

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

APLICAÇÕES SINTÉTICAS DE ENZIMAS
IMOBILIZADAS EM ORGANO-GEL E GEL DE ÁGAR

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

NEIDE QUEIROZ

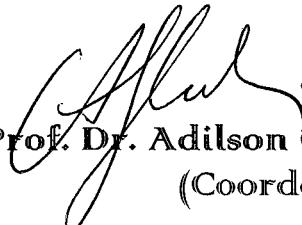
FLORIANÓPOLIS- SC
18/FEVEREIRO/97

2.577
-
APLICAÇÕES SINTÉTICAS DE ENZIMAS
IMOBILIZADAS EM ORGANO-GEL E GEL DE ÁGAR

NEIDE QUEIROZ

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

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


Prof. Dr. Adilson Curtius
(Coordenador)

Banca examinadora:

M. Graça Nascimento
Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento


Profa. Dra. Maria Risoleta F. Marques


Profa. Dra. Marina Uieara

Florianópolis, 18 de fevereiro de 1997.

"Imaginação e opinião inteligente são instrumentos poderosos para adquirir os conhecimentos científicos, rapidamente e economicamente."

(van't Hoff)

**À minha família, que mesmo ausente,
esteve presente.**

AGRADECIMENTOS

- ◆ A professora Maria da Graça Nascimento pela oportunidade, liberdade de trabalho, dedicação e orientação.
- ◆ As professoras Maria Helena Sarragiotto e Clara Megume Tanaka, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, pelo acompanhamento durante a iniciação científica, amizade e incentivo para realizar o curso de pós-graduação.
- ◆ Aos meus amigos de Maringá pelo apoio recebido e amizade.
- ◆ À UFSC pela acolhida.
- ◆ Aos funcionários da Secretária do Departamento de Química e Central de Análise, pela eficiência.
- ◆ Aos funcionários da Biblioteca Setorial pelos serviços prestados.
- ◆ Aos colegas do QMC 301 pelo convívio e amizade.
- ◆ Aos colegas de pós-graduação da UFSC pela amizade e experiências compartilhadas.
- ◆ Ao CNPq pelo apoio financeiro.
- ◆ A Novo Nordisk pela doação das enzimas.

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Enzimas.....	1
1.2. Cinética enzimática.....	3
1.3. Estruturas das enzimas.....	5
1.4. Enzimas hidrolíticas.....	7
1.4.1. Proteases.....	7
1.4.2. Lipases.....	9
1.5. Enzimas Imobilizadas.....	15
1.5.1. Imobilização de enzimas em organo-gel.....	17
1.5.2. Imobilização de enzimas em gel de ágar.....	21
1.6. Objetivos do trabalho.....	22
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
2.1. Materiais.....	23
2.2. Procedimento geral da preparação do organo-gel e gel de ágar.....	23
2.2.1. Preparação da solução de AOT 0,5 mol/L.....	23
2.2.2. Preparação geral do organo-gel.....	23
2.2.3. Preparação do diagrama de fases do organo-gel em n-heptano.....	24
2.2.4. Preparação do organo-gel para aplicações sintéticas.....	24
2.2.5. Preparação do gel de ágar.....	25
2.3. Preparação do meio reacional para aplicações sintéticas.....	26
2.3.1. Sínteses de ésteres com enzimas imobilizadas em organo-gel.....	26

2.3.2. Sínteses de ésteres e amidas com enzimas imobilizadas em gel de ágar.....	26
2.4. Purificação dos produtos.....	27
2.5. Caracterização dos compostos.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1. Diagrama de fases para o organo-gel de n-heptano.....	29
3.1.1. Regiões do diagrama.....	30
3.1.1.1. Região I.....	29
3.1.1.2. Região II.....	31
3.1.1.3. Região III.....	31
3.1.2. Análise comparativa com outros diagramas de fases.....	32
3.2. Papaína em Aplicações Sintéticas.....	35
3.2.1. Papaína em suspensão (Método de Klibanov).....	35
3.2.2. Imobilização de papaína em organo-gel de n-heptano.....	37
3.2.3. Imobilização de papaína em gel de ágar.....	38
3.3. Palatase M em aplicações sintéticas.....	39
3.4. Reutilização do organo-gel de n-heptano.....	41
3.5. Palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano.....	43
3.5.1. Esterificação do ácido láurico com diferentes álcoois.....	43
3.5.2. Esterificação do ácido hexanóico com diferentes álcoois.....	45
3.5.3. Comparação de rendimentos: ésteres derivados do ácido láurico e hexanóico.....	46
3.5.4. Estudo do efeito de ramificação e insaturação em reações de esterificação usando palatase M imobilizada em organo-gel.....	48
3.6. Imobilização de palatase M em gel de ágar.....	50
3.6.1. Efeito do pH na reação de esterificação.....	50
3.6.2. Efeito da temperatura na reação de esterificação.....	51
3.6.3. Palatase M em reações de aminólise de ésteres.....	52
3.7. Análise espectroscópicas de RMN ¹ H.....	54
3.8. Espectro no IV, RMN ¹ H e de Massas.....	56

4. CONCLUSÕES.....	64
5. PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	67

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- IUB → União Internacional de Bioquímica
- E → enzima
- S → substrato
- P → produto
- ES → enzima-substrato
- ES[#] → estado de transição da reação catalisada pela enzima
- Enz^{*} → enzima cataliticamente ativada
- S[#] → estado de transição da reação não catalisada
- ΔG → energia livre de Gibbs
- Da → daltons ($1,66054 \times 10^{-27}$ Kg)
- Z-Ala-Ome → carbobenzoxi-alanina-metil éster
- Ala → alanina
- CMC → concentração micelar crítica
- PPL → lipase pancreática do porco
- CCL → lipase *Cândida cylindracea*
- PSL → lipase das espécies *Pseudomonas*
- XAD-8 → poli(metil metacrilato) com ligação cruzada
- PE/HEMA → copolímero de poli(etileno)-g. co-hidroxietilmetacrilato
- PVC → cloreto de polivinila
- W₀ → [H₂O]/[surfactante]
- AOT → di-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio
- SANS → espalhamento de nêutrons de pequeno ângulo
- LU/g → uma unidade de lipase por grama
- RMN ¹H → ressonância magnética nuclear de prótons
- IV → infravermelho
- TMS → tetrametilsilano
- TLC → cromatografia de camada delgada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Algumas possibilidades de transformações orgânicas utilizando catálise enzimática, a partir do intermediário acil-enzima.....	2
Figura 2.	Diagrama de energia livre de uma reação catalisada (2) <i>versus</i> uma não catalisada (1).....	4
Figura 3.	Estrutura terciária de papaína.....	6
Figura 4.	Modelo espacial de papaína.....	6
Figura 5.	Catálise interfacial.....	10
Figura 6.	Técnicas utilizadas para imobilização de enzimas.....	16
Figura 7.	Estrutura do surfactante Aerosol-OT.....	17
Figura 8.	Diagrama de fases triangular para o sistema água/óleo/surfactante. A região escura representa o domínio da microemulsão.....	18
Figura 9..	Estrutura da micela reversa de Aerosol-OT com enzima.....	19
Figura 10.	Modelo proposto para a estrutura do organo-gel.....	20
Figura 11.	Unidades repetidas AB do polímero de agarose contendo o resíduo β -D-galactose ligados 1,3 (A) e o resíduo 3,6 anidro α -L-galactose ligado 1,4.....	21

Figura 12. Preparação do organo-gel.....	25
Figura 13.. Preparação do melo reacional.....	27
Figura 14. Diagrama de fases para o organo-gel de n-heptano.....	30
Figura 15. Diagrama de fases para o organo-gel de iso-octano.....	32
Figura 16. Diagramas de fases para o organo-gel de ciclo-hexano (A) e n-hexano (B).....	33
Figura 17. Sal resultante da reação entre o ácido decanóico e n-octilamina.....	36
Figura 18. Efeito da concentração de palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano, na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol.....	41
Figura 19. Reutilização de palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano na esterificação do ácido láurico com n-pentanol.....	42
Figura 20. Rendimentos obtidos para os ésteres derivados do ácido láurico (■) e ácido hexanóico (●), usando palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano, a 25 °C.....	47
Figura 21 Efeito do pH na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, catalisada por palatase M.....	50

Figura 22. Efeito da temperatura na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol.....	52
Figura 23. Espectro de absorção na região do infravermelho do laurato de n-pentila.....	56
Figura 24. Espectro de RMN ^1H do laurato de n-pentila.....	57
Figura 25. Espectro de massas do laurato de n-pentila.....	59
Figura 26. Espectro de absorção na região do infravermelho da N-octilhexamida.....	60
Figura 27.. Espectro de RMN ^1H da N-octilhexamida.....	61
Figura 28. Espectro de massas N-octilhexamida.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação das enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB).....	3
Tabela 2.	Reações de esterificação e amidação utilizando papaína como catalisador.....	36
Tabela 3.	Reações de esterificação utilizando papaína imobilizada em gel de ágar a 25 °C como catalisador.....	38
Tabela 4.	Efeito da concentração de palatase M imobilizada em organo-gel n-heptano, a 25 °C.....	40
Tabela 5.	Ésteres alifáticos derivados do ácido láurico.....	44
Tabela 6.	Ésteres alifáticos derivados do ácido hexanóico.....	46
Tabela 7.	Reações de esterificação usando palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano, a 25 °C, como catalisador	48
Tabela 8.	Reações de aminólise de ésteres usando n-octilamina como nucleófilo, em várias condições.....	53
Tabela 9.	Deslocamentos químicos dos produtos (ésteres e amidas).....	55

RESUMO

As microemulsões água-em-óleo (água + óleo + surfactante) podem ser utilizadas para formar géis elásticos e termoreversíveis pela adição de gelatina. Este sistema é chamado de organo-gel ou MBG (do inglês, "microemulsion-based gels"). As mudanças que ocorrem no organo-gel, quanto a sua estabilidade, foram observadas fixando a concentração do surfactante AOT (di-2-etilhexil sulfosuccinato de sódio) em 0,15 mol/L e variando a quantidade de água, n-heptano e gelatina. A avaliação visual á temperatura ambiente de cada organo-gel possibilitou distinguir três regiões diferentes através do diagrama de fases, que foi obtido pelo gráfico da concentração de gelatina versus W_0 . As enzimas papaína e palatase M foram imobilizadas em organo-gel de n-heptano. Verificou-se que a papaína destrói o sistema e a palatase M não o altera. Usando palatase M imobilizada em organo-gel, uma série de ésteres alifáticos foi sintetizada sob condições suaves e com bons rendimentos. Parâmetros tais como tamanho da cadeia e ramificações próximas ao centro nucleofílico do álcool foram analisados e associados com a atividade catalítica desta enzima no sistema de MBG. O organo-gel com palatase M foi reutilizado, mostrando que depois de dez conversões a enzima mantém sua atividade catalítica e o sistema permanece inalterado. O gel de ágar também foi usado para imobilizar papaína e palatase M, sendo que o suporte permaneceu estável. Estas enzimas foram usadas em reações de esterificação e aminólise de éster. Com a palatase M imobilizada em gel de ágar estudou-se o efeito do pH e da temperatura na síntese do laurato de n-pentila. O rendimento do éster não mostrou ser dependente do pH, mas dependente da temperatura.

ABSTRACT

Water-in-oil microemulsions (water + oil + surfactant) may be used to form elastic and thermoreversible gels by the addition of gelatin. This system is called "organo-gel" or MBG (microemulsion-based gels). The changes which occur in the organo-gel concerning its stability were observed by fixing the surfactant concentration, AOT (sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate) in 0,15 mol/L and altering the amount of water, n-heptane and gelatin. By visual evaluation of each system at room temperature, it was possible to characterize three different regions in the phase diagram, which was obtained by the plot of gelatin (%) versus W_o . Papain and palatase M, were immobilized in organo-gel. It was observed that papain destroys this system, and no change occurs with palatase M. A serie of aliphatic esters was obtained by the use of immobilized palatase M in organo-gel in good yields and mild conditions. Parameters such as chain length and branching near the nucleophilic center of the alcohol were analysed and associated with the catalytic activity of this enzyme in MBG. The organo-gel with palatase M was reutilized and after 10 conversions the enzyme was still active and the system remained unchanged. The agar gel, a very stable support, was also used to immobilize papain and palatase M. These enzymes were used in esterification and ester aminolysis reactions. Temperature and pH effects were studied in the n-penthyl laurate synthesis using palatase M immobilized in agar gel. The yields in ester synthesis showed to be highly temperature dependent, having no pH dependency.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas

As enzimas podem ser definidas como biomoléculas formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, possuindo atividade catalítica em sua forma nativa.¹ Estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são superiores aos catalisadores produzidos pelo homem.² Por definição, um catalisador é qualquer substância que altera a velocidade de uma reação química sem sofrer mudanças. Por exemplo, as enzimas permanecem na mesma forma (conformação e integridade química) depois da reação catalítica, requisito obrigatório para sua eficiência. Certamente como catalisadores, as enzimas necessitam estar presente somente em pequenas quantidades no meio reacional, possuindo as seguintes características:³

- Aceleram a velocidade da reação, operando em condições suaves³ (atuam em faixa de pH de 5-8, tipicamente ao redor de 7, e em temperaturas na faixa de 20-40 °C, preferencialmente próximo de 30 °C).⁴
- Podem ser altamente seletivas para substratos e éstereosseletivas em relação ao que catalisam.³
- A atividade catalítica pode ser fortemente influenciada pela concentração de substrato, produto ou outras espécies presentes no meio reacional.³
- Catalisam as reações normalmente sobre as mesmas condições ou similares aos dos organismos vivos (vegetal ou animal).³
- São geralmente instáveis (com relação aos catalisadores produzidos pelo homem),³ porque necessitam de controle de pH e temperatura, isto é, temperatura elevada e pH extremo leva a desativação da enzima.⁴
- São quirais, e podem apresentar alta enantioseletividade.³

Entre todos os tipos de reações catalisadas por enzimas, as transformações hidrolíticas, envolvendo a formação de ligações amídicas e éster podem ocorrer facilmente usando proteases, esterases ou lipases. Quando a enzima está operando em um ambiente que tem baixa concentração de água, qualquer outro nucleófilo pode competir com a água e formar o produto a partir de um intermediário acil-enzima, levando assim a várias transformações sinteticamente úteis (Figura 1). Durante o curso destas reações, qualquer tipo de quiralidade no substrato é reconhecido pela enzima, e isto causa uma preferência para duas direções possíveis com relação à estereoquímica da reação. O valor desta discriminação é um parâmetro decisivo, já que permite a seletividade da reação.⁴

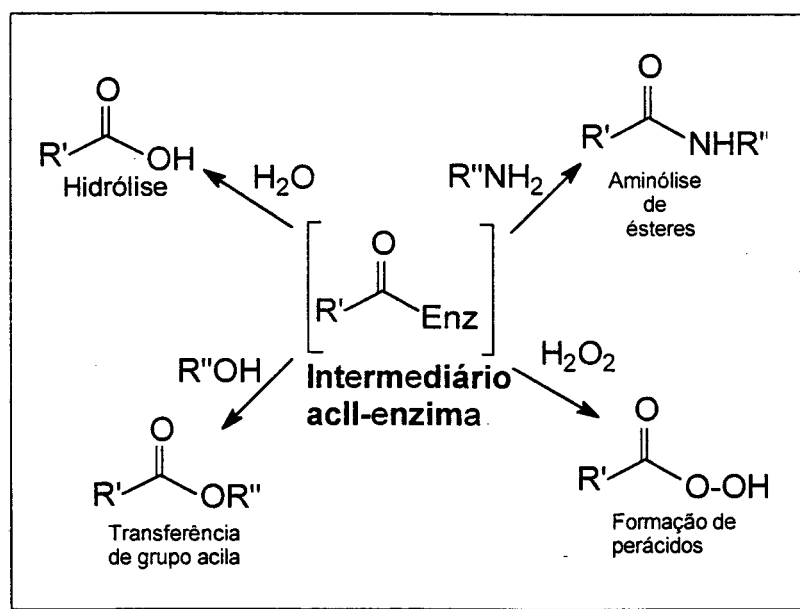


Figura 1. Algumas possibilidades de transformações orgânicas utilizando catálise enzimática, a partir do intermediário acil-enzima.

