todos os dados discutidos até agora, realizou-se uma comparação entre o sistema de organo-gel e os demais sistemas descritos na literatura para a síntese enzimática em solvente orgânico.

Os sistemas de enzimas fisicamente imobilizadas ou quimicamente modificadas são os métodos mais complexos e demorados para se imobilizar enzimas. Apesar do método de imobilização física apresentar preparo mais simples que o método de modificação química, o mesmo apresenta uma perda de até 40% na atividade enzimática.

O sistema bifásico é de fácil preparação e os produtos são facilmente separados do biocatalisador. A inibição da enzima, apesar de poder ser minimizada pela escolha do solvente adequado, pode ser de até 10% em cada reação. As maiores desvantagens deste sistema são a necessidade de agitação contínua do meio reacional e a alta concentração requerida para a enzima (5 a 20 mg/ml).

O sistema de suspensão é, sem dúvida, o sistema de preparo mais simples. A separação do produto é feita por filtração da enzima, o que leva sempre a uma pequena perda de sua massa a cada filtração. A inativação da enzima é facilmente minimizada pela escolha do solvente adequado. Porém, se o sistema não estiver sobre agitação contínua, há uma queda considerável no rendimento da reação. Outra desvantagem reside na necessidade de alta concentração da enzima (2 a 50 mg/ml).

O sistema de micela reversa possui diversas características que o torna mais adequado que os supra-citados. As principais vantagens deste sistema são as seguintes:

- ser de fácil preparação e muito estável;
- seu meio reacional não requerer agitação;

- a concentração de enzima necessária para imobilização ser consideravelmente pequena;
- apresentar inibição enzimática pelos substratos muito reduzida;
- apresentar altos rendimentos em solventes com log P maior que quatro.

Suas principais desvantagens são a difícil separação dos produtos do meio reacional e a perda da atividade enzimática em até 40% após a preparação do sistema.

O sistema de organo-gel, por sua similaridade, possui todas as vantagens do sistema de micela reversa (com exceção da necessidade de agitação contínua, requerida pelo sistema de organo-gel), sem apresentar as suas respectivas desvantagens. Conseqüentemente, este é sem dúvida o melhor método, especialmente em termos:

- de facilidade de separação do produto do biocatalisador, bastando para isso a decantação da mistura reacional;
- da baixa concentração requerida pela enzima (0,25 mg/ml);
- da menor perda de atividade enzimática (no máximo de 20%).

Concluindo-se, com base nas comparações acima, a principal contribuição deste trabalho foi ter provado que a utilização do sistema de organo-gel é a metodologia mais adequada para a imobilização de enzimas, objetivando a sua utilização em síntese com solvente orgânico.

4.5. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

A seguir são apresentadas algumas sugestões para a otimização de alguns dos experimentos apresentados no Capítulo 3, bem como para o desenvolvimento de experimentos adicionais.

Quanto à otimização de alguns dos experimentos do Capítulo 3, propõe-se a substituição da enzima CV lipase por outras enzimas nas reações de tioesterificação e síntese de amidas, dado que a CV lipase apresenta uma atividade muito baixa nestas sínteses. Algumas sugestões de enzimas, possivelmente mais adequadas, são as seguintes:

- a. **Reações de Tioesterificação:** PPL (Lipase Pancreática Suína) e LP (Lipase da *Pseudomonas cepacea*).
- b. **Reações de Síntese de Amidas:** PPL (Lipase Pancreática Suína), Lipase do *Rhizopus Arrhizus* e Quimiotripsina.

Quanto ao desenvolvimento de experimentos adicionais para a investigação de algumas das questões ainda pendentes sobre o sistema de organo-gel, propõe-se:

- a. Verificar a existência de uma possível relação entre a quantidade de gelatina necessária para a gelificação do organo-gel e o “limite superior de temperatura de fase da microemulsão” de uma série de solventes (detalhes adicionais são apresentados no Item 3.1.4).
- b. Aplicar e validar a metodologia para medição do coeficiente de difusão da p-toluidina no sistema de organo-gel, com o objetivo de se medir o grau de impedimento imposto pelas barreiras difusionais encontradas pelas substâncias, quando estas passam do meio reacional para o gel e vice-versa. Com base nestas medidas de difusão das substâncias contidas no organo-gel, pode-se investigar o grau de interferência provocado pelos solventes na estrutura do mesmo. A descrição desta técnica, bem como sugestões de experimentos nos quais a mesma pode ser utilizada estão apresentados no Anexo 3.

CAPÍTULO 5 - BIBLIOGRAFIA

- [1] SEMINOV, 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.
- [2] ZAKS, A., KLIBANOV, A. M. The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. Science, v. 228, p. 1280-1284, 1985.
- [3] REESE, E. T., MANDELS, M. Enzyme action on partition chromatographic columns. J. Am. Chem. Soc., v. 80, n. 17, p. 4625-4627, 1958.
- [4] 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.
- [5] CARREA, G. Biocatalysis water-organic solvent two-phase systems. Trends Biotechnol., v. 2, p. 102-106, 1984.
- [6] KIRCHNER, G., SCOLLAR, M., KLIBANOV, A. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. J. Am. Chem. Soc., v. 107, p. 7072-7076, 1985.
- [7] BLAIN, J. A., PATTERSON, J. D. E., SHAW, C. E. L. et al. Study of bound phospholipase activities of fungal micelia using a organic solvent system. Lipids, v. 11, p. 553-560, 1976.
- [8] BELL, G., BLAIN, J. A., PATERSON, J. D. E. et al. Ester and glyceride synthesis by *Rhizopus arrhizus* mycelia. FEMS Microbiol. Lett., v. 3, p. 223-225, 1978.

- [9] GANCET, C. Catalysis with immobilized enzymes: hydrolysis and esterification by *Rhizopus arrhizus*, Heterogeneous Catalysis and Fine Chemicals (2nd Int. Symp. held at Poitiers, France, 1990). p. 62-69.
- [10] NISHIMURA, H., TAKAHASHI, K. SAKURAI, K. et al. Life Sci., v. 33, p. 1467-1473, 1983.
- [11] INADA, Y., NISHIMURA, H., TAKAHASHI, K. et al. Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 122, n. 2, p. 845-850, 1984.
- [12] MARLOT, C., LANGRAND, G., TRIANTAPHYLIDES, C. et al. Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic supports. Biotechnol. Lett., v. 7, n. 9, p.647-650, 1985.
- [13] 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.
- [14] OTTOLINA, G., CARREA, G., RIVA, S. Synthesis of ester derivatives of chloramphenicol by lipase-catalyzed transesterification in organic solvents. J. Org. Chem., v. 55, p. 2366-2369, 1990.
- [15] UÇAR, T., EKIZ, H. I., ÇELEBI, S. S. et al. The effect of solvents on the kinetics of free and immobilized lipase. Biocatalysis in Organic Media. (Proc. Int. Symp. held at Wageningen, Netherlands, 7-10 Dec. 1986). p. 381-386.
- [16] OTERO, C., BALLESTEROS, A., GUISAN, J. M. Immobilization/stabilization of lipase from *Candida rugosa*. Biochem. Biotechnol., v. 19, 1988.

- [17] CARTA, G., GAINER, J. L., BENTON, A. H. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. Biotechnol. Bioeng., v. 37, p. 1004-1009, 1991.
- [18] BOVARA, R., CARREA, G., FERRARA, L. et al. Resolution of (+/-)-transobanol by lipase PS-catalysed transesterification and effects of organic solvents on enantioselectivity. Tetrahedron: Asymmetry, v. 2, n. 9, p. 931-938, 1991.
- [19] SUCKLING, C. J. Immobilized enzymes. Chemical Society Reviews, v. 6, n. 2, p. 215-233, 1977.
- [20] KLIBANOV, A. M. Enzymes that work in organic solvent. Chemtech, v. 16, p. 354-359, 1986.
- [21] KLIBANOV, A. 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.
- [22] PHILIPPI, M. C., JONGEJAN, J. A., DUINE, J. A. Enantioselective hydrolysis and transesterification of glycidyl butyrate by lipase preparations from porcine pancreas. Biocatalysis in Organic Media. (Proc. Int. Symp. held at Wageningen, Netherlands, 7-10 Dec. 1986.). p. 279-284.
- [23] SAKURAI, T., MARGOLIN, A. L., RUSSEL, A. J. et al. Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium. J. Am. Chem. Soc., v. 110, n. 21, p. 7236-7237, 1988.
- [24] KITAGUCHI, H., FITZPATRICK, P. A., HUBER, J. E. et al. Enzymatic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent. J. Am. Chem. Soc., v. 111, p. 3094-3095, 1989.

- [25] KLIBANOV, A. M. Asymmetric transformations catalysed by enzymes in organic solvents. Acc. Chem. Res., v. 23, p. 114-120, 1990.
- [26] BIANCHI, D., CESTI, P. Lipase-catalyzed estereoselective Thioesterification of mercapto esters. J. Org. Chem., v. 55, p. 5657-5659, 1990.
- [27] SUGAI, T., OHSAWA, S., YAMADA, H. et al. Preparation of enantiomerically enriched compounds using enzymes: VII. A synthesis of Japanese beetle pheromone utilizing lipase-catalyzed enantioselective lactonization. Synthesis, n. 12, p. 1112-1114, 1990.
- [28] TUCIO, B., FERRÉ, E., COMEAU, L. Lipase-catalyzed synthesis of n-octyl-alkylamides in organic media. Tetrahedron Lett., v. 32, n. 24, p. 2763-2764, 1991.
- [29] DJEGHABA, Z., DELEUZE, H., DEJESO, B. et al. Enzymes in organic synthesis VII: Enzymatic acylation of amines. Tetrahedron Lett., v. 32, n. 6, p. 761-762, 1991.
- [30] PARIDA, S., DORDICK, J. S. Substrate structure and solvent hydrophobicity control lipase catalysis and enantioselectivity in organic media. J. Am. Chem. Soc., v. 113, n. 6, p. 2253-2259, 1991.
- [31] FITZPATRICK, P. A., KLIBANOV, A. M. How can the solvent affect enzyme enantioselectivity? J. Am. Chem. Soc., v. 113, n. 8, p. 3166-3171, 1991.
- [32] KLIBANOV, A. M. Enzymic catalysis in anhydrous organic solvents. Trends Biochem. Sci., v. 14, p. 141-144, 1989.

- [33] 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.
- [34] KHMEL'NITSKII, Y. L., LE VASHOV, A. V., KLYACHKO, N. L. et al. A microheterogeneous medium for chemical (enzymic) reactions based on a colloidal solution of water in a organic solvent. Russian Chemical Reviews, v. 53, n. 4, p. 319-331, 1984.
- [35] 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.
- [36] LUISI, P. L., MAGID, L. J. Solubilization of enzymes and nucleic acid in hydrocarbon micellar solutions. CRC Critical Reviews in Biochemistry, v. 20, n. 4, p. 409-474.
- [37] ROBINSON, B. H. Microemulsions-properties and novel chemistry. Chemistry in Britain, p. 342-344, April 1990.
- [38] BEREZIN, I. V., MARTINEK, K. (Editors). Introduction to applied enzymology. Izd. Morkov. Gas. Univ. Moscow, 1982.
- [39] 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.

- [40] MARTINEK, K., LEVASHOV, A. V., PANTIN, V. I. et al. Model of biological membranes or surface layer (active site) of protein globules (enzymes). Reactivity of water solubilized by reversed micelles of Aerosol OT in octane during the neutral hydrolysis of picryl chloride. Dokl. Akad. Nauk, SSSR, v. 238, n. 3, p. 626-629, 1978.
- [41] 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.
- [42] KUNIEDA, H., SHINODA, K. Solution behavior of aerosol OT/water/oil system. J. Colloid Interface Sci., v. 70, n.3, p. 577-583, 1979.
- [43] KLYACHKO, N. L. (1983) PhD Thesis, Moscow State University, Moscow.
- [44] LEVASHOV, A. V., KHMELNITSKY, Y. L., KLYACHKO, N. L. et al. Enzymes entrapped into reversed micelles in organic solvent: sedimentation analysis of the protein/AOT/H₂O/octane system. J. Colloid Interface Sci., v. 88, p. 444-457, 1982.
- [45] SHAPIRO, Y., BUDANO, N. A., LEVASHOV, A. et al. ¹³C NMR of study of entrapping proteins (α -chymotrypsin) into reversed micelles of surfactants (aerosol OT) in organic solvents (n-octane). Collect. Czech. Chem. Commun., v. 54, p. 1126-1134, 1989.
- [46] RAHAMAN, R. S., HATTON, A. Structural characterization of α -chymatrypsin-containing AOT reversed micelles. J. Phys. Chem., v. 95, p. 1799-1811, 1991.

- [47] RUCKENSTEIN, E., KARPE, P. On the enzymatic superactivity in ionic reverse micelles. J. Colloid Interface Sci., v. 149, n. 2, p. 408-436, 1990.
- [48] FADNAVIS, N. W., LUISI, P. L. Immobilized enzymes in reverse micelles: studies with gel-entrapped trypsin and α -chymotrypsin in AOT reverse micelles. Biotechnol. Bioeng., v. 33, p. 1277-1282, 1989.
- [49] HAERING, G., LUISI, P. L. Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsion. J. Phys. Chem., v. 90, p. 5892-5895, 1986.
- [50] QUELLET, C., EICKE, H. -F. Mutual gelation of gelatin and water-in-oil microemulsion. Chimia, v. 40, p. 233-237, 1986.
- [51] QUELLET, C., EICKE, H. -F. Some comments on the gelation of gelatin containing water/oil microemulsions. J. Phys. Chem., v. 91, p. 4211-4212, 1987.
- [52] QUELLET, C., EICKE, H. -F., GEHRKE, R. et al. Evidence of fractal network formation in gelatin - w/o microemulsions. Europhys. Lett., v. 9, n. 3, p. 293-298, 1989.
- [53] 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.
- [54] QUELLET, C., EICKE, H. -F., SAGER, W. Formation of microemulsion-based gels. J. Phys. Chem., v. 95, p. 5642-5655, 1991.
- [55] LESER, J. E., WEI, G., LUTHI, P. et al. Applications of enzyme-containing reverse micelles. J. Chem. Phys., v. 84, n. 9, p. 1113-1118, 1987.

- [56] CAPITANI, D., SEGRE, A. L., HAERING, G. et al. Mobility measurements in microemulsion gels. J. Phys. Chem., v. 92, p. 3500-3504, 1988.
- [57] ATKINSON, P. J., GRIMSON, M. J., HEENAN, R. K. et al. Microemulsion-based gels: a small-angle neutron scattering study. Chem. Phys. Lett., v. 151, n. 6, p. 494-498, 1988.
- [58] ATKINSON, P. J., GRIMSON, J. J., HEENAN, R. K. et al. Structure of microemulsion-based organo-gels. J. Chem. Soc., Chem. Commun., p. 1807-1809, 1989.
- [59] ATKINSON, P. J.; ROBINSON, B. H. Structure of microemulsion-based organo-gels. Spec. Publ. - R. Soc. Chem., v. 82, p. 542-545, 1991.
- [60] ATKINSON, P. J.; CLARK, D. C.; HOWE, A. M. et al. Characterization of microemulsion-based organo-gels. Progr. Colloid Polym. Sci., v. 84, p. 129-132, 1991.
- [61] PETIT, C.; ZEMB, Th.; PILENI, M. P. Structural study of microemulsion-based gels at the saturation point. Langmuir, v. 7, p. 223-231, 1991.
- [62] PETIT, C.; ZEMB, Th.; PILENI, M. P. Gelation of reverse micelles. AIP Conf. Proc., v. 226, p. 509-517, 1991.
- [63] BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. Nature, v. 343, p. 767-770, 1990.

- [64] BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S. et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. Nature, v. 351, p. 491-494, 1991.
- [65] LAUMEN, K., SCHNEIDER, J. P. A highly selective ester hydrolase from *Pseudomonas* sp. for the enzymatic preparation of enantiomerically pure secondary alcohols; Chiral auxiliaries in organic synthesis. J. Chem. Soc. Chem. Commun., p. 598-600, v. 9, 1988.
- [66] GUTMAN, A. L., ZUOBI, K., GUIBÉ-JAMPEL, E. Lipase catalyzed hydrolyses of γ -substituted α -aminobutyrolactones. Tetrahedron Lett., v. 31, n. 14, p. 2037-2038, 1990.
- [67] KASTLE, J. H., LOEVENHART, A. S. Concerning lipase, the fat-splitting enzyme and the reversibility of its action. Am. Chem. J., v. 24, p. 491-525, 1900.
- [68] IWAI, W., TSUJISAKA, Y., FUKUMOTO, J. Studies on lipase. II. hydrolytic and esteryfying actions of crystalline lipase of *Aspergillus niger*. J. Gen. Appl. Microbiol., v. 10, p. 13-22, 1964.
- [69] OKUMURA, S., IWAI, M., TSUJISAKA, Y. Synthesis of various kinds of esters by four microbiol. lipases. Biochem. Biophys. Acta., v. 575, p. 156-165, 1979.
- [70] IWAI, M., OKUMURA, S., TSUJISAKA, Y. Synthesis of terpene alcohol esters by lipase. Agric. Biol. Chem., v. 44, p. 2731-2732, 1980.
- [71] ZAKS, A., KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. Science, v. 224, p. 1249-1251, 1984.