Existem catalogadas mais de 2000 enzimas, sendo que cada uma aceita um certo substrato e catalisa uma reação em particular. Elas podem ser classificadas de acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB) em seis grupos, como mostrado na Tabela 1.⁵

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB).

Grupo de Enzimas	Tipo de reação
Oxidoredutases	Catalisam reações de oxi-redução envolvendo oxigenação, tal como: $\text{CH} \rightarrow \text{C-OH}$
Transferases	Catalisam a transferência de grupos, tais como acila, açúcares, fosforila e aldeído ou cetona de uma molécula para outra.
Hidrolases	Promovem a hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, éteres, peptídeos e outros contendo funções C-N. Hidratação das ligações C=C e epóxidos.
Liasas	Catalisam adições, geralmente de HX, a dupla ligações tais como C=C, C=N e C=O, e reações reversas.
Isomerases	Catalisam a migração de dupla ligações ou funções oxigenadas, racemização e rearranjos.
Ligases	Catalisam a formação de C-O, C-S, C-N, C-C e ligações de éster fosfato.

1.2. Cinética enzimática

Entre as teorias e racionalizações que têm sido desenvolvidas para entender a catálise enzimática, os modelos mais ilustrativos são o mecanismo da chave e fechadura desenvolvido por Emil Fischer em 1894 e o mecanismo do encaixe induzido de Koshiand Jr., desenvolvido no final da década de sessenta.⁴ Para explicar a enantiosseletividade das enzimas, Ogston introduziu a teoria da regra de três pontos.⁴

Muitas reações seguem o comportamento cinético de Michaelis-Menteñ, teoria proposta em 1913, e ampliada por Briggs e Haldane. Esta considera que a enzima (E) combina-se primeiramente com o substrato (S) para formar o complexo ES; este se rompe, então, em uma segunda etapa, para formar a

enzima livre e o produto.² O conceito básico proposto por Eyring em 1935,³ é que para uma reação acontecer as moléculas dos reagentes devem vencer uma barreira de energia livre. Este conceito, tem fornecido as bases para aproximações quantitativas de cinéticas enzimáticas. Como em qualquer reação catalítica, uma enzima acelera a velocidade de reação diminuindo a barreira energética entre reagentes e produtos.³ A origem deste poder catalítico tem sido atribuída à estabilização do estado de transição da reação pela enzima, assumindo que o catalisador liga-se mais fortemente no estado de transição do que no estado fundamental do substrato, por um fator aproximadamente igual a velocidade de aceleração.⁴

A **Figura 2** mostra o perfil de uma reação catalisada por enzima (2) comparada com um perfil de reação não catalisada (1).⁶

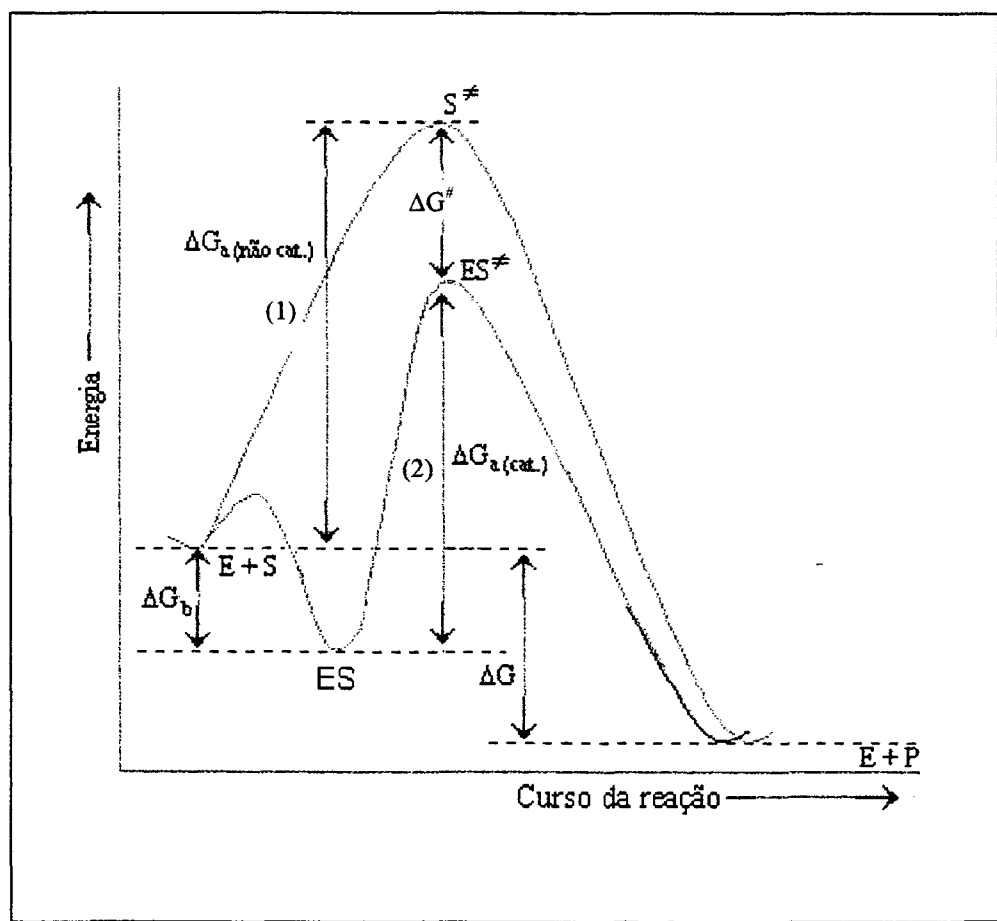


Figura 2. Diagrama de energia livre de uma reação catalisada (2) versus uma não catalisada (1).

A análise da **Figura 2**, mostra que o complexo enzima-substrato (ES) tem uma energia de ativação menor do que a enzima isolada (E) e o substrato (S). O estado de transição da reação catalisada pela enzima (ES^\ddagger) também tem uma energia de ativação menor do que o estado de transição da reação não catalisada (S^\ddagger). O decréscimo em energia (ΔG^\ddagger) do estado de transição para uma reação catalisada pela enzima excede o decréscimo em energia (ΔG_b) que ocorre sobre a ligação do substrato à enzima. A formação do complexo "enzima substrato" conseqüentemente diminui a energia de ativação (ΔG_a), e deste modo aumenta a velocidade da reação. A diferença em energia (ΔG) entre os reagentes e produtos (P) é a mesma para uma reação catalisada ou não. Desta maneira, a enzima não altera a constante de equilíbrio da reação.⁶

1.3. Estruturas das enzimas

A função de uma proteína pode somente ser entendida em termos de sua estrutura, que é, a relação tridimensional entre os átomos componentes da proteína. A sequência de aminoácidos é chamada de estrutura primária. A natureza das relações espaciais de aminoácidos próximos, estrutura secundária. A disposição espacial da cadeia polipeptídica, estrutura terciária e as relações espaciais entre duas ou mais cadeias polipeptídicas, estrutura quaternária.⁷

As enzimas possuem várias propriedades que fazem seu uso muito atrativo como catalisador para biotransformações. Entretanto, elas têm estruturas complexas, sendo que a elucidação estrutural teve um grande progresso durante a década de 60, e hoje é possível responder questões sobre a relação estrutura-atividade das enzimas. Mesmo com o avanço na elucidação estrutural, nem todas as enzimas têm sua estrutura tridimensional definida. Como exemplo, pode-se citar a papaína, cuja estrutura tridimensional foi determinada por cristalografia de raio-X. Na **Figura 3** as posições dos átomos de carbono α dos resíduos aminoácidos são mostrados⁸ e na **Figura 4** tem-se o modelo espacial da enzima.⁹

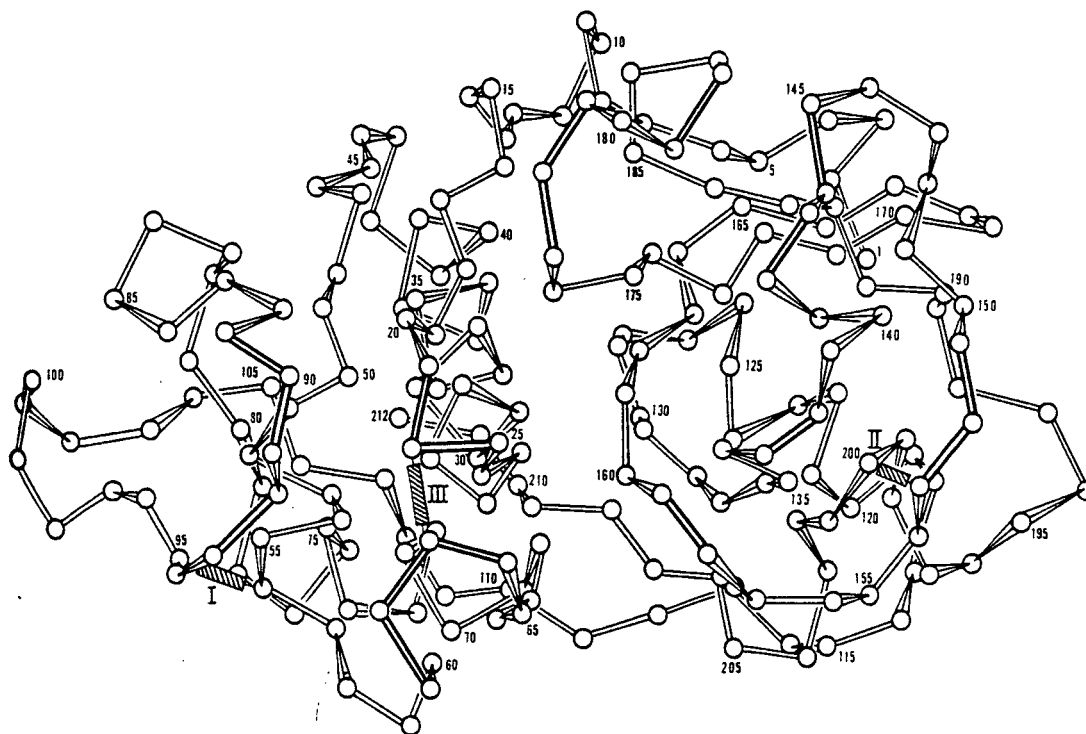


Figura 3. Estrutura terciária de papaína, mostrando somente a posição do átomo de carbono α de cada resíduo de aminoácido.⁸

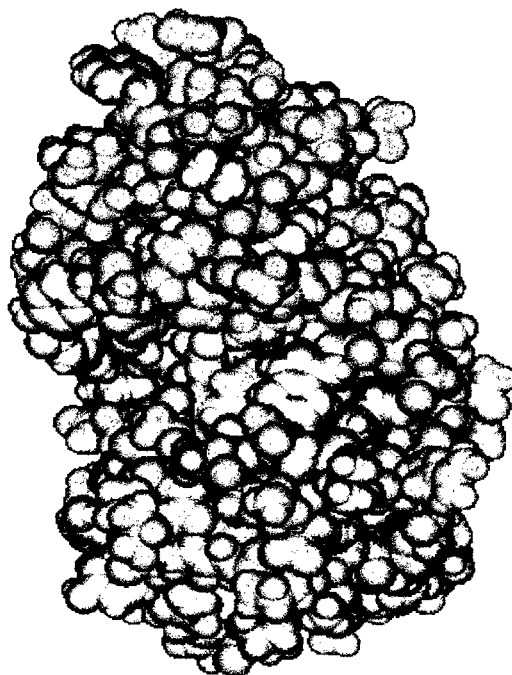


Figura 4. Modelo espacial de papaína.⁹

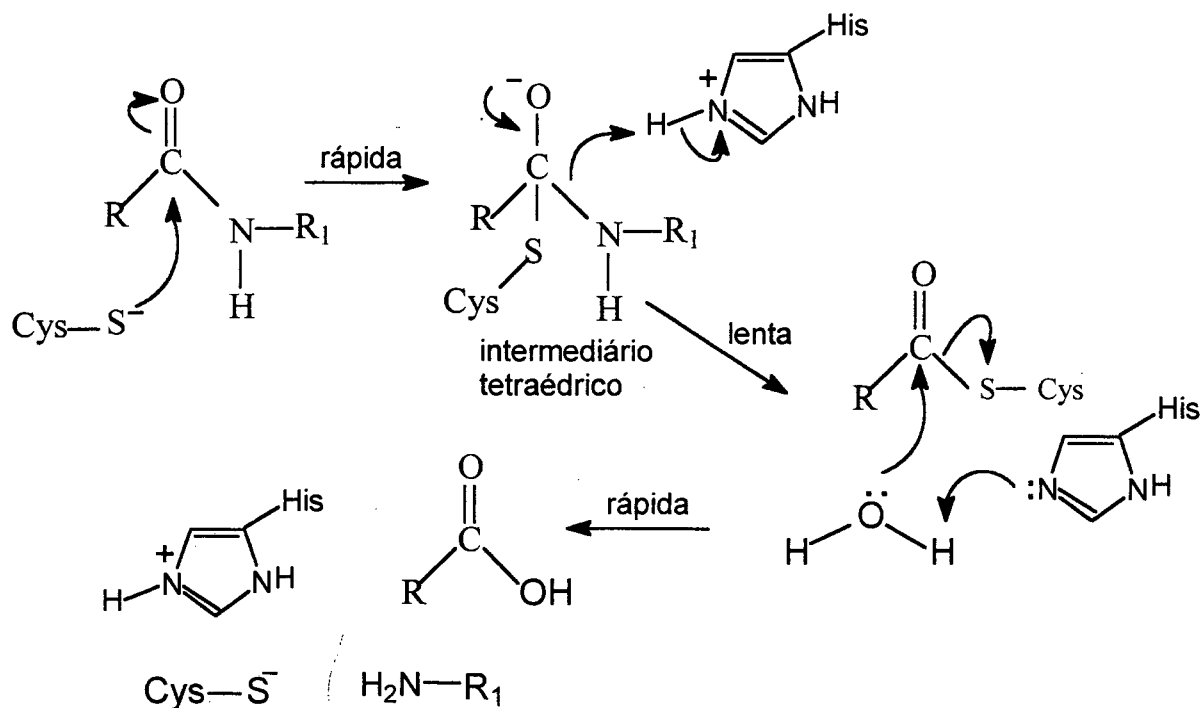
A utilidade e a praticidade do uso de enzimas como catalisadores quirais em síntese orgânica está bem documentada,¹⁰ sendo que as enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. As subclasses de enzimas hidrolíticas, que catalisam a hidrólise e formação da ligação éster e amida, com maior interesse são as amidases (acilases, aminopeptidase, penicilina acilase), proteases (α -quimotripsina, papaína, pepsina), esterases (α -quimotripsina, papaína, acetilcolina esterase) e lipases (*Candida cylindracea*, *Mucor miehei* e etc).³

Um destaque maior será dado para as proteases e lipases, devido a relação com este trabalho.

1.4.1. Proteases

As proteases são uma classe de enzimas que catalisam a quebra de proteínas em frações peptídicas menores e em aminoácidos.¹¹ Têm sido utilizadas em sínteses de peptídeos e ésteres em solventes orgânicos. Pode-se citar como exemplos, a bromelina, ficina, α -quimotripsina, papaína e pepsina.¹²

Desta família, a papaína é uma das mais estudada, sendo que a sua estrutura terciária (**Figura 3**),⁸ especificidade e mecanismo de ação já são conhecidos (**Esquema 1**).⁶ É uma enzima extraída do látex do mamão, composta por uma cadeia de 212 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de 23 406 Da. A molécula de papaína contém sete resíduos de cisteína, seis dos quais formam três ligações de dissulfeto, sendo que a cisteína-25 participa do sítio ativo, juntamente com histidina e triptofano.¹³



R e R₁ = cadeia alquílica

Esquema 1. Mecanismo de ação de papaína.⁶

Algumas sínteses de peptídeos foram realizadas com sucesso, usando papaína como catalisador e aminoácido livre como nucleófilo. Condições ótimas de reação (pH, concentração de nucleófilo e do éster, tempo de reação) foram estabelecidas para a reação modelo entre CBz-Ala-Ome e Ala livre. Usando estas condições otimizadas, vários peptídeos foram sintetizados, com rendimentos na faixa de 19% a 79%, dependendo da estrutura do aminoácido.¹⁴ Esta enzima também catalisa a síntese de peptídeos com D-aminoácidos.¹⁵

As enzimas podem atuar não somente em água, mas também em vários solventes orgânicos. Uma ampla variedade de aminoácidos N-substituídos foram convertidos em seus correspondentes ésteres, usando metanol 95 % e outros álcoois como solventes orgânicos, utilizando papaína imobilizada como catalisador. Os aminoácidos esterificados foram obtidos como bons rendimentos.¹⁶

1.4.2. Lipases

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos para formar di e mono-glicerídeos, glicerol e ácidos graxos.¹⁷ Elas têm sido isoladas de uma ampla variedade de tecidos de animais e plantas, podendo ser também produzidas por processos de fermentação usando várias espécies de microorganismos (fungos e bactérias).⁵ São classificadas como serinas hidrolases, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos.¹⁸

Há vários anos as proteases e carbohidrases estão sendo usadas industrialmente e monopolizam a maior parte do mercado de enzimas. As lipases representam menos de 5% de todas as enzimas usadas nas indústrias, mas tem um grande potencial para serem utilizadas em diversas aplicações, tais como:¹⁷

- As lipases hidrolisam o leite gorduroso para formar ácidos graxos. Usando diferentes lipases, obtem-se ácidos de diferentes comprimentos de cadeia, os quais formam os produtos finais com um sabor característico.
- Outras enzimas são bastante usadas em casa como produtos de limpeza. Um grande objetivo, é o desenvolvimento de lipases que atuam em condições alcalinas, como removedor de manchas.
- Algumas gorduras são mais valiosas do que outras por causa de sua estrutura. Gorduras de menor valor comercial podem ser convertidas em compostos mais úteis usando métodos químicos, mas estes tendem a formar produtos ao acaso. A transesterificação de óleos mais baratos, catalisada por lipases podem ser usada, por exemplo, para produzir manteiga de cacau da fração palmítica.
- A lipase de *Rhizomucor* (formalmente *Mucor*) *miehei* tem sido usada como catalisador para formar o miristato de isopropila, palmitato de isopropila e o palmitato de 2-etilhexila, que são usados em produtos como óleo de banho e loção bronzeadora.
- Como as outras enzimas, as lipases têm aplicações na produção de compostos quirais para a agroquímica e para a indústria farmacêutica, na produção de materiais opticamente puros e na resolução de racematos, após as sínteses.

Uma das características mais importantes das lipases é o fenômeno conhecido como ativação interfacial.¹⁹ A **Figura 5** representa a catálise interfacial e mostra que a principal diferença entre lipases e esterases é a interação físico-química com seus substratos.³ As esterases mostram uma atividade normal, dependendo da concentração do substrato (lipídeo), isto é, uma concentração mais alta de substrato leva a um aumento na atividade da enzima. Este aumento ocorre até a velocidade tornar-se independente da concentração do substrato e aproximar-se de uma velocidade constante, chamado “efeito de saturação da enzima”. Ao contrário, as lipases apresentam uma pequena atividade em concentrações muito baixa de substrato e em soluções aquosas. Quando a concentração de substrato é alta o suficiente para formar micelas de lipídeo (essencialmente na interface óleo-água), a enzima torna-se cataliticamente ativada.^{3,4} O mecanismo pelo qual esta ativação ocorre é uma área de intenso estudo e ainda não está completamente entendido.¹⁷

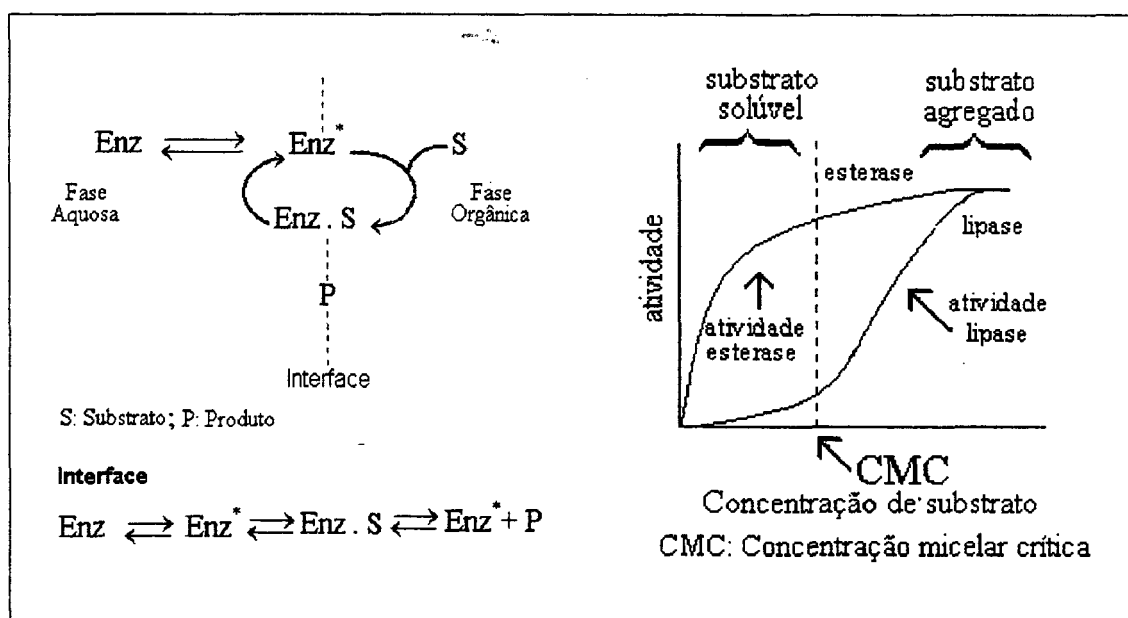


Figura 5. Catálise interfacial

As vantagens de se trabalhar com lipases se deve principalmente ao fato de não requerem cofatores; serem relativamente de baixo custo; serem regioespecíficas para a posição 1,3 de triglicerídeos; estereosseletivas e atuarem

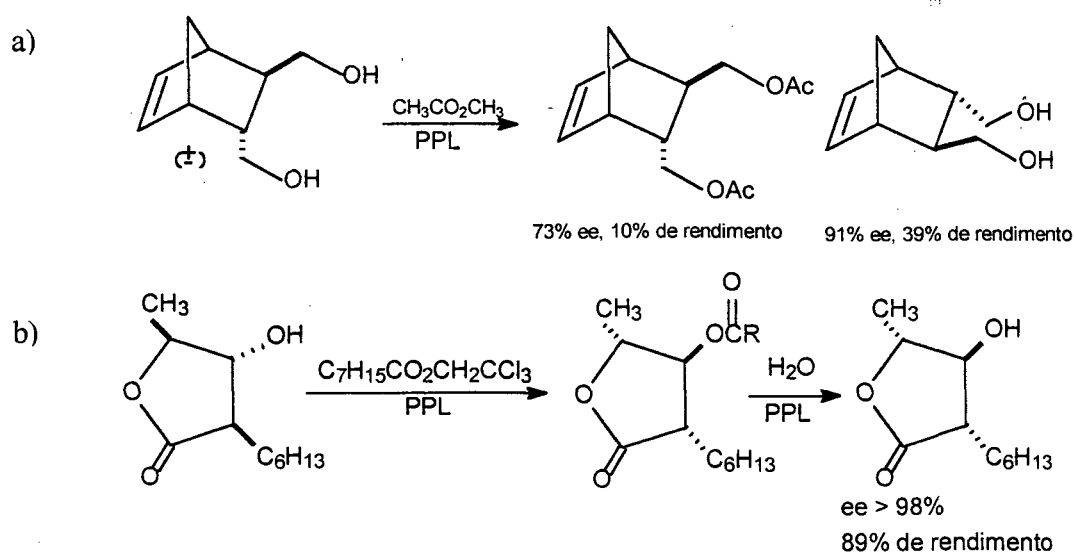
em faixa de pH bastante ampla e temperatura, variando de ambiente a 70 °C.⁵ Exemplos de lipases de origem animal e microbial que são comumente usadas em sínteses orgânicas são citadas a seguir:

- *Lipase Pancreática do Porco - PPL*

A PPL de origem comercial usada em síntese orgânica geralmente não é pura, podendo conter outras enzimas como α -quimotripsina e esterase comercial. A PPL pura foi usada em síntese e mostrou ser seletiva para ésteres de álcoois primários.²⁰

Uma aplicação típica da PPL para a resolução de racematos, é a hidrólise enantioselectiva de ésteres de álcool epoxi, catalisada pela enzima.²¹ Alguns estudos realizados com vários ésteres derivados de álcoois primários, mostraram que a enantioselectividade de PPL depende do tamanho do grupo acila, sendo que os derivados de proprionatos apresentaram os melhores resultados.²²

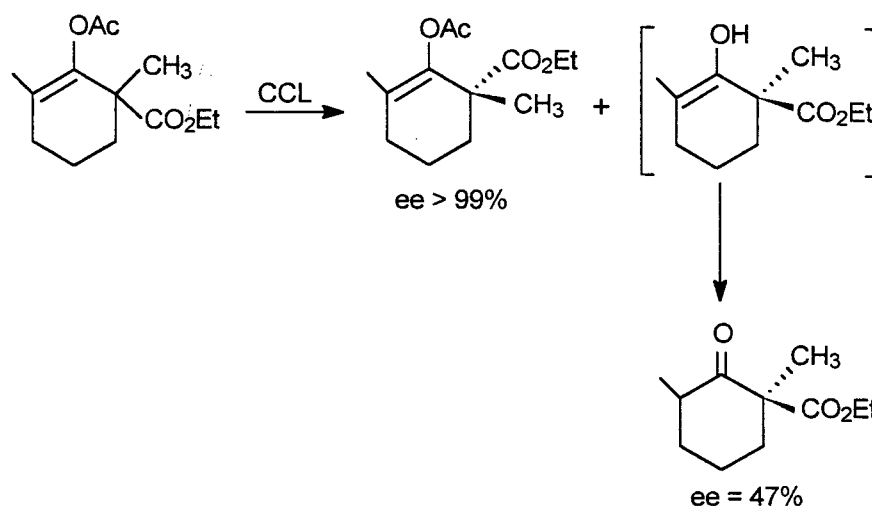
A PPL também foi usada em solventes orgânicos para formação de amidas cíclicas,^{23,24,25} lactonas opticamente ativas^{26,27} e poliésteres^{28,29} e na resolução do (\pm)-sulcatol.³⁰ Dois exemplos de reações utilizando PPL são mostrados no **Esquema 2a**³¹ e **2b**.³²



Esquema 2. Exemplos de reações catalisadas por PPL, em meio orgânico.

- *Lipases das espécies Candida*

As lipases das leveduras *Candida lipolytica*, *Candida antarctica* e *Candida cylindracea* (CCL), atualmente chamada *Candida rugosa*, são comumente usadas em síntese orgânica. Como exemplo de reação, pode-se citar a hidrólise de enol éster catalisada por CCL (**Esquema 3**).³³ Esta enzima também foi usada em solventes orgânicos para a resolução de ácidos α -halogenados de cadeia aberta via esterificação, e para a resolução de álcoois secundários de cadeia aberta via transesterificação.³⁴



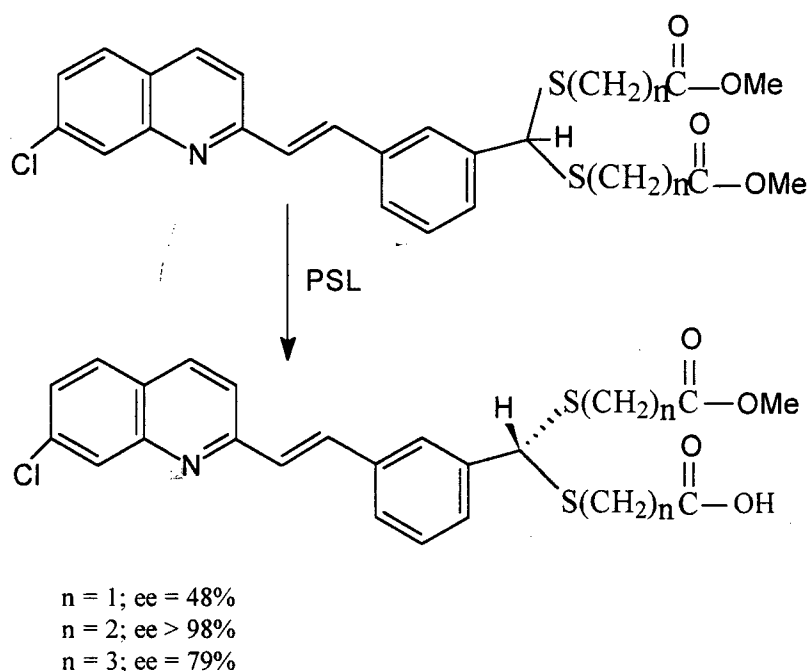
Esquema 3. Hidrólise de enol éster catalisada por CCL.