- [72] MARTINEK, K., SEMENOV, A. N., BEREZIN, I. V. Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I - Chemical equilibrium shift. Biochem. Biophys. Acta., v. 658, p. 76-89, 1981.
- [73] HAN, D., RHEE, J. S. Hydrolysis of olive oil by lipase in AOT/isooctane reversed micelles. Biotech. Lett., v. 7, p. 651-653, 1985.
- [74] FLETCHER, P. D. I., ROBINSON, B. H. Activity of lipase in water-in-oil microemulsions. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, v. 81, p. 2667-2669, 1985.
- [75] HAN, D., RHEE, J. S. Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive in AOT-isooctane reversed micelles. Biotechnol. Bioeng., v. 28, p. 1250-1255, 1986.
- [76] FLETCHER, P. D. I., FREEDMAN, R. B., ROBINSON, B. H. et al. Lipase-catalysed ester synthesis in oil-continuous microemulsions. Biochem. Biophys. Acta., v. 912, p. 278-282, 1987.
- [77] HAN, D., KNON, D. Y., RHEE, J. S. Determination of lipase activity in AOT-isooctano reversed micelles. Agric. Biol. Chem., v. 51, n. 2, p. 615-618, 1987.
- [78] HAYES, D. G., GULARI, E. Esterification reactions of lipase in reverse micelles. Biotechnol. Bioeng., v. 35, p. 793-801, 1990.
- [79] DESNUELLE, P. Pancreatic lipase. Adv. Enzymol., v.23, p. 129-161, 1961.
- [80] REES, G. D., NASCIMENTO, M. G., JENTA, T. R. J. et al. Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organo-gels. Biochem. Biophys. Acta. v. 1073, p. 493-501, 1991.

- [81] REES, G. D., JENTA, T. R. J., NASCIMENTO, M. G. et al. The use of water-in-oil microemulsions 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.
- [82] ABRAHAM, G., MURRAY, M. A., JOHN, V. T. Interesterificação selectivity in lipase catalized reactions of low molecular weight triglycerides. Biotechnol. Lett., v. 10, n. 8, p. 555-558, 1988.
- [83] RAMASWAMY, S., MORGAN, B., OEHLSCHLAGER, A. C. Porcine pancreatic lipase mediated selective acylation of primary alcohols in organic solvents. Tetrahedron Lett., v. 31, n. 24, p. 3405-3408, 1990.
- [84] INAGAKI, T., UEDA, H. Enantioselective esterification of racemic terpene alcohols with fatty acids by *Pseudomonas sp.* NOF-5 Strain. Agric. Biol. Chem., v. 51, n. 5, p. 1345-1348, 1987.
- [85] HÖNIG, H., SEUFER-WASSERTHAL, P., WEBER, H. Simultaneous separation of enantiomers of diastereomers by lipases. Tetrahedron Lett., v. 31, n. 21, p. 3011-3012, 1990.
- [86] KALARITIS, P., REGENYE, R. W., PARTRIDGE, J. J. et al. Kinetic resolution of 2-substituted esters catalysed by a lipase ex. *Pseudomonas fluorescens*. J. Org. Chem., v. 55, p. 812-815, 1990.
- [87] CROCKS, J. E. Measurement of diffusion coefficients. J. Chem. Educ., v. 66, n. 7, p. 614-615, 1989.
- [88] VEIS, A. The macromolecular chemistry of gelatin. N. Y.: Academic Press, 1964.

- [89] LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng., v. 30, p. 81-87, 1987.
- [90] REKKER, R. F.; KORT, H. M. The hydrophobic fragmental constant; an extension to a 1000 data point set. Eur. J. Med. Clin. Therapeut., v. 14, n. 6, p. 479-488, 1979.
- [91] JESUS, P. C. Relatório de Bacharel em Química. Universidade Federal de Santa Catarina. 1990.
- [92] SUGIURA, M., JSOBE, M. Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*. IV. Substrate specificity of a low molecular weight lipase. Chem. Pharm. Bull., v. 23, n. 6, p. 1226-1230, 1975.
- [93] LANGE, N. A. Lange's handbook of chemistry. 13 ed. N. Y.: McGraw-Hill Book Company, 1985.
- [94] POUCHERT, C. J. The Aldrich library of infrared spectra. Edition III. 1981.
- [95] KELLER, R. J. The Sigma library of FT-IR spectra. Edition I. Vol I e II, 1986.

ANEXOS

ANEXO 1

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

Produto	R _f ^a	γC=O (cm ⁻¹) ^b ácido	γC=O (cm ⁻¹) ^b éster
CH ₃ (CH ₂) ₁₀ C(=O)-O-C ₅ H ₁₁	0,62	1712	1725
CH ₃ (CH ₂) ₁₆ C(=O)-O-C ₅ H ₁₁	0,66	1700	1735
CH ₃ (CH ₂) ₁₄ C(=O)-O-C ₅ H ₁₁	0,58	1702	1730
CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ C(=O)-O-C ₅ H ₁₁	0,56	1711	1715
CH ₃ (CH ₂) ₁₂ C(=O)-O-C ₅ H ₁₁	0,65	1713	1740
(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂ C(=O)-O-C ₅ H ₁₁	0,70	1700	1730
CH ₃ CH=CHCH=CH-C(=O)-O-C ₅ H ₁₁	0,63	1655	1700

TABELA A1.1 - Dados cromatográficos e espectrais de IV dos ésteres derivados do álcool 1-pentanol, sintetizados em sistema de organo-gel de ciclo-hexano ([CV lipase] = 0,25mg/ml de gel, tempo de reação 24h a 25°C).

- a) As medidas de R_f foram executadas em solução hexano-éter 3:2.
b) Os espectros de IV foram realizados utilizando-se pastilhas de KBr ou filmes.

Produto	R _f ^a	γC=O (cm ⁻¹) ^b éster
CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -S-(O=)C-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃		
CH ₃ (CH ₂) ₂ -S-(O=)C-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0,61	1745
CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)-S-(O=)C-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0,75	1715
CH ₃ CH ₂ -S-(O=)C-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0,75	1725
C ₆ H ₅ -S-(O=)C-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0,67	1730
p-CH ₃ -C ₆ H ₄ -S-(O=)C-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0,64	1725
p-Cl-C ₆ H ₄ -S-(O=)C-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0,76	1720

TABELA A1.2 - Dados cromatográficos e espectrais de IV dos ésteres derivados do ácido oléico, sintetizados em sistema de organo-gel de ciclo-hexano ([CV lipase] = 0,25mg/ml de gel, tempo de reação 30 dias a 25°C).

- a) As medidas de R_f foram executadas em solução hexano-éter 3:2.
b) Os espectros de IV foram realizados utilizando-se pastilhas de KBr ou filmes.

Produto	δ_{H}	$\cdot\text{CH}_3$	$\cdot\text{CH}_2$	$\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOR}$	$\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COSR}$	$\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}=\text{CH}$	$\cdot\text{CH}_2\cdot\text{OOCR}$	$\cdot\text{CH}_2\cdot\text{SOCR}$	$\cdot\text{CH}=\text{CH}$	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{C}(=\text{O})\text{-O-C}_5\text{H}_{11}$		0,92	1,28	2,27	-	-	4,15	-	-	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{C}(=\text{O})\text{-O-C}_5\text{H}_{11}$		0,80	1,17	2,10	-	-	4,02	-	-	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C}(=\text{O})\text{-O-C}_5\text{H}_{11}$		0,95	1,03	2,27	-	-	4,18	-	-	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{C}(=\text{O})\text{-O-C}_5\text{H}_{11}$		0,83	1,17	2,13	-	-	4,02	-	-	-
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{-O-C}_5\text{H}_{11}$		0,93	1,43	2,30	-	-	4,16	-	-	-
$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH-C}(=\text{O})\text{-O-C}_5\text{H}_{11}$					-	-		-	-	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{C}(=\text{O})\text{-O-C}_5\text{H}_{11}$		0,97	1,37	2,17	-	2,35	4,17	-	5,47	-
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$				-	-	-	-	-	-	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$		1,07	1,43	-	2,27	2,87	-	4,23	5,57	-
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$		0,90	1,31	-	2,17	3,07	-	-	5,46	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$				-	-	-	-	-	-	-
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$		0,91	1,30	-	2,20	3,21	-	-	5,56	7,60
$p\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$		0,93	1,33	-	2,16	3,20	-	-	5,55	7,36
$p\text{-Cl-C}_6\text{H}_4\text{-S-(O=)C-(CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$		0,92	1,30	-	2,24	3,19	-	-	5,54	7,54

TABELA A1.3 - Dados espectrais de RMN dos ésteres derivados do álcool 1-pentanol e dos tioésteres derivados do ácido oléico, sintetizados em sistema de organo-gel de ciclo-hexano. Os valores dos deslocamentos químicos são determinados em p.p.m. Utilizou-se TMS como referência interna e CCl_4 com solvente.