- *Lipases das espécies Pseudomonas - PSL*

As lipases isoladas de diferentes espécies de *Pseudomonas* (PSL) são altamente seletivas, especialmente para hidrólise dos ésteres de álcoois secundários e para as reações reversas correspondentes.³⁵ Estas lipases possuem seletividade excepcionalmente alta com relação aos substratos de cadeia aberta com centro quiral localizado próximo e/ou afastado do centro reacional (**Esquema 4**).³⁶

Todas as lipases das espécies de *Pseudomonas*, bruta ou pura, possuem uma preferência estereoquímica para a configuração (R) de álcoois secundários.³⁷

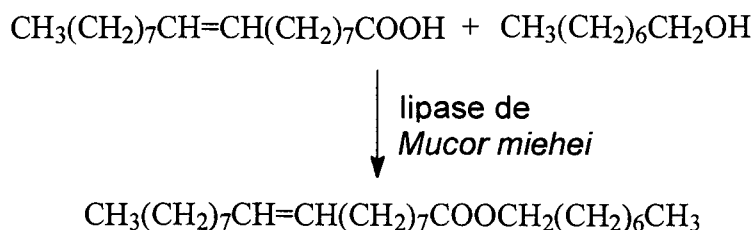
A eficiência e estabilidade da enzima pode ser melhorada quando imobilizada em XAD-8,^{38,39} celite⁴⁰ e gelatina.⁴¹ O baixo custo, alta seletividade e estabilidade da PSL fazem desta enzima um reagente útil para sínteses orgânicas.³



Esquema 4. Hidrólise enantioselectiva de ésteres com centro pró-quiral afastado, usando PSL como catalisador.

- *Lipases de esterases de outras espécies*

As lipases das espécies *Mucor* tais como *Mucor miehei* e *Mucor javanicus* foram recentemente usadas em síntese.^{42,43} Sonnet mostrou a aplicação da lipase de *Mucor miehei* para as resoluções de álcoois alifáticos.⁴² O **Esquema 5** mostra a síntese do oleato de n-octila com a lipase de *Mucor miehei* imobilizada em copolímero de poli(etileno)-g.co-hidroxietilmetacrilato (PE/HEMA).⁴⁴

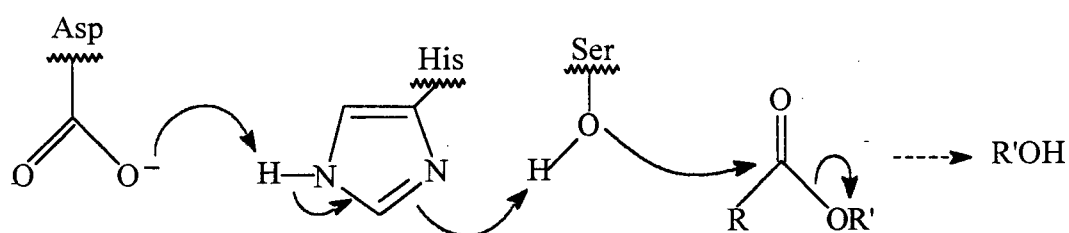


Esquema 5. Reação de esterificação catalisada por lipase de *Mucor miehei*.

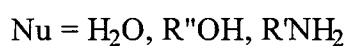
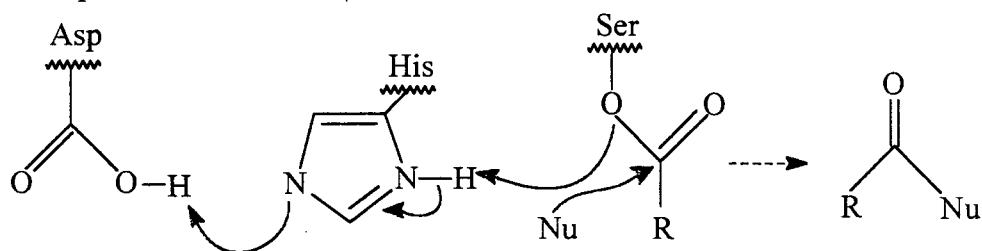
A lipase triacilglicerol *Mucor miehei* é uma proteína de cadeia peptídica simples, composta por 269 resíduos de aminoácidos (Peso molecular de uma cadeia não modificada é de 29472 Da).⁴⁵ A estrutura tridimensional da lipase de *Mucor miehei* foi determinada e contém ácido aspártico-histidina-serina (Asp-His-Ser) no sítio ativo (característico de serinas hidrolases).¹⁹

O mecanismo de ação (**Esquema 6**), elucidado em detalhes é o da serina hidrolase. Ela possui dois grupos adicionais (Asp e His) localizados junto ao resíduo serina, formando a tríade catalítica.⁴

Etapa I



Etapa II



Esquema 6. Mecanismo de ação de serina hidrolase.

A enzima palatase M (nome comercial), utilizada neste trabalho, é uma lipase fúngica, produzida mediante a fermentação de um cepa selecionada do fungo *Mucor miehei*. Ela possui uma especificidade para as posições 1,3 de triglicerídeos e atividade frente a ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas e longas. A preferência pelos glicerídeos de cadeia curta aumenta a medida que se diminui o pH.⁴⁶

1.5. Enzimas imobilizadas

A grande especificidade de ação das enzimas e as condições muito brandas nas quais elas atuam, conferem-lhes uma vantagem única sobre os catalisadores químicos comuns. As enzimas liofilizadas são catalisadores convenientes para muitas aplicações sintéticas. Porém, às vezes as partículas da enzima agregam-se e prendem-se à parede do reator, especialmente quando a enzima é hidratada para se obter uma melhor atividade catalítica. O uso das preparações enzimáticas cresceu consideravelmente em numerosos setores, mas o custo elevado dos processos de extração e purificação das macromoléculas, e sua grande instabilidade em solução, ainda são um obstáculo à recuperação do biocatalisador após sua utilização. Estes problemas podem ser minimizados pela imobilização da enzima sobre um suporte sólido,⁴⁷ que é acompanhado normalmente, de um aumento na estabilidade da enzima, facilitando seu emprego por longos períodos, sem renovação do catalisador.⁴⁸

A atividade das enzimas está ligada à manutenção da integridade de sua conformação terciária, em particular a nível de seu sítio ativo. Os processos de imobilização devem, portanto, fazer uso de métodos brandos e bem controlados, respeitando a estrutura nativa da enzima. Para os enzimologistas, a fixação em suporte imita aproximadamente as condições da célula viva, onde a enzima encontra-se frequentemente ligada à membrana ou em organelas intracelulares.⁴⁸

Por razões práticas e econômicas, é frequentemente vantajoso usar enzimas imobilizadas sobre suportes sólidos, porque são particularmente fáceis de manusear e podem ser recuperados em qualquer tempo das soluções. Além

disto, muitas enzimas imobilizadas podem ser repetidamente utilizadas sem perda considerável da atividade. Alguns sistemas já testados são, por exemplo, PPL sobre Eupergit C e a α -quimotripsina sobre sílica. Outros suportes úteis incluem polímeros metacrílicos contendo grupos hidroxilas, Celite, PVC, quitosana, quitina e agarose. Outras técnicas utilizadas são a microencapsulação, ou inclusão de enzimas em membranas de diálise, o qual é recomendado como um procedimento operacionalmente simples e efetivo. Outras técnicas, as quais vencem os problemas relacionados com a baixa solubilidade dos substratos são o uso de surfactantes e micelas reversas.³⁵

A **Figura 6** mostra alguns procedimentos que vem sendo utilizados nos últimos anos para a imobilização de enzimas.⁴

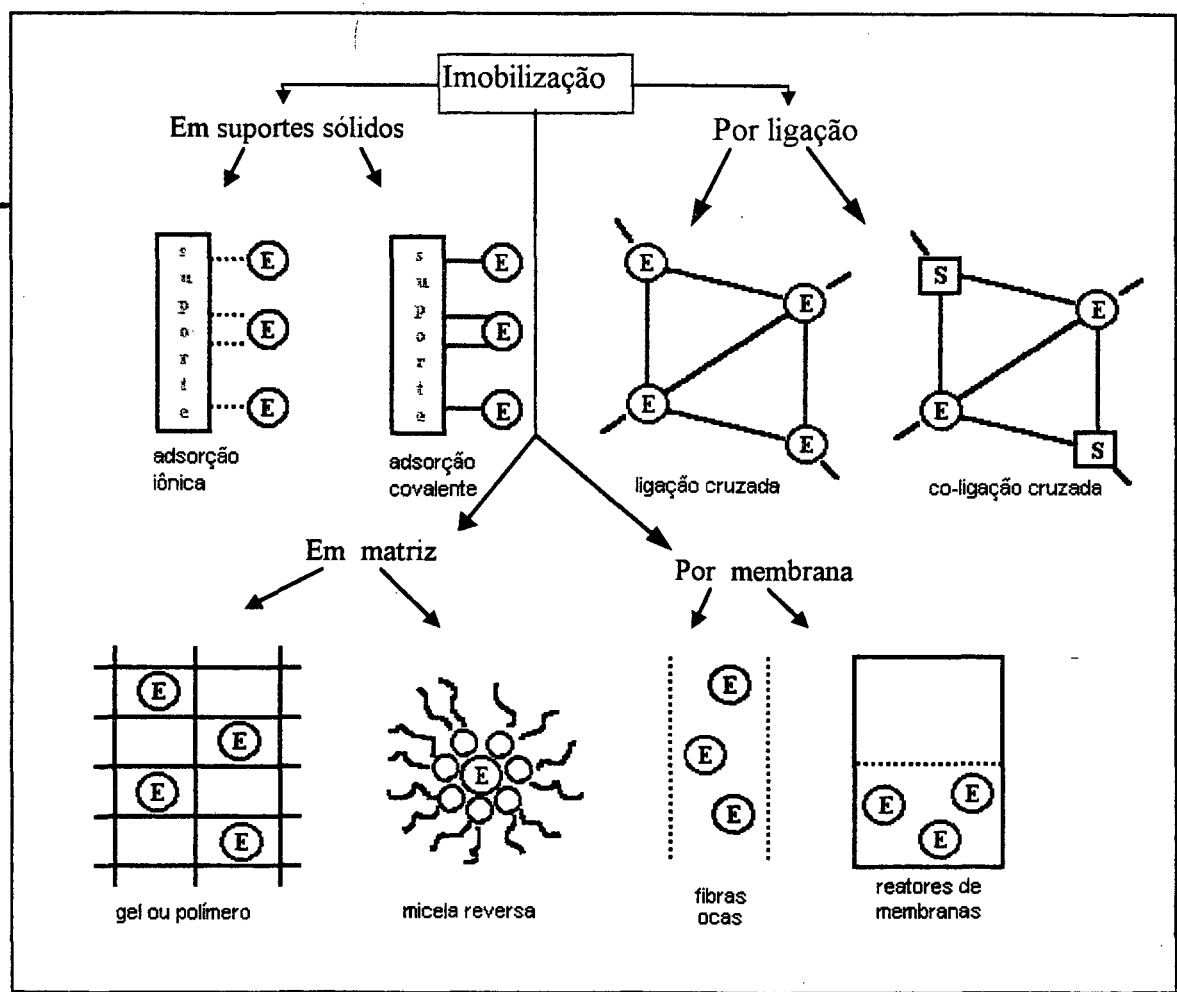


Figura 6. Técnicas utilizadas para imobilização de enzimas. E = Enzima, S = suporte.

Entre as várias técnicas já citadas, abordaremos duas que foram usadas neste trabalho: imobilização em organo-gel e em gel de ágar.

1.5.1. Imobilização de enzimas em organo-gel

As microemulsões são misturas macroscopicamente homogêneas e isotrópicas de água, óleo (solvente orgânico) e surfactante.⁴⁷ Existem basicamente dois tipos de microemulsão: microemulsão óleo/água (o/a) e microemulsão água/óleo (a/o).⁴⁹

As microemulsões a/o são fluidos sob condições normais, e consistem de gotas esféricas de água de dimensões nanométricas polidispersas em um meio contendo óleo, estabilizado por uma monocamada do surfactante na interface água-óleo. Elas são termodinamicamente estáveis e podem ser formadas apenas com a mistura de seus componentes. Para as microemulsões água/óleo, os parâmetros W_0 ($W_0 = [H_2O]/[surfactante]$) e a concentração do surfactante definem sua composição. O surfactante aniônico Aerosol-OT [AOT, di-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (**Figura 7**)], é o mais apropriado para a formação da microemulsão a/o.⁵⁰

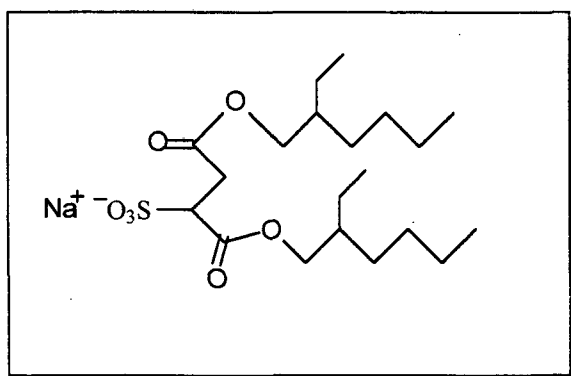


Figura 7. Estrutura do Surfactante Aerosol-OT

Em determinadas condições da microemulsão a/o, ocorre a formação de micelas reversas (agregados esferoidais), que dependem da concentração de água, óleo e surfactante. Na prática, a micela reversa é uma das possibilidades que o sistema de microemulsão pode assumir (**Figura 8**).⁵¹

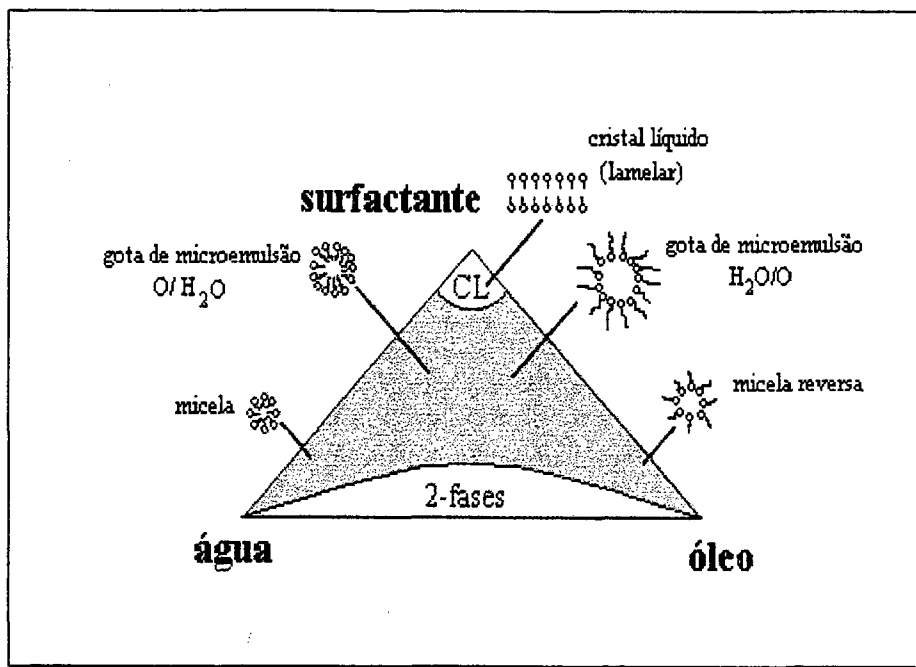


Figura 8. Diagrama de fases triangular para o sistema água/óleo/surfactante. A região escura representa o domínio da microemulsão.⁵¹

Nas micelas reversas a estrutura do agregado consiste de um núcleo polar formado pelos grupos hidrofílicos do surfactante, e na superfície situam-se os grupos hidrofóbicos em contato com o solvente orgânico (**Figura 9**).⁵²

A solubilização de enzimas em microemulsões água/óleo tem sido estudada nos últimos anos.⁵³ Foi demonstrado que enzimas solubilizadas dentro de micelas reversas retêm completamente a sua atividade catalítica e a especificidade frente a diversos substratos.⁵³

As microemulsões água/óleo de AOT podem ser utilizadas para formar géis elásticos e termoreversíveis pela adição de gelatina, que induz no ponto de saturação, a formação de uma microestrutura estável na qual as micelas reversas (ou microgotas de água) são unidas por canais de gelatina. Este sistema é chamado de organo-gel ou MBG (do inglês, "microemulsion-based gels"). As mudanças que ocorrem na estrutura deste sistema variam dependendo da quantidade dos seus componentes, permitindo-se obter diagramas de fases. Estes, por sua vez, possibilitam estudar os mecanismos de gelatinização.⁵³

A rigidez dos organo-géis, é controlada pela quantidade de gelatina adicionada no sistema. Em concentrações mais elevadas de gelatina, eles mostram extraordinária estabilidade quando cortados em pequenos pedaços e incubados em solventes orgânicos apolares. Sob estas condições este sistema não se dissolve em solventes hidrocarbônicos e nem perde surfactante ou água para a fase orgânica externa.⁵⁴

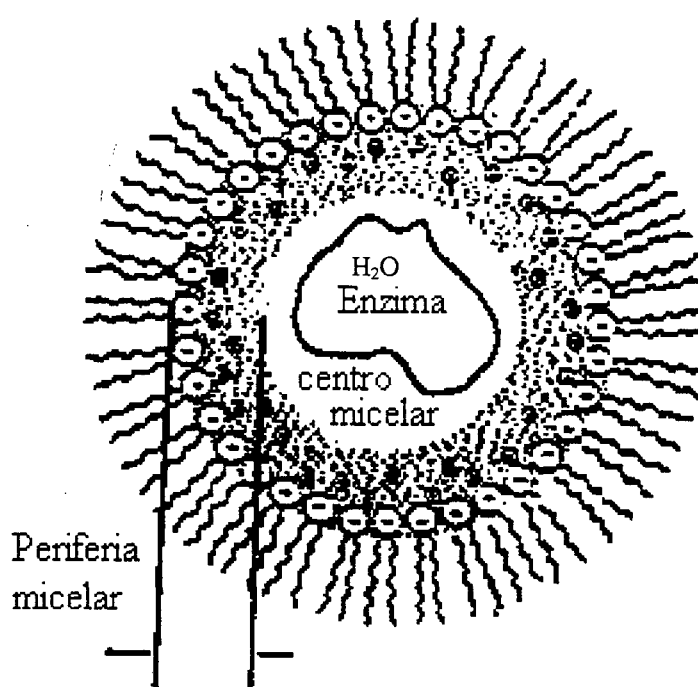


Figura 9. Estrutura da micela reversa de Aerosol-OT com enzima.

A gelatina, um dos principais componentes do organo-gel, possui uma estrutura de tripla hélice, composta de três cadeias polipeptídicas separadas, com peso molecular de ~ 110 000 Da. É um material protéico, derivado do colágeno, sendo uma substância de grande importância comercial.⁵⁵ O conteúdo exato de aminoácidos das cadeias polipeptídicas varia de um tipo de colágeno para outro, mas elas sempre contêm grande quantidade de prolina, hidroxiprolina e glicina. Devido as suas propriedades físicas, possui habilidade para formar

géis elásticos quando suas soluções quentes são resfriadas. No processo de resfriamento a viscosidade das soluções de gelatina aumenta rapidamente, mas não parece existir qualquer ponto particular no qual ocorre a gelatinização.⁵⁶

Estudos de SANS (Espalhamento de nêutrons de pequeno ângulo), têm indicado que a estrutura macroscópica para a composição do organo-gel consiste de um rede de canais de gelatina e água, coexistindo com as gotas de água da microemulsão, todas estabilizadas por uma monocamada de surfactante AOT (Figura 10).⁵⁷

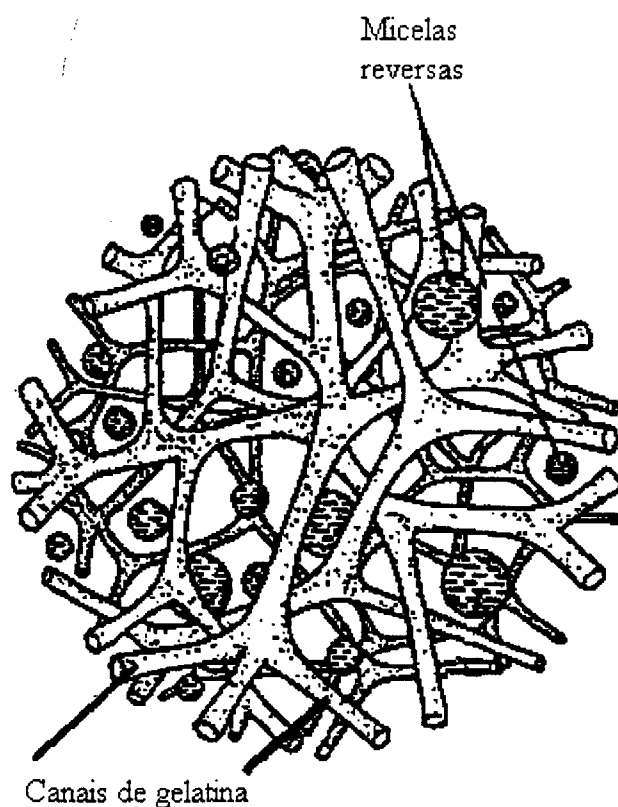


Figura 10. Modelo proposto para a estrutura do organo-gel.

As moléculas imobilizadas em organo-gel, evitam o contato direto com o meio orgânico desfavorável e assim ficam protegidas contra a desnaturação.⁵⁸

1.5.2. Imobilização de enzimas em gel de ágar

Entre os vários suportes que estão descritos na literatura, para imobilizar enzimas deve-se mencionar o gel de ágar.

O ágar é uma mistura complexa de compostos polissacarídeos derivados de certas algas vermelhas. O principal componente gelificante do ágar é a agarose que apresenta um peso molecular em torno de 100 000 Da. A agarose é um polímero neutro, basicamente um dissacarídeo que apresenta repetições da molécula de galactose, onde há resíduos alternados da 3,6-anidro-L-galactose e 3,6-anidro-D-galactose (**Figura 11**).⁵⁵ Em função de suas propriedades, é muito utilizada na indústria de alimentos como agente gelificante e/ou espessante.⁵⁹

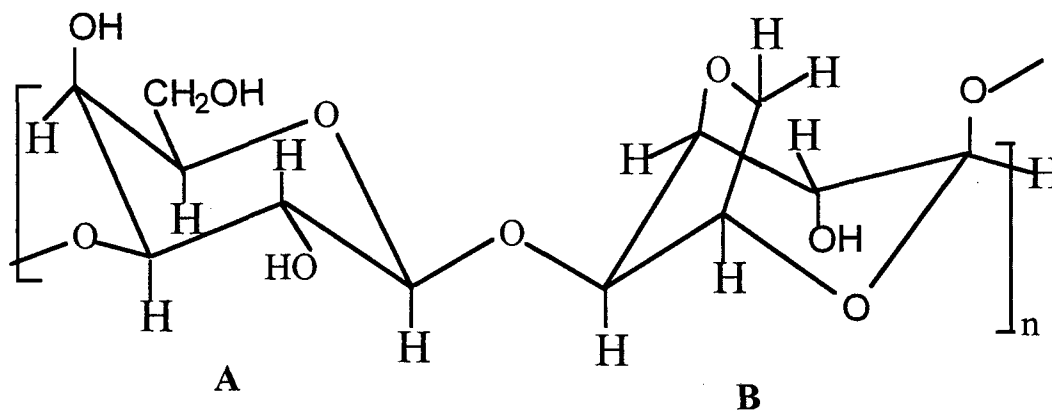


Figura 11. Unidades repetidas AB do polímero de agarose contendo o resíduo β -D-galactose ligados 1,3 (A) e o resíduo 3,6 anidro α -L-galactose ligado 1,4 (B).

Os géis de agarose e de outros polissacarídeos tem sido frequentemente usados para imobilização covalente de enzimas, em meio aquoso e em menor escala, em meio orgânico.⁶⁰

1.6. Objetivos do trabalho

Este trabalho teve como objetivos:

- Construir o diagrama de fases do organo-gel de n-heptano, para posteriores estudos físico-químicos nas regiões transparentes (por ex. estudos cinéticos e de fluorescência).
- Utilizar do organo-gel de n-heptano, como suporte para a imobilização de enzimas (por ex. papaína e palatase M).
- Utilizar o gel de ágar como suporte para a imobilização de enzimas (por ex. papaína e palatase M).
- Estudar a eficiência catalítica da papaína e palatase M, imobilizadas em organo-gel e gel de ágar.
- Reutilizar do organo-gel em reações de esterificação de ácidos alifáticos, catalisada por palatase M.
- Estudar efeitos de ramificação, comprimento da cadeia alquílica e insaturação dos álcoois utilizados nas reações de esterificação do ácido decanóico e hexanóico.
- Verificar o efeito do pH e da temperatura em reações de esterificação dos ácidos decanóico e hexanóico catalisada por palatase M.
- Estudar reações de aminólise de éster (hexanoato de tricloroetila e butirato de etila), com enzimas em suspensão, imobilizadas em organo-gel e gel de ágar, em meio orgânico (n-heptano).

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais

As enzimas utilizadas neste trabalho foram: papaína (Sigma, Lote 83H7030), com atividade de 21 unidades/mg de sólido e palatase M 1000L (Novo Nordisk A/S), com atividade de 1000 LU/g. O surfactante di-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (Aerosol-OT, AOT) (D-0885 lote 120H0456) e gelatina em pó (tipo A: Bloom 300) usados na preparação do organo-gel foram obtidos da Sigma. Os solventes e os reagentes (grau analítico) foram obtidos das seguintes fontes: Merck (ácido láurico, etanol), Grupo Química (n-heptano, n-hexano), Aldrich (ágar, 4-pentino-1-ol, 3-pentino-1-ol, 2-pentanol, Vetec (n-butanol e n-pentanol), Sigma (undecanol, dodecanol, hexadecanol, octadecanol, 2-metil-1-pentanol) e da General Purpose Reagent (n-octanol). Sílica para coluna da Sigma e sílica para TLC da Aldrich.

2.2. Procedimento geral da preparação do organo-gel e gel de ágar

2.2.1. Preparação da solução de AOT 0,5 mol/L

Preparou-se a solução 0,5 mol/L dissolvendo-se 22,23g de AOT em 100 mL de n-heptano.

2.2.2. Preparação geral do organo-gel

O procedimento geral para a preparação do organo-gel consistiu no seguinte: a gelatina foi misturada com água a temperatura ambiente e aquecida à 55 °C para dissolver, até a obtenção de uma solução homogênea. Uma solução de AOT em solvente orgânico foi preparada e colocada para

estabilizar termicamente à 55 °C. Esta solução foi posteriormente adicionada à solução de gelatina e agitada vigorosamente até obter uma solução micelar ou organo-gel (**Figura 12**).

2.2.3. Preparação do diagrama de fases do organo-gel em n-heptano

Para a construção do diagrama de fases foram preparados vários sistemas, onde a concentração de AOT foi mantida constante em 0,15 mol/L e variou-se a quantidade de gelatina e de água no sistema. A concentração de AOT 0,15 mol/L foi obtida adicionando-se 3,0 mL de AOT 0,5 mol/L no n-heptano necessário para completar o volume final de 10 mL (gelatina, água, AOT e solvente), conforme o valor de W_0 ($[H_2O]/[AOT]$) desejado. Os valores de W_0 foram estipulados de 10 a 75 para permitir o cálculo da quantidade de água necessária para cada W_0 .

O aspecto macroscópico dos organo-géis foi analisado visualmente, depois de 24 horas em repouso a temperatura ambiente. Os resultados foram colocados em um gráfico como percentual de gelatina em função do W_0 , a partir do qual as áreas de diferentes fases do organo-gel foram delimitadas.

2.2.4. Preparação do organo-gel para aplicações sintéticas

Depois do estudo com diferentes organo-géis, chegou-se a composição adequada (não compreendida no diagrama de fases) para utilizar este sistema em sínteses orgânicas. A composição típica utilizada foi a seguinte: 1,4 g de gelatina, 2,0 mL de água, 2,1 mL de heptano, 4,0 mL de AOT 0,5 mol/L e 0,5 mL de enzima (concentração de 12 a 60 mg/mL), sendo esta injetada na solução de AOT + solvente orgânico. A preparação dos organo-géis foi idêntica ao procedimento demonstrado na **Figura 12**. A solução contendo a enzima não deve ser deixada por um longo período a 55 °C, e sim o tempo necessário para que ocorra a termostatização. Após estabilização a temperatura ambiente, os organo-géis foram armazenados em “freezer” a -20 °C, até sua posterior utilização nas reações.

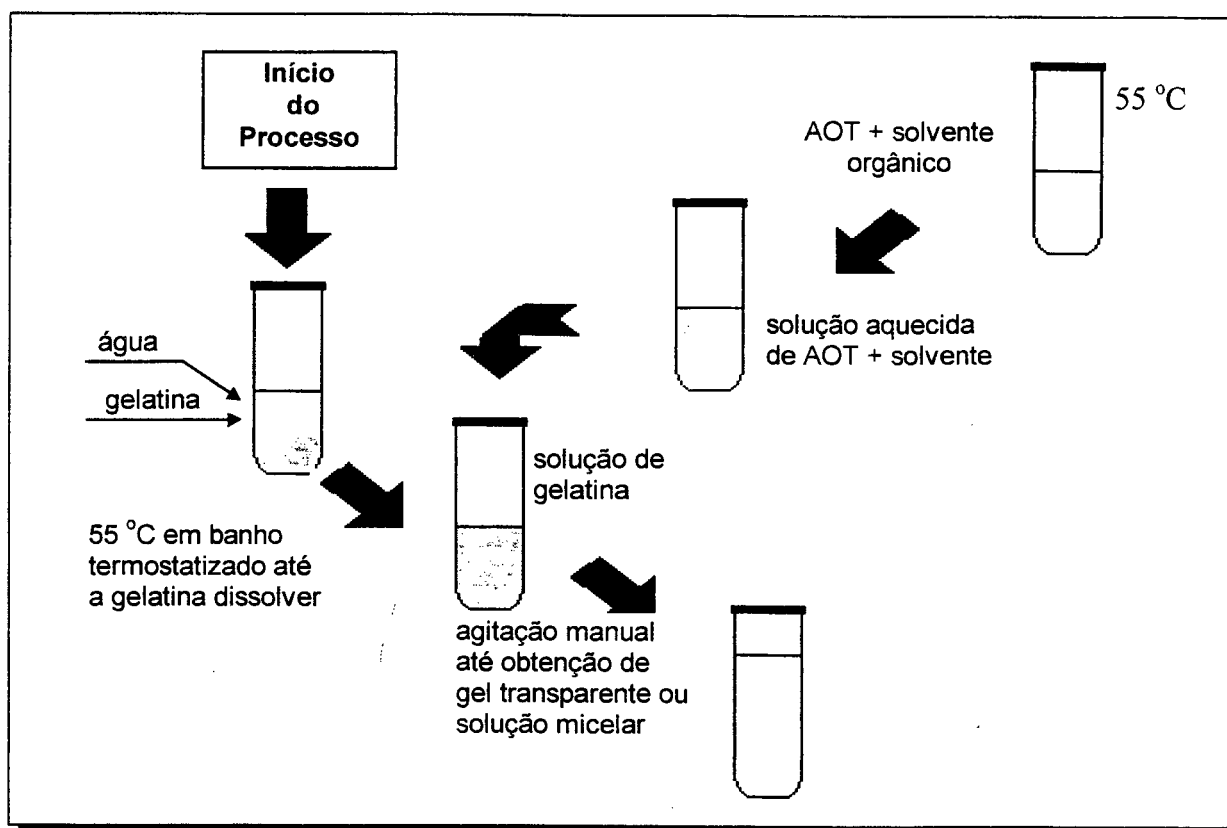


Figura 12. Preparação do organo-gel.