ANEXO 2

REAGENTES UTILIZADOS COM RESPECTIVAS FÓRMULAS

SOLVENTES

- acetofenona: $C_6H_5COCH_3$
- benzeno: C_6H_6
- ciclo-hexano: C_6H_{12}
- dietiléter (éter etílico): $C_2H_5OC_2H_5$
- dimetilbenzeno (xileno): $C_6H_4(CH_3)_2$
- dimetilformamida: $HCON(CH_3)_2$
- dimetilsulfóxido (DMSO): $(CH_3)_2SO$
- 1,4-dioxano: $C_4H_8O_2$
- heptano: C_7H_{16}
- hexadecano: $C_{16}H_{34}$
- hexano: C_6H_{14}
- metilbenzeno (tolueno): $C_6H_5CH_3$
- octano: C_8H_{18}
- propanona (acetona): CH_3COCH_3
- tetraclorometano (tetracloroeto de carbono): CCl_4
- triclorometano (clorofórmio): $CHCl_3$
- 2,2,4-trimetilpentano (iso-octano): $CH_3C(CH_3)_2CH_2CH(CH_3)CH_3$

ÁCIDOS

- acrílico: $H_2C=CHCOOH$
- butírico: $CH_3(CH_2)_2COOH$
- 3,7-dimetil-6-octenóico: $(CH_3)_2C=CH(CH_2)_2CH(CH_3)CH_2COOH$
- dodecanóico (ácido láurico): $CH_3(CH_2)_{10}COOH$
- etanóico (ácido acético): CH_3COOH
- 2-etilhexanóico: $CH_3(CH_2)_3CH(C_2H_5)COOH$

- hexadecanóico (ácido palmítico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
- *trans,trans*-2,4-hexadienóico (ácido sórbico): $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$
- 4-metilpentanóico (4-metilvalérico): $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
- octadecanóico (ácido esteárico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
- *cis*-9-octadecanóico (ácido oléico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
- 2(p-clorofenoxi) propiónico: $\text{CH}_3\text{CH}(\text{ClC}_6\text{H}_4\text{O})\text{COOH}$
- tetradecanóico (ácido mirfístico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$

ÁLCOOIS

- n-butanol: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$
- ciclo-hexanol: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{OH}$
- 2-dimetilaminoetanol: $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$
- 3-dietilaminopropanol: $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$
- etanol: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
- etileno glicol: $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
- n-hexanol: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{OH}$
- mentol: $(2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH})(5\text{-CH}_3)\text{C}_6\text{H}_9\text{OH}$
- metanol: CH_3OH
- n-octanol: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$
- n-pentanol: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{OH}$
- n-propanol: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{OH}$

TIÓIS

- 2-butanotiol: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_3$
- p-clorotiofenol: $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{SH}$
- 1-dodecanotiol: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$
- p-metiltiofenol: $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SH}$
- 1-propanotiol: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{SH}$
- tiofenol: $\text{C}_6\text{H}_5\text{SH}$

AMINAS

- benzilamina: $C_6H_5NH_2$
- dodecilamina: $CH_3(CH_2)_{11}NH_2$
- fenilamina: $C_6H_5CH_2NH_2$

ANEXO 3

MEDIDAS DE COEFICIENTE DE DIFUSÃO DA p-TOLUIDINA

A3.1. INTRODUÇÃO

A partir dos dados obtidos no Item 3.8 (Efeito do Solvente na Eficiência da Reação de Esterificação Catalisada pela CV Lipase em Sistema de Organo-gel), iniciou-se a investigação do efeito do solvente quando este participa da estrutura do organo-gel. Para isto, organo-géis com diferentes hidrocarbonetos foram preparados. Estes organo-géis foram utilizados na reação de esterificação do ácido oléico com o álcool 1-pentanol. As reações foram executadas em meio reacional contendo como solvente o mesmo hidrocarboneto com o qual o gel foi preparado. Os rendimentos obtidos nestas reações estão apresentados na Tabela A3.1.

Solvente	Rendimento (%)
n-hexano ^a	86
n-octano ^a	84
ciclo-hexano ^b	79
n-heptano ^c	68
iso-octano ^a	64
xileno ^d	gel pouco consistente
benzeno	não forma gel
éter de petróleo	não forma gel

TABELA A3.1 - Efeito do solvente na reação de esterificação do ácido oléico com o álcool 1-pentanol.

As reações foram efetuadas com 10 ml de organo-gel seccionado em 30 ml de solvente contendo 0,01 mol de cada substrato, apresentando [CV lipase] = 0,25 mg/ml do gel. As reações foram submetidas a agitação magnética suave, sendo o tempo de reação de 24h a 25°C.

a [AOT] = 0,20 M e $W_o = 59,72$

b [AOT] = 0,15 M e $W_o = 92,59$

c [AOT] = 0,20 M e $W_o = 55,55$

d [AOT] = 0,20 M e $W_o = 50,00$

Estes resultados apresentam-se diferentes dos resultados da Tabela 3.13, onde os vários solventes são analisados somente quando participam do meio reacional de reações realizadas com o organo-gel de ciclo-hexano. Percebe-se que o efeito do solvente quando participante da estrutura do organo-gel é diferente do efeito do solvente quando este está somente na mistura reacional. Isto pode ser visto claramente na forma como a sequência de solventes altera-se da Tabela 3.13 para a Tabela A3.1.

No Item 3.8 discute-se o efeito do solvente com base na sua hidrofobicidade, quando associa-se a queda do rendimento da reação com a diminuição do valor de $\log P$ do solvente. Esperava-se um comportamento similar no experimento com o solvente participando da estrutura do organo-gel. Porém, observou-se que, por exemplo, o hexano que possuía menor rendimento entre os cinco hidrocarbonetos no Item 3.8, passou a ser o solvente de melhor rendimento quando participando da estrutura do organo-gel.

Estes novos resultados, associados com os dados discutidos no Item 3.1.4 (Diagrama de Fases do Organo-gel de Ciclo-hexano - Análise Comparativa), ou seja, com as diferenças na composição do organo-gel de acordo com os diversos solventes, demonstraram que a contribuição do solvente no interior da estrutura do organo-gel é muito mais complexa do que se esperava.

A partir desta consideração, um novo experimento mostrou-se necessário para se poder medir as diferenças existentes entre os vários organo-géis. O experimento teve como objetivo medir o grau de impedimento imposto pelas barreiras difusionais encontradas pelas substâncias, quando estas passam do meio reacional para o gel e vice-versa. Estas medidas de difusão podem estar relacionadas com o grau de interferência provocado pelos solventes na estrutura do organo-gel.

A seguir é apresentado o procedimento utilizado na realização do experimento em questão.

A3.2. MÉTODO EXPERIMENTAL

O procedimento geral de medida do coeficiente de difusão está representado esquematicamente na Figura A3.1.