2.2.5. Preparação do gel de ágar

Colocou-se 0,4 g de ágar em um tubo de ensaio e adicionou-se 9,0 mL de água ou de solução tampão [fosfato de potássio-hidróxido de sódio (faixa de pH = 5,8 a 8,0) e ftalato ácido de potássio - hidróxido de sódio (faixa de pH = 4,0 a 6,2), ambos 0,1 mol/L] , quando a reação foi realizada em pH específico. A seguir este tubo foi colocado em um banho termostático a 100 °C até dissolução do ágar. Após dissolver, esperou-se a temperatura diminuir até ~50 °C e a seguir adicionou-se 0,5 mL de solução de enzima (1,2 g/mL). Fez-se a homogeneização com uma espátula e colocou-se o conteúdo em uma peneira fina (diâmetro aproximado de 0,1 cm), sobre uma placa de Petri. Após o resfriamento obteve-se um gel consistente e com o auxílio de uma espátula este foi passado por uma peneira fina, obtendo-se assim pedaços pequenos de gel de

ágar com enzima. Os pedaços de gel foram guardados em solvente orgânico num erlenmeyer, para uso posterior.

Também foi preparado um gel controle, conforme o procedimento acima, mas sem a enzima.

Os tampões foram preparados de acordo com procedimentos já descritos na literatura.⁶¹

2.3. Preparação do meio reacional para aplicações sintéticas

2.3.1. Sínteses de ésteres com enzimas imobilizadas em organo-gel

O organo-gel foi retirado do “freezer” a -20 °C, separado do tubo de ensaio e ainda congelado, foi cortado em secções de volume regulares de aproximadamente de 125 mm³. Em seguida, o organo-gel foi colocado em um erlenmeyer contendo 30 mL de solvente. Os reagentes (ácido, álcool, amina e éster) foram adicionados na proporção 1:1 (0,005 mols), **Figura 13**. O sistema foi deixado sobre agitação suave (agitador Dubnoff com banho termostatizado), de acordo com tempo necessário para a reação ocorrer. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada, usando como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila (8:2). Ao término da reação, os produtos e substratos remanescentes foram separados do gel, através de decantação, sendo este lavado várias vezes com o solvente orgânico para remover todos os reagentes e o produto.

Uma reação controle foi executada paralelamente, utilizando um gel com as mesmas características em termos de sua composição, apenas sem a enzima.

2.3.2. Sínteses de ésteres e amidas com enzimas imobilizadas em gel de ágar

O meio reacional foi preparado adicionando-se os substratos na proporção 1:1 (0,005 ou 0,001 mols dependendo do substrato) no erlenmeyer com os pedaços de gel e levado para agitação em banho termostatizado, **Figura 13**. As etapas posteriores são análogas as descritas para o sistema de organo-gel.

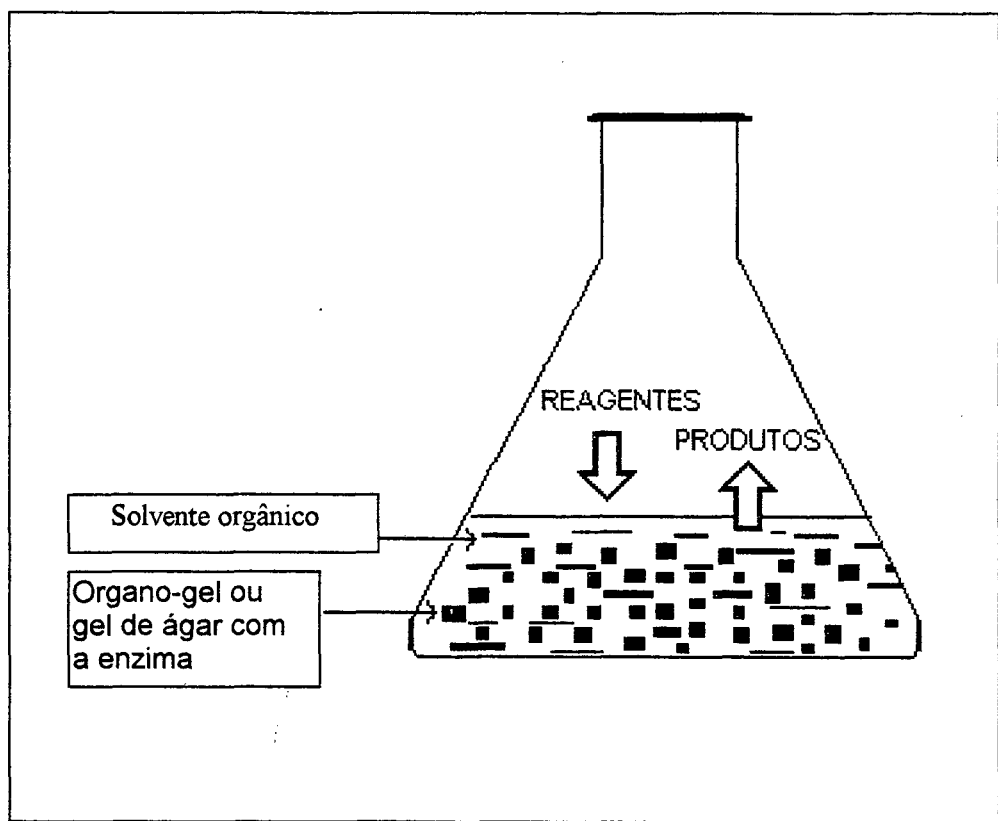


Figura 13. Preparação do meio reacional

2.4. Purificação dos produtos

Os produtos foram purificados por cromatografia rápida por sucção "flash", utilizando sílica para TLC e/ou por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel com tamanho médio de 22 Å, quando necessário. Os rendimentos dos produtos foram determinados por análise quantitativa através do espectro de RMN ^1H . O cálculo dos rendimentos foi estimado pela comparação dos deslocamentos químicos do álcool remanescente e do éster formado. Os deslocamentos químicos dos prótons metilênicos do álcool são observado em 3,60 ppm e os do éster em 4,08 ppm. De acordo com a cadeia alquílica do álcool observa-se uma pequena diferença no deslocamento químico do éster, conforme mostrado na **Tabela 9** (vide pág. 55)

2.5. Caracterização dos compostos

Os compostos foram caracterizados por técnicas usuais de espectroscopia no IV, de RMN ^1H e de Massas. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer modelo FT-IR 16 PC. Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em um espectrômetro da Bruker AC 200 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os espectros de massas quando necessários, foram feitos em espectrômetro de massas SHIMADZU-CGMS-QP-2000-A.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos, os resultados obtidos para o diagrama de fases para o organo-gel de n-heptano, e algumas aplicações de papaína e palatase M, em meio orgânico.

3.1. *Diagrama de fases para o organo-gel de n-heptano*

As mudanças que ocorrem na estrutura do organo-gel variam de acordo com a quantidade de seus componentes (água, óleo, surfactante e gelatina), permitindo obter diagramas de fases, também conhecido como “regiões de estabilidade”. Estes, por sua vez, possibilitam estudar a relação dos componentes do organo-gel no processo de gelatinização, onde pode-se obter organo-géis com diferentes rigidez e estabilidade.⁵³

Na delimitação das áreas do diagrama de fases do organo-gel de n-heptano cerca de 250 sistemas foram preparados com quantidades diferentes de gelatina, n-heptano e água, fixando a concentração de AOT em 0,15 mol/L. A avaliação visual, a temperatura ambiente, de cada organo-gel possibilitou distinguir três regiões diferentes, através do diagrama que foi obtido pelo gráfico, concentração de gelatina no meio (expressada em % de gelatina no volume da solução) versus W_0 (Figura 14).

A construção do diagrama de fases foi realizada com base nos resultados que foram obtidos visualmente. Portanto, erros podem ocorrer já que cada observador pode definir um critério para separar as diferentes regiões. Neste trabalho considerou-se como solução micelar todo sistema que fluía, tomando a forma do tubo de ensaio, organo-gel o que não fluía, após um período de 24 horas.

3.1.1. Regiões do diagrama

As diferentes regiões distinguidas macroscopicamente consistem em:

- região de separação de fases: onde toda ou parte da gelatina em forma de pó não pode ser solubilizada (I).
- região líquida: solução líquida opticamente clara ou solução micelar (II).
- região sólida: organo-gel (III).

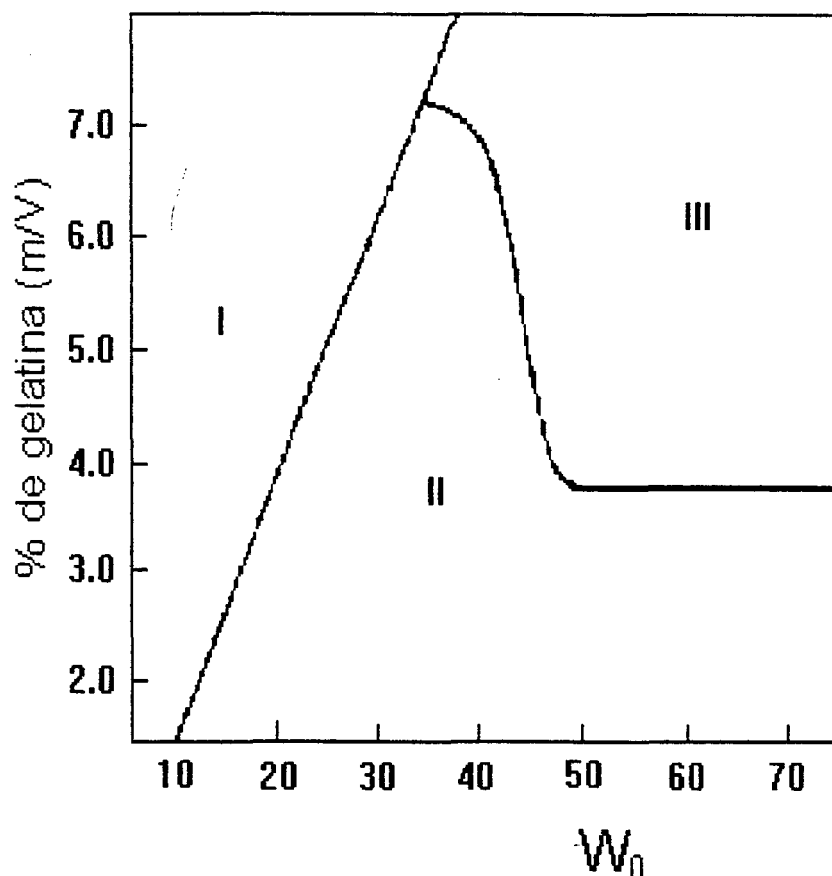


Figura 14. Diagrama de fases para o organo-gel de n-heptano.

3.1.1.1. Região I

Nesta região toda ou parte da gelatina não pode ser solubilizada pela água e pela solução de AOT + n-heptano, formando um sistema com duas fases. A concentração de AOT foi mantida constante, portanto o aumento de W_0 está

relacionado diretamente com o aumento de água no sistema, onde $W_0 = [H_2O]/[AOT]$. Para as diferentes concentrações usadas de gelatina, não é possível formar organo-gel com um valor de W_0 menor do que 35.

A linha que separa a região I das demais, possui uma inclinação que mostra a relação entre o aumento da quantidade de gelatina e o aumento da quantidade de água. A medida que aumenta a concentração de gelatina, mais água é necessária para solubilizar o agente gelificante, logo tem-se um resultado diferente para cada valor de W_0 . Por exemplo, fixando W_0 em 20 pode-se observar que com 2,0 a ~3,5 % de gelatina ocorre a formação de uma solução micelar, enquanto que acima destas concentrações, ocorre a separação de fases. A região I mostra que para 8,0 % de gelatina é necessário trabalhar com W_0 maior do que 40 para ocorrer mudança de fase e formar o organo-gel.

3.1.1.2. Região II

Nesta região tem-se a formação de uma solução líquida opticamente clara, denominada de solução micelar. Aqui a concentração dos componentes são suficientes para formar um sistema de uma única fase, com quantidades de gelatina que variam de 1,5 a 6,8 % (m/V), numa faixa de W_0 de 10 a 75.

A observação desta região possibilitou mostrar que a concentração de gelatina não influencia totalmente no processo de gelatinização e sim o conjunto de seus componentes. Por exemplo, fixando a gelatina em 6,0 % observa-se que em $W_0 = 40$ tem-se uma solução micelar, e com $W_0 = 50$ tem-se a formação do organo-gel. Este fato demonstra que a quantidade de água e solvente orgânico do sistema, também são fatores importantes no processo de gelatinização.

3.1.1.3. Região III

Nesta região ocorre a formação do organo-gel transparente, onde os componentes estão em equilíbrio, formando um sistema de uma fase contínua e sólida. A formação do organo-gel ocorre numa quantidade de gelatina acima de

3,8 % e W_0 acima de 35. Abaixo destes valores tem-se a formação das outras regiões.

3.1.2. Análise comparativa com outros diagramas de fases

Dos diagramas de fases encontrados na literatura, somente o diagrama de fases com iso-octano foi realizado com uma concentração de AOT próxima a desenvolvida neste trabalho, concentração de AOT = 0,14 mol/L. Neste diagrama, Luisi e col.⁶² mostraram a existência de quatro regiões distintas nos seus experimentos. A distribuição das diversas regiões do organo-gel de iso-octano (**Figura 15**) são diferentes das regiões do diagrama de fases do organo-gel de n-heptano.

Através da **Figura 15** pode-se comparar o efeito da concentração do surfactante, AOT. Observa-se que aumentando a concentração de AOT, ocorre um aumento na área que forma o gel.