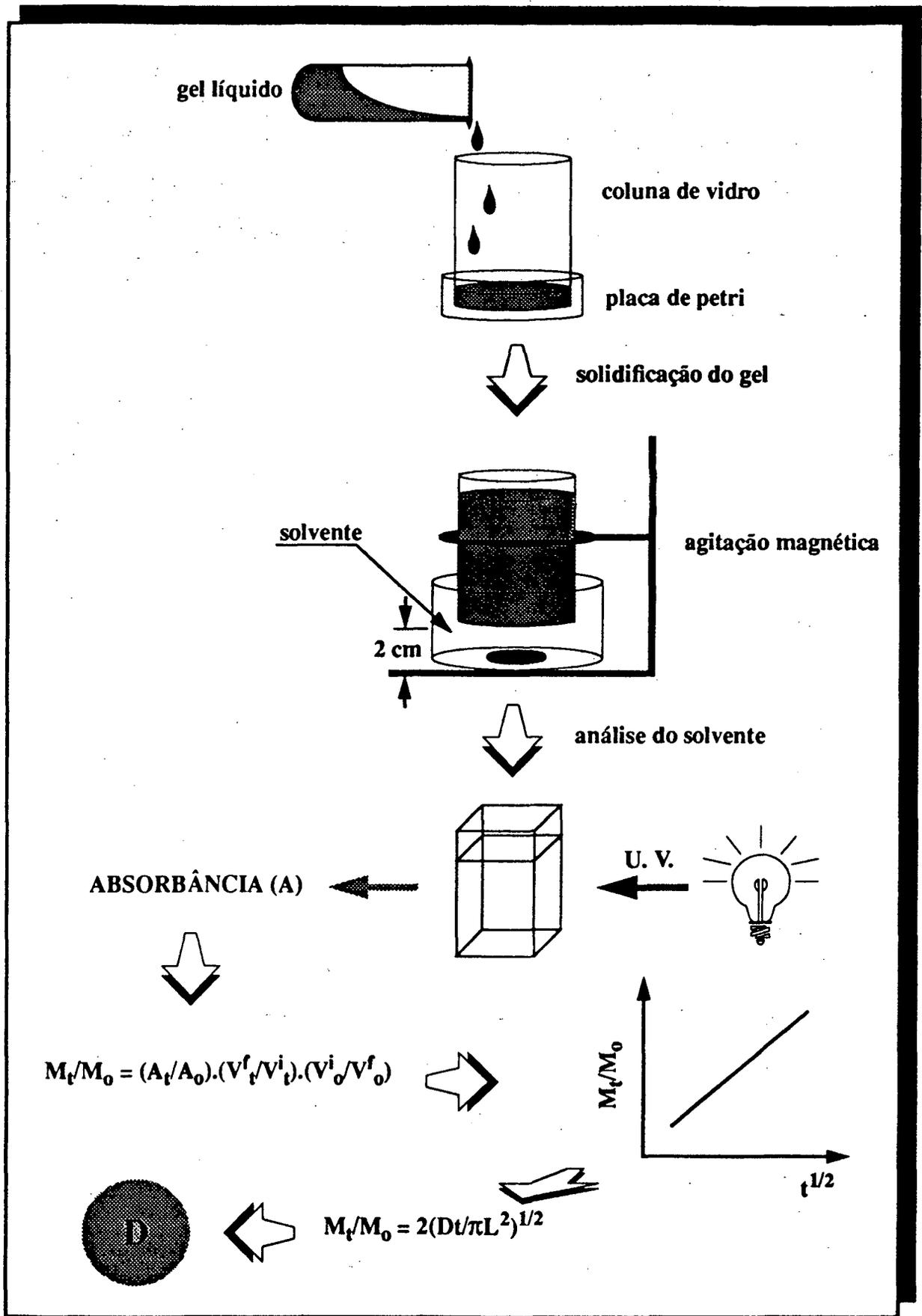


FIGURA A3.1 - Medidas do coeficiente de difusão

Os organo-géis de diferentes solventes utilizados neste experimento foram descritos no Item 2.3.2. Neste experimento foram utilizados géis sem enzima, adotando-se o seguinte procedimento.

O corante (p-toluidina) foi dissolvido no solvente que foi adicionado para fazer o gel. As concentrações finais de corante no gel foram de: $2,2 \cdot 10^{-3}$ M para os organo-géis de hexano, octano e iso-octano; $2,6 \cdot 10^{-3}$ M para o organo-gel de heptano; e $3,1 \cdot 10^{-3}$ M para o de ciclo-hexano.

O espectro de absorção, bem como uma curva de calibração da p-toluidina foram obtidos com espectrofotômetro UV/Vis (marca Beckman DV-65).

A curva de calibração foi executada dissolvendo-se quantidades crescentes do corante em hexano e medindo-se as respectivas absorbâncias. Com esses dados, traçou-se um diagrama de absorbância em função da concentração do corante, para se determinar em quais faixas de concentração a diluição do corante segue a Lei de Beer (concentrações que são linearmente proporcionais às respectivas absorbâncias - Figura A3.2).

As colunas para medir os coeficientes de difusão foram montadas da seguinte forma. Foram utilizados tubos de paredes grossas e sem fundo com aproximadamente 13 cm de comprimento e 1,9 cm de diâmetro, preparados para reter o gel. O gel, após alguns minutos de agitação, mas ainda em estado líquido, foi colocado no tubo em questão, que tinha sido colocado na sua posição vertical sobre uma pequena placa de Petri. A quantidade de gel preparada foi suficiente para preencher +/- 10 cm do comprimento do tubo.

Em seguida, selou-se a abertura superior do tubo para evitar a evaporação do solvente, deixando-se o gel esfriar a temperatura ambiente. Após o gel estar bem estabilizado, procedeu-se a leitura do coeficiente de difusão da seguinte maneira. O tubo contendo o gel foi retirado da placa de Petri e colocado num suporte que permitia que o tubo fosse introduzido no centro de um becker com capacidade de 250 ml, contendo 100 ml de solvente (o mesmo solvente utilizado na confecção do gel). O tubo permaneceu suspenso a aproximadamente 2 cm do fundo do becker. O solvente do becker foi mantido vigorosa e constantemente sob agitação por agitador magnético. Amostras do solvente foram retiradas a intervalos de tempo determinados e fez-se as leituras de absorbância a 287 nm. Uma solução 10^{-3} Molar de p-toluidina foi feita para

cada solvente e sua absorbância determinada (denominada A_0).

A metodologia supra-descrita foi baseada nos experimentos de medida de coeficiente de difusão desenvolvidas por Crocks em 1989 [87].

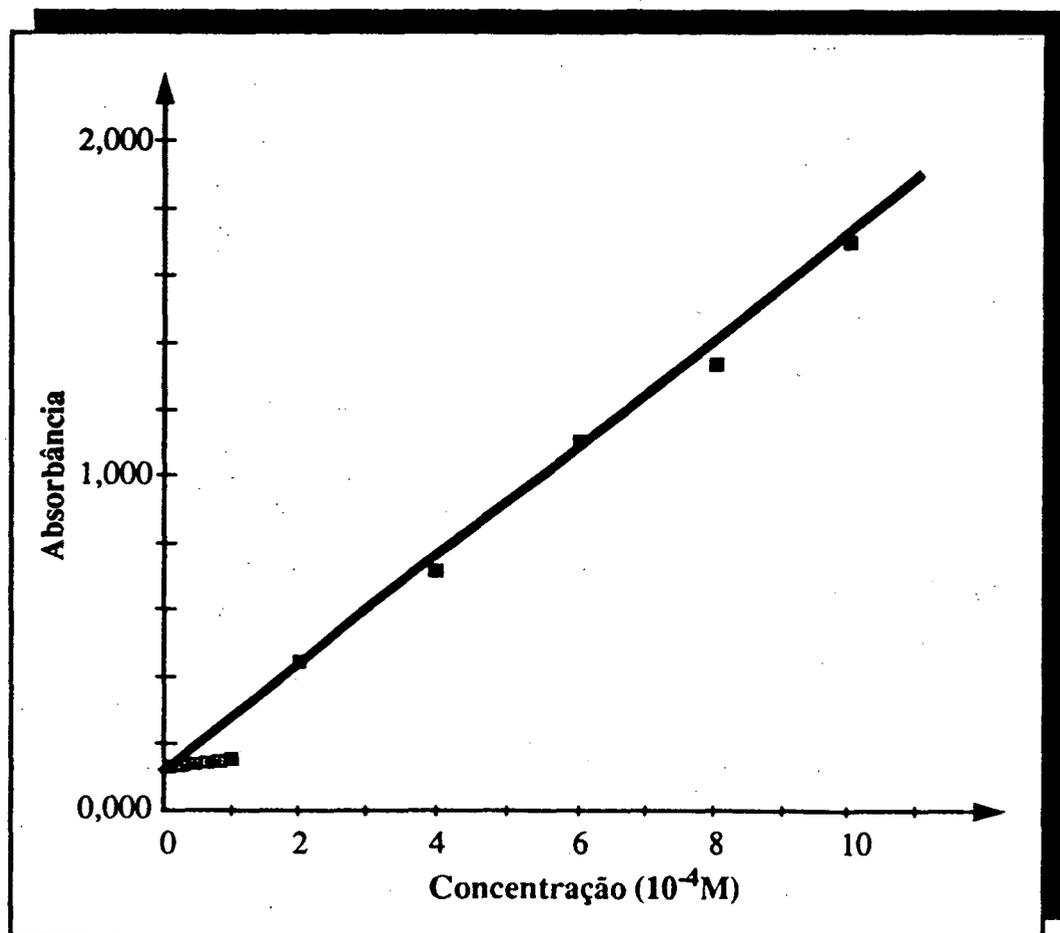


FIGURA A3.2 - Curva de calibração para a p-toluidina em n-hexano

A3.3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Os resultados das medidas de absorbância da p-toluidina em função do tempo para cada sistema de organo-gel estão descritos na Tabela A3.2.

Tempo t (min)	Absorbância do hexano	Absorbância do octano	Absorbância do ciclo-hexano	Absorbância do heptano	Absorbância do iso-octano
1	0,126	0,108	0,190	0,165	0,117
2	0,140	-	0,187	-	-
5	0,135	0,108	0,214	0,172	0,080
10	0,135	0,109	0,209	0,172	0,060
20	0,305	0,120	0,203	0,164	0,055
30	0,149	0,113	0,200	0,170	0,062
40	0,154	0,116	0,212	0,172	0,060
50	-	0,120	-	0,180	0,060
55	0,164	-	0,195	-	-
60	-	0,123	-	0,213	0,065
70	0,163	0,125	0,170	0,185	0,074
90	0,170	0,123	0,170	0,177	0,119
120	0,180	0,137	-	0,190	0,083
180	-	-	-	-	0,086
Ao	1,460	1,322	1,487	1,296	1,290

TABELA A3.2 - Medidas de absorbância da p-toluidina para organo-géis de diferentes hidrocarbonetos.

A_0 = absorbância da solução de p-toluidina $10^{-3}M$ nos diversos solvents.

Os valores das absorbâncias de cada organo-gel foram tratados matematicamente de acordo com a seguinte equação.

$$M_t/M_0 = (A_t/A_0) \cdot (V_t^f/V_t^i) \cdot (V_0^i/V_0^f)$$

onde:

M_t/M_0 = fração do soluto difusional no tempo t.

A_t = absorbância no tempo t.

A_0 = absorbância da solução de p-toluidina $10^{-3}M$.

V_t^i = volume inicial da solução de p-toluidina (volume do solvente no organo-gel).

V_t^f = volume final da solução de p-toluidina (volume do solvente no becker).

V_0^i = volume inicial da solução de p-toluidina para A_0 (1 ml).

V_0^f = volume final da solução de p-toluidina para A_0 (10 ml).

Os resultados destes cálculos foram então representados graficamente nas curvas de M_t/M_0 em função de $t^{1/2}$ apresentadas nas Figuras A3.3 a A3.7, que respeitam a seguinte equação:

$$M_t/M_0 = 2(Dt/\pi L^2)^{1/2}$$

onde:

D = coeficiente de difusão.

L = comprimento do cilindro de gel (i. e. 10 cm para hexano, octano e heptano, 9,5 cm para o ciclo-hexano e 9,7 cm para o iso-octano).

Aplicou-se regressão linear de primeira ordem às referidas curvas,

$$M_t/M_0 = 2(Dt/\pi L^2)^{1/2} \Rightarrow Y = AX + B,$$

obteve-se os seus respectivos coeficientes angulares [$A = 2(D/\pi L^2)^{1/2}$], a partir dos quais os respectivos coeficientes de difusão (D) podem ser obtidos:

$$D = (AL/2)^2\pi.$$

Os resultados de coeficiente de difusão da p-toluidina para os diversos organo-géis estão apresentados na Tabela A3.3.

Solvente	Rendimento (%)	D ($10^{-9}m^2s^{-1}$)
n-hexano	86	2,124
n-octano	84	0,755
ciclo-hexano	79	0,517
n-heptano	68	0,755
iso-octano	64	0,027

TABELA A3.3 - Coeficiente de difusão da p-toluidina para os diversos organo-géis.