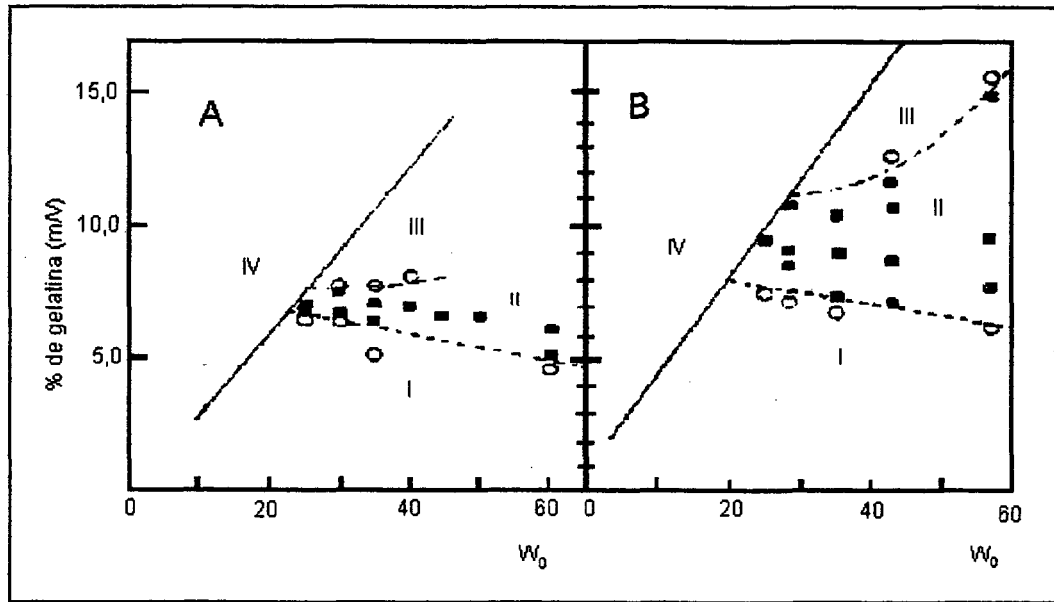


Figura 15. Diagrama de fases para o organo-gel de iso-octano. As quatro regiões representam os diferentes estados das soluções micelares: (I) solução micelar; (II) gel transparente; (III) região de duas fases; (IV) gelatina insolúvel.

A) [AOT] = 0,10 mol/L; B) [AOT] = 0,14 mol/L.

Para o diagrama de fases do organo-gel de iso-octano com AOT 0,14 mol/L, a formação do gel ocorre com um valor mínimo de $W_0 = 25$ e 8,0 % de gelatina, enquanto que no diagrama de fases do organo-gel de n-heptano é necessário no mínimo $W_0 = 35$ e 7,2% de gelatina.

Na **Figura 16** tem-se os diagramas de fases para o ciclo-hexano e hexano, e ambos apresentam quatro regiões distintas. Na região I tem-se a separação de fases onde a gelatina separa-se da solução micelar, na região II ocorre a separação de fases onde o organo-gel separa-se da solução micelar, a região III mostra a formação da solução micelar transparente e na IV ocorre a formação do organo-gel.⁶³

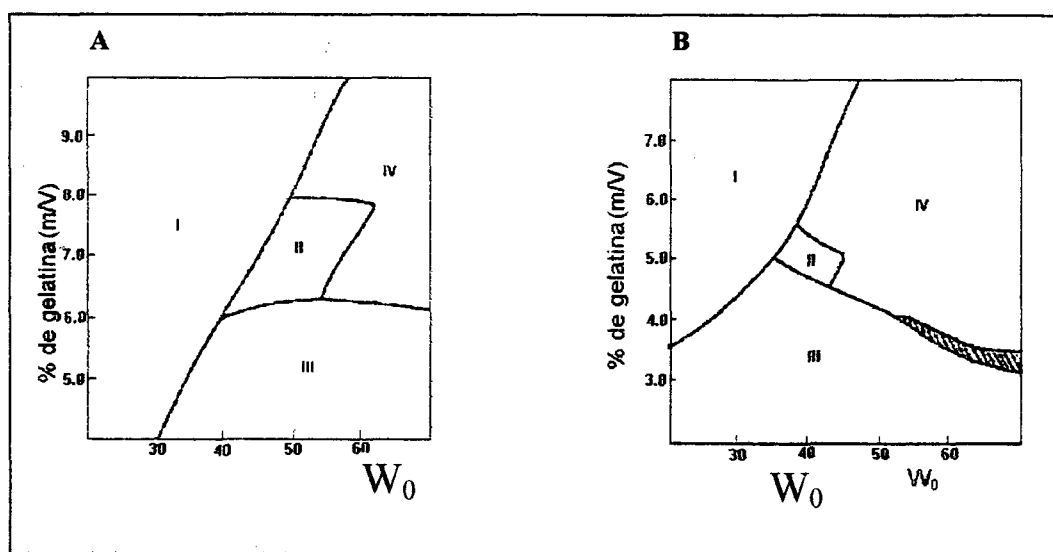


Figura 16. Diagramas de fases para organo-gel de ciclo-hexano (A) e n-hexano (B)⁶³
 $[AOT] = 0,1 \text{ mol/L}$

Aspectos importantes podem ser observados quando se comparam os diagramas de fases de organo-géis, a saber os de n-hexano, ciclo-hexano, iso-octano e n-heptano. Independente do solvente orgânico, a formação do organo-gel depende do ajustamento das quantidades de seus componentes (água, AOT, solvente orgânico e gelatina). As condições de equilíbrio entre esses componentes variam de um solvente para o outro.

Levando-se em conta que os diagramas foram construídos com uma concentração diferente de AOT, a análise comparativa limitou-se em observar o

número de regiões formadas para cada solvente. No diagrama de fases para o organo-gel de n-heptano, não foi observado nas condições experimentais utilizadas, a formação da região onde o gel separa-se da solução micelar, região esta observada com os outros solventes. Com relação ao diagrama de fases de iso-octano um fator que pode ser ressaltado, é que esta região somente se forma acima de 8,0 % de gelatina, sendo que este diagrama foi construído até 15 % de gelatina e o diagrama de n-heptano construído até 8,0 % de gelatina. Estes dados indicam que aumentando a quantidade de gelatina, provavelmente seria observado a formação da região de separação de fases, onde o gel separa-se da solução micelar, para o diagrama de fases do organo-gel de n-heptano.

A utilização dos organo-géis como suporte para imobilização de enzimas depende muito de sua consistência, sendo que é necessário obter géis bem firmes para que possam ser cortados. Como discutido anteriormente, a consistência adequada depende da proporção de seus componentes. Este resultado já foi verificado por Aguiar⁶⁴ em seus experimentos, onde observou-se que a consistência adequada do organo-gel, para sua aplicação como suporte na imobilização de enzimas, foi obtida variando o W_0 , concentração de gelatina e concentração de AOT. Logo, para cada solvente testado foi necessário uma composição diferente de gelatina, AOT, solvente orgânico e água. Outro estudo realizado por Aguiar foi o da estabilidade térmica do organo-gel de ciclo-hexano. Este sistema quando aquecido à temperaturas superiores a 30 °C se liquefaz. O tempo para isto ocorrer depende da quantidade de gelatina, porém o sistema volta às suas características iniciais quando é deixado resfriar à temperatura ambiente. Na fase de regelificação, a agitação vigorosa do sistema é imperativa para que o mesmo não sofra a separação de fases. Verificou-se também que a termorreversibilidade do sistema, não depende da quantidade de gelatina e nem do valor de W_0 .⁶⁴

3.2. Papaína em aplicações sintéticas

3.2.1. Papaína em suspensão (Método de Klibanov)

Em paralelo a execução do diagrama de fases, iniciaram-se os estudos com enzimas para aplicações sintéticas. Inicialmente a enzima papaína foi testada em reações de esterificação e amidação. Primeiramente, realizaram-se sínteses para obtenção de ésteres e amidas com a enzima em suspensão em solvente orgânico (**método de Klibanov**).

O método foi utilizado pela primeira vez em 1986 por Klibanov para efetuar reações em meio orgânico, onde foi verificado que para a enzima em pó exercer sua atividade catalítica, algumas regras devem ser seguidas. Por exemplo: solventes hidrofóbicos são melhores que hidrofílicos; algumas enzimas requerem a adição de água ao solvente orgânico já que as enzimas são insolúveis, em quase todos os solventes orgânicos; as partículas de enzima devem ser pequenas suficientes e sua suspensão deve ser continuamente agitada para minimizar as limitações difusionais.⁶⁵

Alguns resultados obtidos neste trabalho, usando papaína como catalisador em reações de esterificação e amidação são mostrados na **Tabela 2**.

Os resultados mostraram que não foi obtido o produto esperado na reação de amidação do ácido decanóico com n-dodecilamina devido a formação de sais de aminas (**Figura 17**), como pode ser observado através das análises espectroscópicas no infravermelho e de RMN ¹H. Pelo espectro de absorção na região do infravermelho observam-se as bandas características do íon carboxilato, uma em 1644 cm⁻¹, que é proveniente da deformação axial assimétrica e outra em 1400 cm⁻¹, devido a deformação axial simétrica. Entre 3000 e 2800 cm⁻¹, é observado uma banda larga e intensa devido as deformações axiais assimétrica e simétrica do grupo ⁺NH₃. Pelo espectro de RMN ¹H não foram observados os sinais característicos da amida, como exemplo pode-se citar, o deslocamento químico dos prótons metilênicos ligados ao NH da amida.

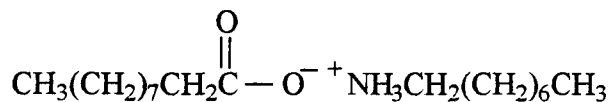


Figura 17. Sal resultante da reação entre o ácido decanóico e n-octilamina.

Tabela 2. Reações de esterificação e amidação utilizando papaína em suspensão como catalisador.

REAGENTES	massa de enzima (mg)	tempo (dias)	Temperatura (°C)	Rendimento ^d (%)
ác. decanóico + n-pentanol	108	16	30	15
ác. decanóico + n-pentanol	100	16	25	24
ác. decanóico + n-pentanol ^a	1000	16	30	23
ác. decanóico + n-dodecilamina	0	16	25	0
ác. decanóico + n-dodecilamina	100	16	25	0
N-ftaloil leucina + n-pentanol	100	23	30	0
CBz-alanina ^b + n-butanol ^c	100	15	37	0

a) enzima bruta da Biobrás sem especificação; b) CBz = carbobenxiloxi; c) excesso de butanol (2 vezes); d) determinado por RMN ¹H; solvente externo: acetronitrila para as reações de esterificação dos aminoácidos N-protetidos e hexano para as demais.

Alguns trabalhos destacam a utilização de papaína como catalisador na esterificação de vários aminoácidos N-protetido, em sistema bifásico,⁶⁶ e com a enzima imobilizada em vários suportes.¹⁶ Nestes trabalhos, as condições ótimas de sínteses (pH, concentração dos reagentes, tempo de reação e temperatura) foram alcançadas. Das várias tentativas de obter os ésteres correspondentes, somente três foram formados, e estão representados na **Tabela 2**. Os resultados obtidos na esterificação dos aminoácidos usados, não foram promissores, provavelmente devido a condições ótimas de síntese não terem sido atingidas.

Nas reações de esterificação do ácido decanóico com n-pentanol, obteve-se um resultado melhor do que na esterificação dos aminoácidos

N-protégido. Este resultado pode estar relacionado com a estrutura dos reagentes, que devido aos impedimentos estéricos dificultam a ligação do substrato com a enzima. Embora o impedimento estérico do ácido decanoico seja menor que dos aminoácidos N-protégido, o decanoato de n-pentila foi obtido com baixo rendimento (15, 24 e 23%). Estes resultados provavelmente também estão relacionados com as condições experimentais utilizadas neste trabalho.

A utilização de papaína como catalisador em síntese orgânica, necessita de condições muito específicas, pois dependendo do pH ela atua como esterase ou como protease. A temperatura do meio reacional também influencia na atividade catalítica.⁶ Os resultados apresentados na **Tabela 2** foram obtidos com a papaína em suspensão, o que pode apresentar algumas desvantagens, tais como; a inibição da atividade pelo solvente (sensibilidade da enzima é diferente para cada solvente), necessidade de agitação da suspensão, concentração enzimática alta e perda da massa da enzima após cada repetição.⁶⁵

Os estudos preliminares não foram satisfatórios em relação a quantidade de produtos obtidos, mas foram úteis para verificar a eficiência da enzima frente aos substratos antes que a mesma fosse imobilizada em organo-gel e em gel de ágar, e ser novamente testada em outras reações de esterificação.

3.2.2. Imobilização de papaína em organo-gel de n-heptano

O termo imobilização implica no confinamento artificial da enzima permanecendo acessível ao substrato, mas sendo facilmente separado dele, podendo a enzima ser reutilizada em várias reações.

Neste trabalho, a papaína foi imobilizada em organo-gel e verificou-se que o sistema perde totalmente sua estabilidade e integridade. Isto ocorre porque esta enzima pertence à classe de enzimas proteolíticas, cuja função é quebrar as cadeias peptídicas em frações menores ou em resíduos de aminoácidos.¹¹ Como já citado a gelatina é uma proteína, sendo o componente responsável pela gelificação da microemulsão água/óleo, formando o organo-gel.

Foram também preparados géis de gelatina (gelatina e água), contendo ou não a papaína, para verificar se realmente a perda de estabilidade e integridade do organo-gel foi devido à presença da enzima. Após um período de 48 horas

constatou-se que o gel contendo a papaína ficou totalmente destruído, apresentando-se como uma solução e o gel sem a enzima continuou intacto.

Baseando-se nestes resultados, não foi possível imobilizar a papaína em organo-gel, levando-nos a utilizar outro método, onde o suporte não fosse alterado com a enzima.

3.2.3. Papaína imobilizada em gel de ágar

A imobilização de papaína em gel de ágar não alterou o aspecto macroscópico deste suporte. A eficiência da enzima (15 mg/mL) imobilizada em gel de ágar foi primeiro analisada através da reação de esterificação do ácido decanóico com n-pentanol. Obteve-se o éster com 75%, após um período de 20 dias de incubação em n-hexano, a 25 °C. Outras tentativas de sínteses foram realizadas variando as condições experimentais, e utilizando papaína como catalisador, mas sem obtenção de produtos, **Tabela 3**.

Tabela 3. Reações de esterificação utilizando papaína imobilizada em gel de ágar a 25 °C, como catalisador.

REAGENTES	massa de enzima (mg)	pH	tempo (dias)	Rendimento ^c (%)
Cbz-fenilalanina + etanol ^a	10	4,0; 5,0; 6,0 7,0 e 8,0	3	0
Cbz-fenilalanina + n-pentanol ^a	30	8,5	13	0
ác. decanóico + n-pentanol	10	8,0	20	0
ác. decanóico + n-pentanol	10	9,0	20	0

a) etanol em excesso (100 vezes); b) n-pentanol em excesso (2 vezes); c) determinado por RMN ¹H. Solvente externo = hexano.

A análise dos resultados, mostrou que a papaína catalisa reações de esterificação, porém a sua eficiência como catalisador vai depender muito das condições de síntese. Neste trabalho obteve-se o decanoato de n-pentila, com bom rendimento, porém a reação foi muito lenta (20 dias). Estes resultados

podem estar relacionados com as condições ótimas de síntese (pH, tempo de reação, temperatura) não terem sido encontradas.

Considerando que os resultados obtidos com a papaína em suspensão e imobilizada em gel de ágar não foram satisfatórios para os estudos pretendidos (influência do pH, temperatura, concentração de enzima, entre outros), decidiu-se estudar a atividade catalítica de palatase M. Esta enzima foi imobilizada em organo-gel e em gel de ágar, e sua eficiência catalítica testada em várias reações de esterificação e algumas de aminólise de éster.

3.3. Palatase M em aplicações sintéticas

O efeito da concentração de palatase M foi estudado através da reação de esterificação do ácido dodecanóico (ácido láurico) com n-pentanol. Esta foi a reação modelo escolhida para estudar qual a concentração de enzima que forma o laurato de n-pentila com o melhor rendimento. Esta reação modelo foi escolhida porque de acordo com os dados da literatura, a palatase M tem uma boa atividade frente a ácidos de cadeias longas.⁴⁶

A palatase M foi imobilizada em organo-gel de n-heptano em diferentes concentrações, e utilizada na síntese do laurato de n-pentila para verificar a sua eficiência como catalisador, **Tabela 4**.