Os valores da Tabela A3.3 mostram que existe uma relação de proporcionalidade

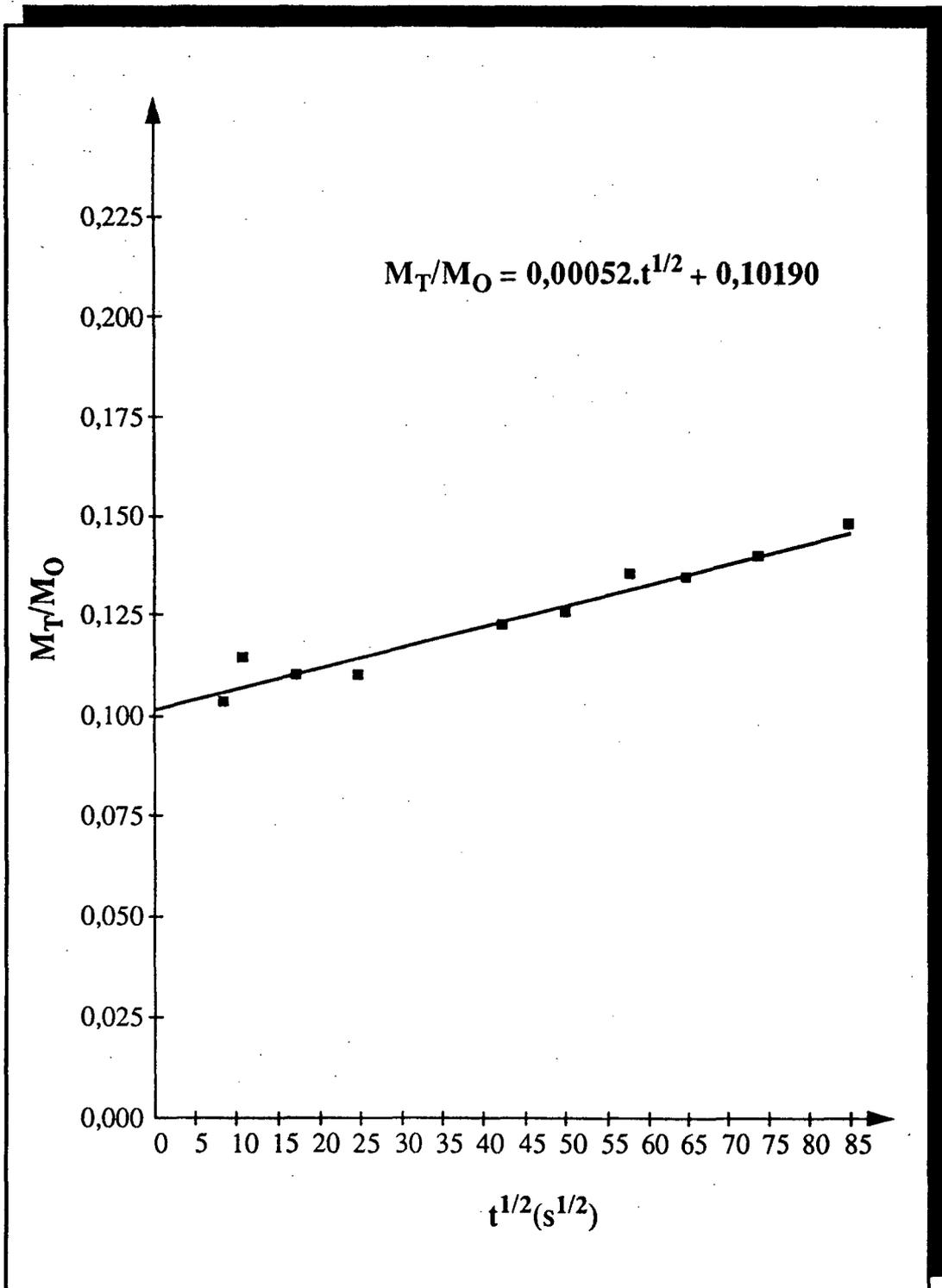


FIGURA A3.3 - Curva de coeficiente de difusão do hexano

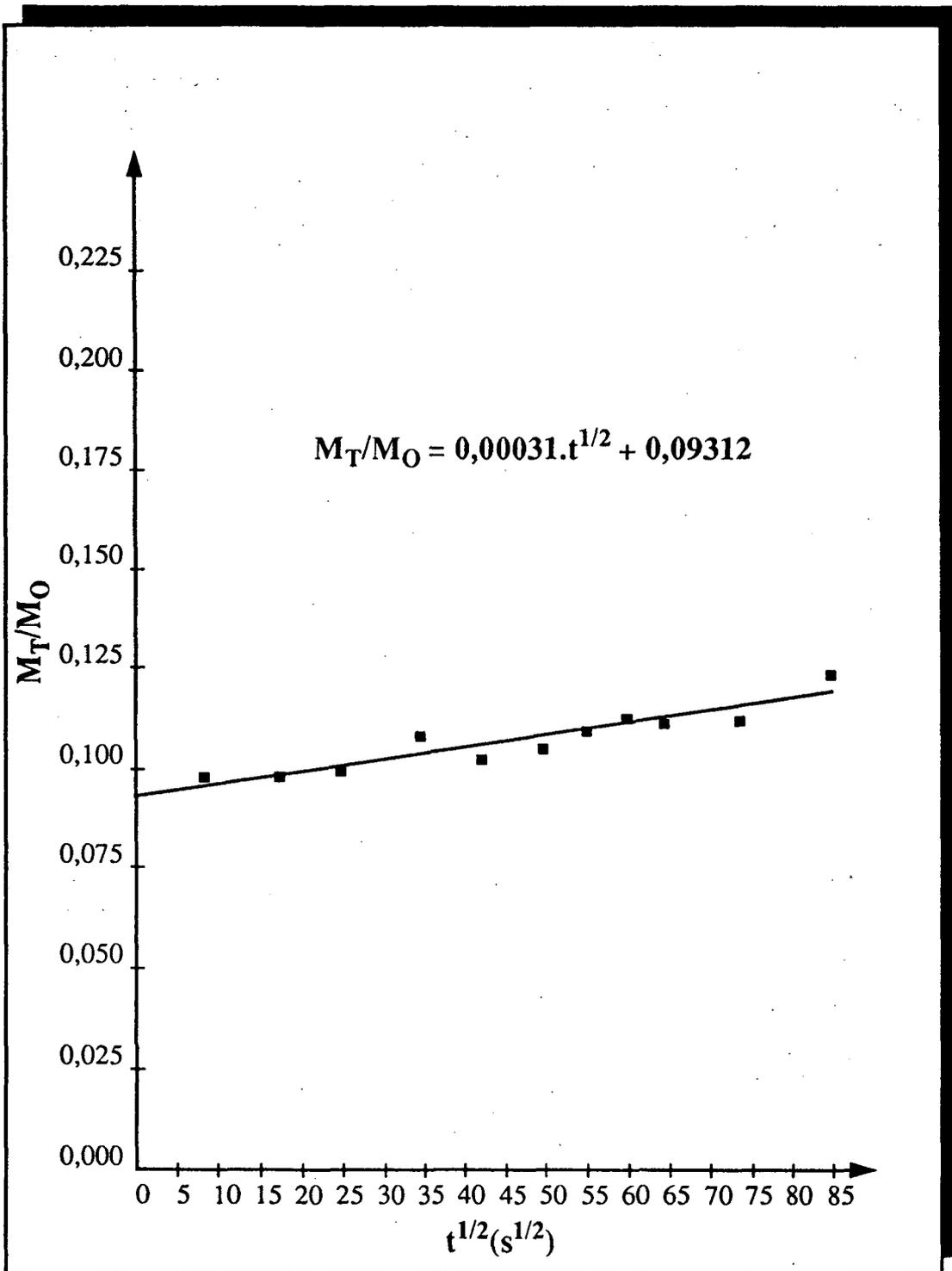


FIGURA A3.4 - Curva de coeficiente de difusão do octano

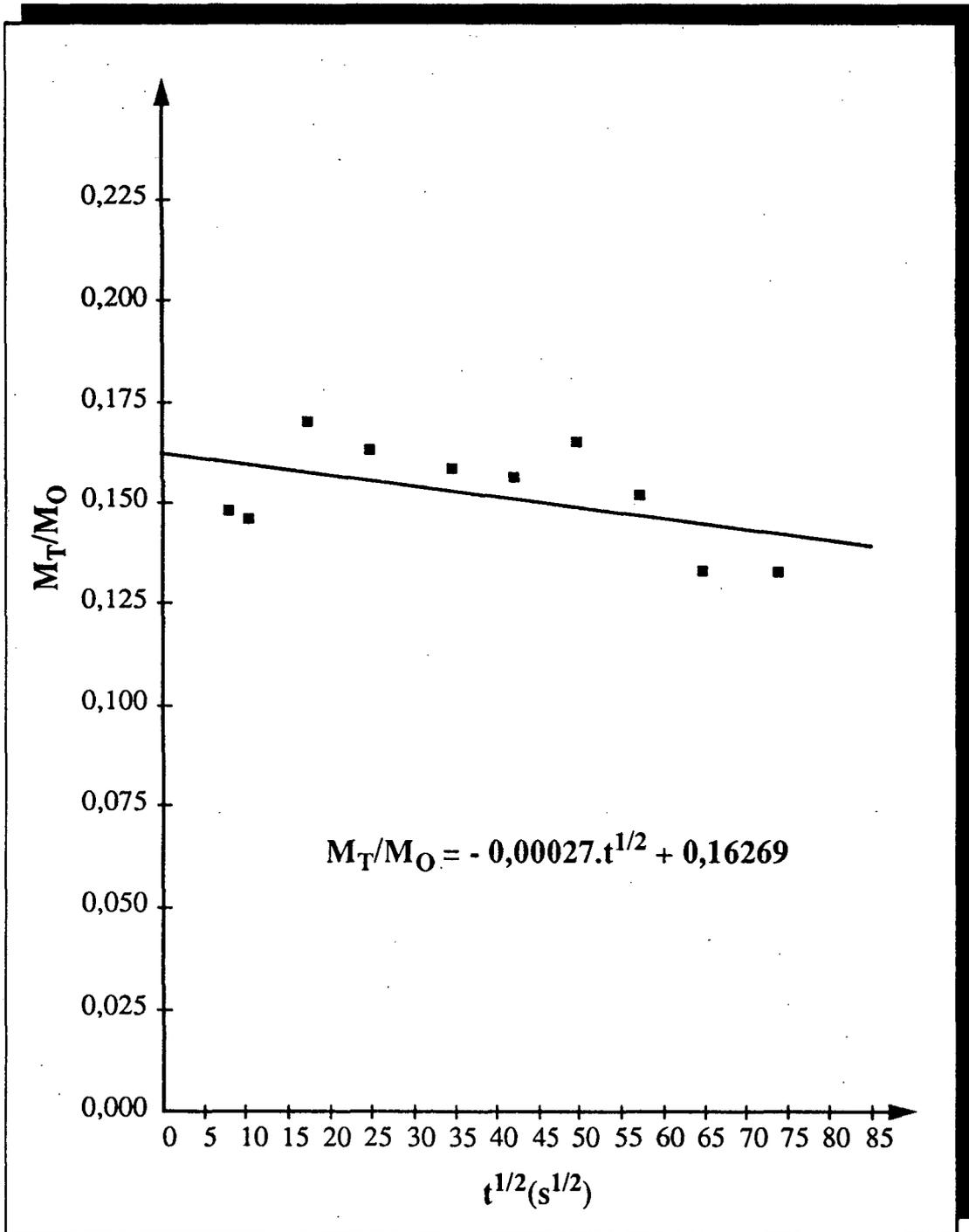


FIGURA A3.5 - Curva de coeficiente de difusão do ciclo-hexano

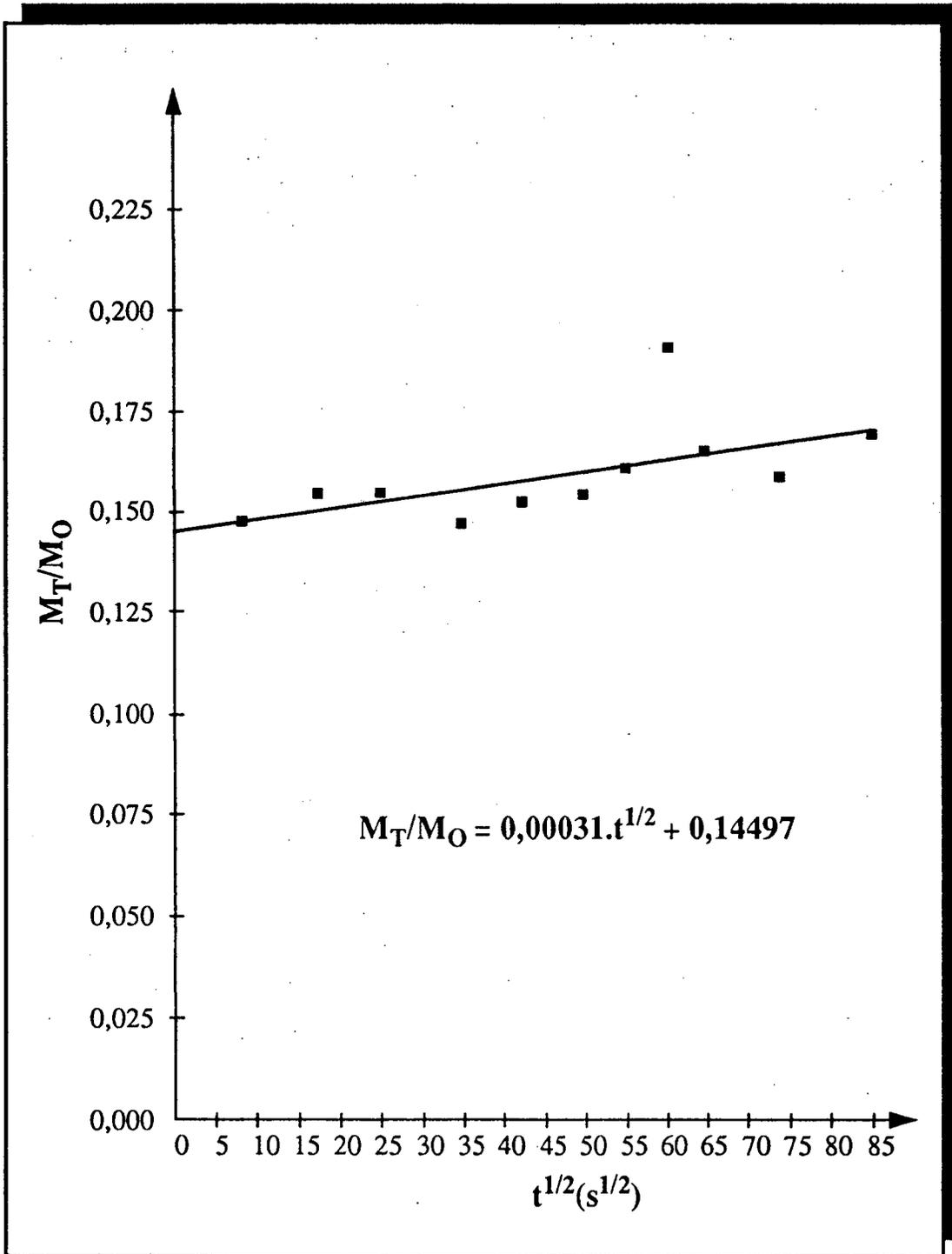


FIGURA A3.6 - Curva de coeficiente de difusão do heptano

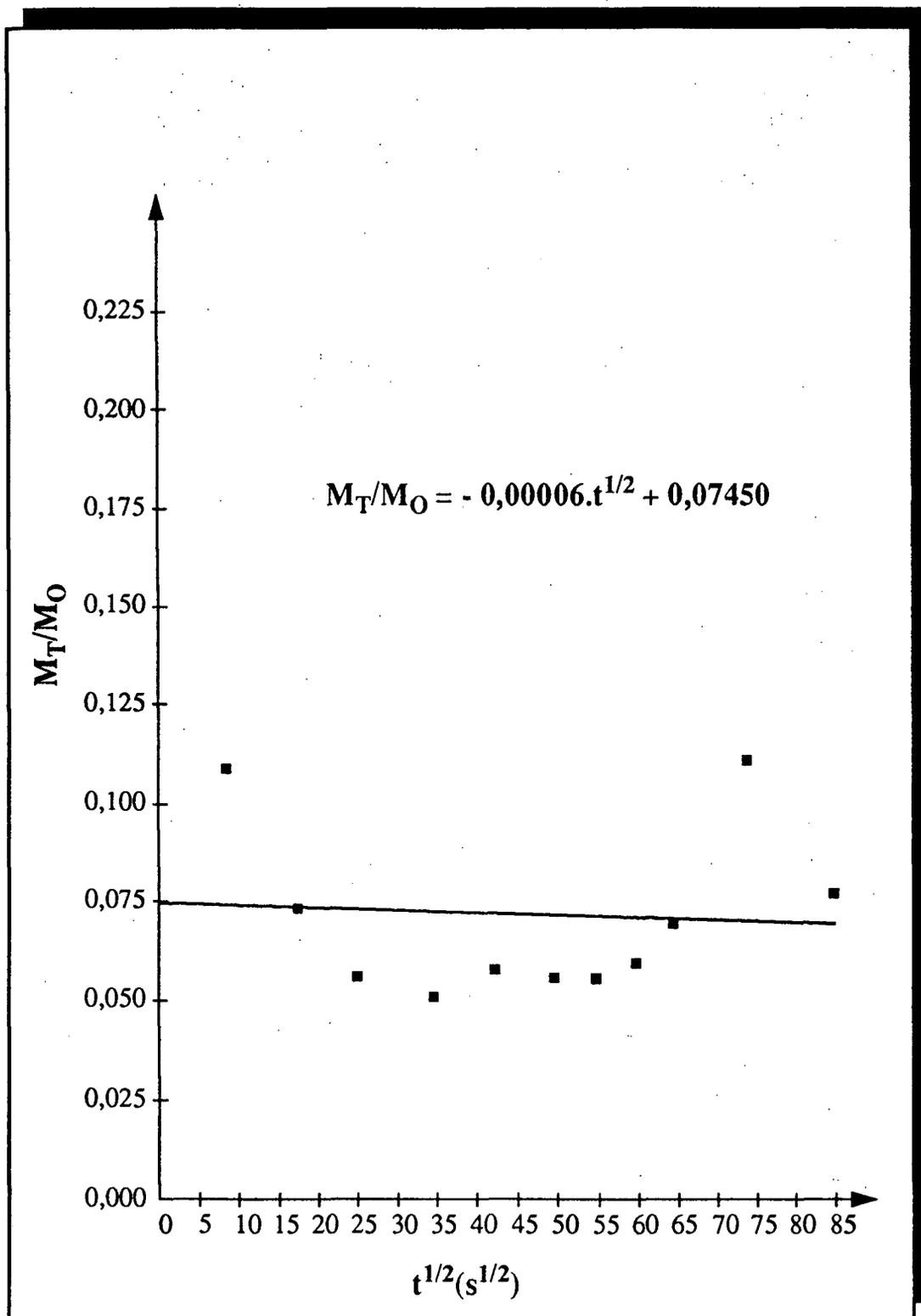


FIGURA A3.7 - Curva de coeficiente de difusão do iso-octano

entre o rendimento da reação e o valor do coeficiente de difusão de cada organo-gel (com exceção do organo-gel de ciclo-hexano). Isto pode ser um indicativo de que a estrutura do organo-gel é ligeiramente diferente de um solvente para o outro.

A3.4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados deste experimento não foram mencionados no Capítulo 3 pelos seguintes motivos. Como pode ser visto na Tabela A3.2, os valores de absorbância são muito baixos e estão numa região de não linearidade da curva de calibração da p-toluidina (Figura A3.2). Os valores baixos de absorbância são resultantes da baixa difusão do corante, aliada à baixa concentração do mesmo no gel.

A despeito dessas considerações, percebe-se que a metodologia adotada para a medição do coeficiente de difusão é plenamente aplicável ao estudo do organo-gel, sendo que seus resultados já se mostram positivos no que se refere à medida de diferenças de difusão na p-toluidina, quando diferentes solventes participam da estrutura do organo-gel.

Finalmente, propõe-se a aplicação desta metodologia para se investigar algumas das questões ainda pendentes no que tange à estrutura do organo-gel e o seu impacto nas reações com organo-gel. Um aspecto em particular a ser investigado consiste na determinação da combinação mais adequada de solventes para utilização no interior do gel e no meio reacional, de forma a obter-se reações com rendimentos elevados.

Neste sentido, sugere-se a utilização da metodologia proposta na repetição do experimento descrito acima, e na execução de experimentos adicionais com os seguintes objetivos:

- Medir o coeficiente de difusão de um soluto quando o solvente que participa da estrutura do gel é diferente do solvente que circunda o gel. Desta forma, vinte e cinco repetições adicionais do experimento de coeficiente de difusão são necessárias para estudar os cinco hidrocarbonetos citados neste trabalho.
- Realizar reações de esterificação com cada sistema de organo-gel com os diferentes solventes no meio reacional. Isto compreende um mínimo vinte e cinco combinações

de meios reacionais e, conseqüentemente, vinte e cinco reações adicionais a serem executadas.

Os dois conjuntos de experimentos acima permitem avaliar-se a melhor combinação de solventes para a utilização do organo-gel em sistema reacional.

Dada a abrangência de questões como a acima, entende-se que a contribuição do presente trabalho, neste aspecto em particular, deva restringir-se à proposição da metodologia para a medição do coeficiente de difusão. A aplicação e validação da mesma na investigação de questões como a levantada acima transcende o escopo do presente trabalho, devendo ser investigada em um segundo projeto de dissertação de mestrado.