Tabela 4. Efeito da concentração de palatase M imobilizada em organo-gel de *n*-heptano na reação de esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol, a 25 °C.

Concentração de palatase M (mg/mL)	Rendimento (%) ^a
12	36
18	69
24	73
30	81
36	90
48	90
60	94

tempo = 4 horas; atividade da enzima = 1000 LU/g

a) Determinado por RMN ¹H.

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que houve um aumento do rendimento do éster a medida que a concentração da enzima aumentou, porém acima de 36 mg/mL verifica-se que o rendimento é aproximadamente o mesmo. Este resultado pode ser facilmente verificado na **Figura 18**, isto leva-nos a concluir que à medida que a concentração da enzima aumenta, uma quantidade maior do complexo enzima-substrato é formada e após 36 mg/mL o rendimento torna-se independente da concentração da enzima, mostrando que existe uma relação entre o substrato e a enzima.

A partir da análise destes resultados, verifica-se que a melhor quantidade para ser usada como catalisador em reações deste tipo (reações de esterificação) é acima de 36 mg/mL. Por razões de ordem práticas, utilizou-se 60 mg/ml de enzima nos experimentos posteriores.

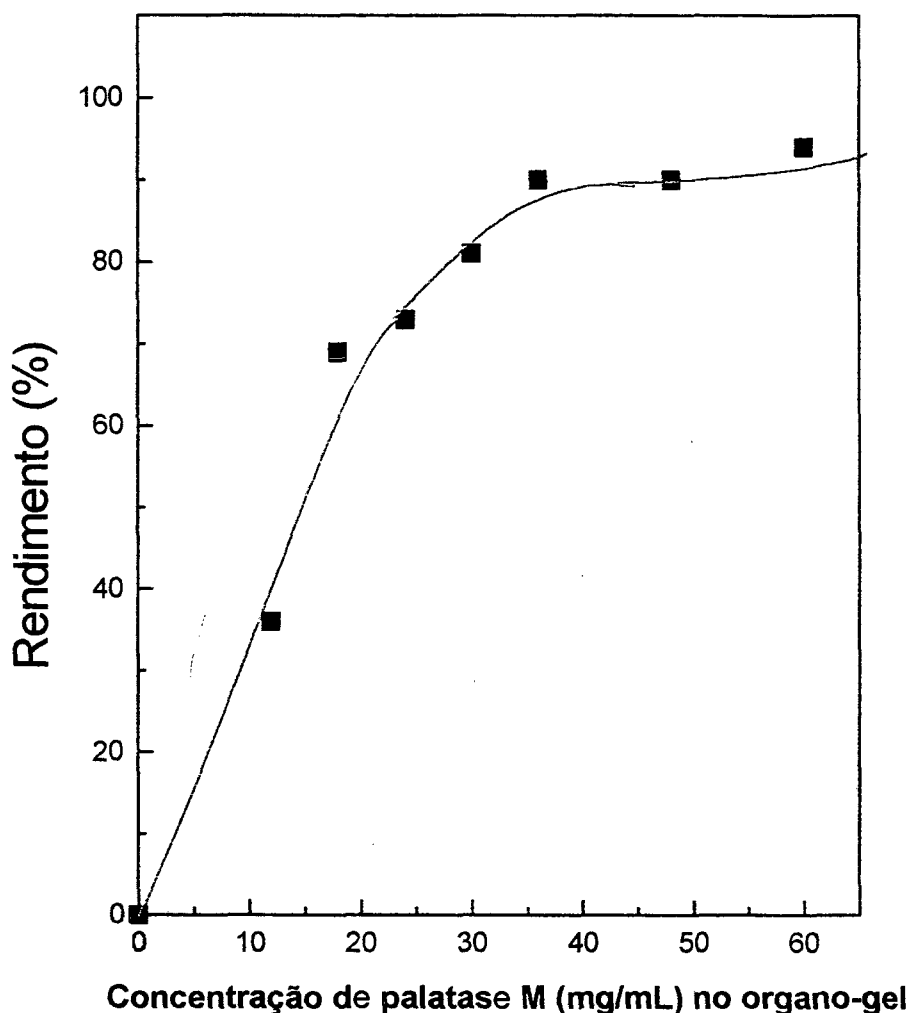


Figura 18. Efeito da concentração de palatase M imobilizada em organo-gel de *n*-heptano, na reação de esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol, a 25 °C.

3.4. Reutilização do organo-gel de *n*-heptano

A reutilização do catalisador é um fator importante quando se considera a aplicação prática de um determinado método sintético, especialmente quando o catalisador é de alto custo. A **Figura 19** mostra a atuação de palatase M imobilizada em organo-gel em repetidas sínteses para a obtenção do laurato de *n*-pentila. Através dos resultados obtidos, observa-se que o rendimento (determinado por RMN ¹ H) da reação manteve-se na faixa de 84 a 88%. A

atividade da enzima manteve-se num nível bom considerando o número de repetições do experimento. A enzima manteve-se ativa depois de 10 conversões, com um rendimento médio de 85%. Não foram observadas mudanças na aparência física do organo-gel durante o período do experimento (~ 70 dias).

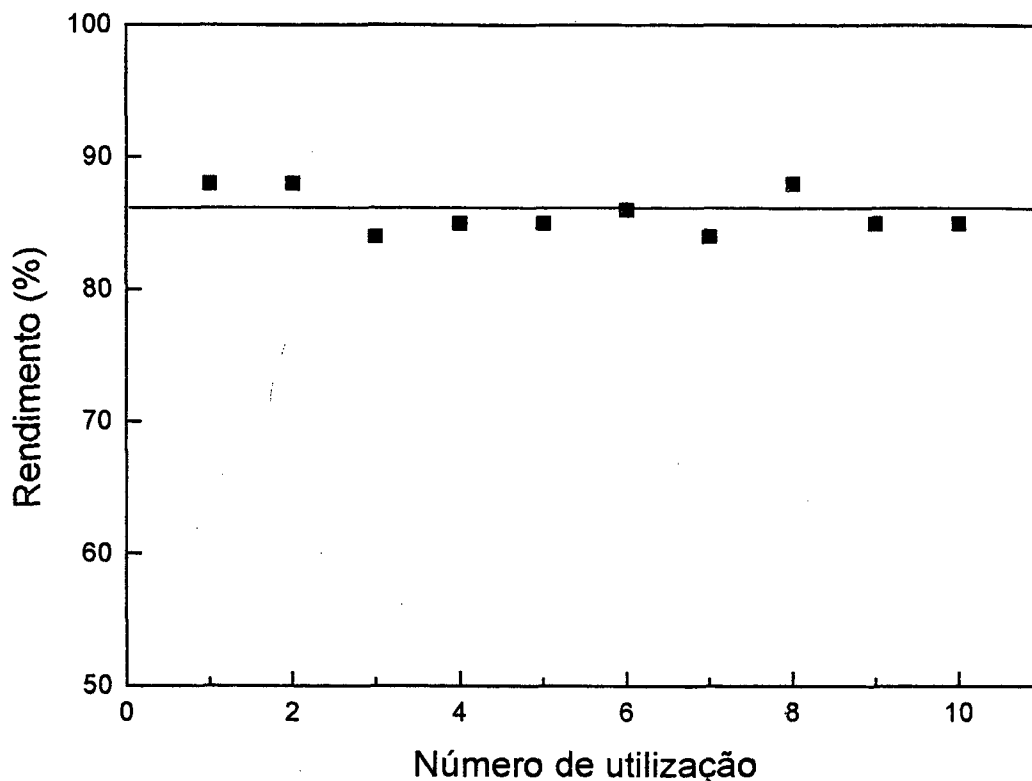


Figura 19. Reutilização de Palatase M immobilizada em organo-gel de *n*-heptano na esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol. [Palatase M] = 60 mg/mL de organo-gel, $T = 25^{\circ}\text{C}$.

Vecchia⁶⁵ também estudou a reutilização do sistema organo-gel nas reações de esterificação do ácido oléico com *n*-pentanol com a lipase *Chromobacterium viscosum* (CV) immobilizada em organo-gel. Foi verificado que a enzima não perde sua atividade após 15 conversões, e que o sistema não altera suas propriedades macroscópicas. Com base nos resultados obtidos e comparados com o de Vecchia, acredita-se que este suporte é útil para a imobilização de enzimas. A reutilização do sistema também pode ser feita quando se usam reagentes diferentes, pois é possível retirar todo o produto e reagentes remanescentes, através de sucessivas lavagens com o solvente orgânico usado na síntese.

3.5. Palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano

Ésteres (RCOOR') podem ser obtidos enzimaticamente por síntese direta (ácido e álcool) ou por reações de transesterificação (éster e álcool). São compostos orgânicos que apresentam-se bem distribuídos na natureza. Os que possuem cadeia curta tem odor característico de frutas e flores, tendo portanto, grande aplicação na indústria alimentícia como flavorizantes e aromatizantes. Por exemplo, o butirato de etila e acetado de iso-amila são encontrados no aroma de morango e banana, respectivamente. Estes compostos com sabores são usualmente sintetizados por métodos químicos, porém, métodos enzimáticos estão tornando-se mais atrativos. A formação de ésteres por lipases é uma reação bem conhecida.⁶⁷

Uma série de ésteres alifáticos foi sintetizada usando os ácidos láurico e hexanóico com álcoois, variando o tamanho da cadeia e ramificação próxima ou não do centro reacional. As reações de esterificação foram catalisadas pela palatase M, imobilizada em organo-gel de n-heptano.

3.5.1. Esterificação do ácido láurico com diferentes álcoois

Afim de verificar o efeito do comprimento da cadeia do álcool, realizou-se a esterificação do ácido láurico com diferentes álcoois, com a cadeia alquílica variando de 2 a 18 átomos de carbono. A **Tabela 5** mostra os resultados obtidos para esta série de ésteres.

Tabela 5. Ésteres alifáticos derivados do ácido láurico, reações catalisadas por palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano, a 25 °C.

Álcoois	Produto	Rendimento (%) ^a
Etanol	Laurato de etila	85
n-Butanol	Laurato de n-butila	94
n-Pentanol	Laurato de n-pentila	97
n-Octanol	Laurato de n-octila	69
Undecanol	Laurato de undecila	71
Dodecanol	Laurato de dodecila	66
Hexadecanol	Laurato de hexadecila	52
Octadecanol	Laurato de octadecila	32

tempo = 6 horas; [palatase M] = 60mg/mL de organo-gel

a) rendimento determinado por RMN ¹H

Os rendimentos dos ésteres (**Tabela 5**) foram bons considerando o tempo de reação, 6 horas. No trabalho de Gareth e col. foi preparada uma série de ésteres usando álcoois e ácidos com diferentes comprimentos de cadeia, com a lipase CV imobilizada em organo-gel, a 25 °C por um período de 24 horas. Os resultados mostraram que a lipase CV catalisa a esterificação de ácidos alifáticos de cadeia média e longa com álcoois alifáticos de cadeia curta, média e longa. Os produtos foram obtidos com excelentes rendimentos para todas as sínteses, com exceção da que envolveu o ácido etanóico (ácido acético). Quando o ácido acético foi usado como substrato o organo-gel foi destruído rapidamente, sendo que o mesmo comportamento foi verificado com o organo-gel sem a enzima. Neste experimento, não foi verificado nenhum efeito quando se variou o comprimento da cadeia do álcool.⁵⁴ Isto provavelmente se deve ao tempo de reação, onde o período de incubação foi suficiente para que todos os ésteres apresentassem rendimentos muito semelhantes.

Neste trabalho, verificou que o comprimento da cadeia do álcool interfere no rendimento do éster, em 6 horas de incubação, a 25 °C. Os ésteres foram obtidos com rendimentos que variaram de 32 a 97%.

Comparando-se os resultados da **Tabela 5**, observa-se que existe uma certa dependência do comprimento da cadeia alquílica do álcool no rendimento do éster. Ocorre um aumento no rendimento em éster a medida que aumenta a cadeia alquílica do álcool de 2 para 4 e 5 carbonos. Porém, a medida que aumenta o número de átomos, acima de 5, observa-se uma acentuada diminuição. Por exemplo, o laurato de octadecila, é obtido apenas com 32 % de rendimento.

Estes resultados novamente evidenciam a importância de efeitos estéricos em reação catalisadas em sistema de organo-gel, onde os reagentes e produtos devem vencer as barreiras difusionais imposta pelo suporte.⁶⁸

3.5.2. Esterificação do ácido hexanóico com diferentes álcoois

O efeito do comprimento da cadeia do álcool também foi verificado para a esterificação do ácido hexanóico com diferentes álcoois, com o comprimento da cadeia alquílica variando de 2 a 18 átomos de carbono. Na **Tabela 6** encontram-se os resultados obtidos para esta série de ésteres (hexanoato de n-alquila).

Comparando-se os resultados da **Tabela 6**, verifica-se que existe uma certa dependência do comprimento da cadeia alquílica do álcool no rendimento do éster. Observa-se um diminuição no rendimento dos ésteres com o aumento da cadeia do álcool, com exceção do etanol. Por exemplo, o laurato de n-butila é obtido com 95 %, enquanto que o laurato de octadecila com apenas 10 % de rendimento.

Tabela 6. Ésteres alifáticos derivados do ácido hexanóico, reações catalisadas por palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano, a 25 °C.

Álcoois	Produto	Rendimento (%) ^a
Etanol	Hexanoato de etila	82
n-Butanol	Hexanoato de n-butila	95
n-Pentanol	Hexanoato de n-pentila	57
n-Octanol	Hexanoato de n-octila	26
Undecanol	Hexanoato de undecila	22
Dodecanol	Hexanoato de dodecila	19
Hexadecanol	Hexanoato de hexadecila	12
Octadecanol ^b	Hexanoato de octadecila	10

tempo = 6 horas, 25 °C, [palatase M] = 60 mg/mL no organo-gel

a) Rendimento determinado por RMN ¹H.

b) adicionado 5 mL de acetato de etila para aumentar a solubilidade do álcool.

3.5.3. Comparação de rendimentos: ésteres derivados do ácido láurico e hexanóico.

Quando se comparam os resultados obtidos para os ésteres derivados do ácido láurico com os do ácido hexanóico, observa-se que a enzima é mais eficiente para o ácido láurico. Por exemplo, o laurato de n-pentila é obtido com 97 % de rendimento, e o hexanoato de n-pentila com 57 %. O rendimento maior em éster provavelmente está ligado com o encaixe mais adequado do substrato ao sítio ativo da enzima. Dependendo do substrato o encaixe (ligação) é melhor, isto é, o complexo enzima-substrato fica numa posição mais acessível para o ataque do nucleófilo, neste caso, o álcool. Outras sínteses variando os ácidos e fixando o álcool, nas mesmas condições, podem ser realizadas para confirmar a seletividade da enzima pelo sustrato.

Os resultados mostrados nas Tabelas 5 e 6, podem ser melhor visualizadas na Figura 20, onde faz-se a comparação entre as duas séries de

ésteres alquílicos, em termos de rendimento (%) em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica.

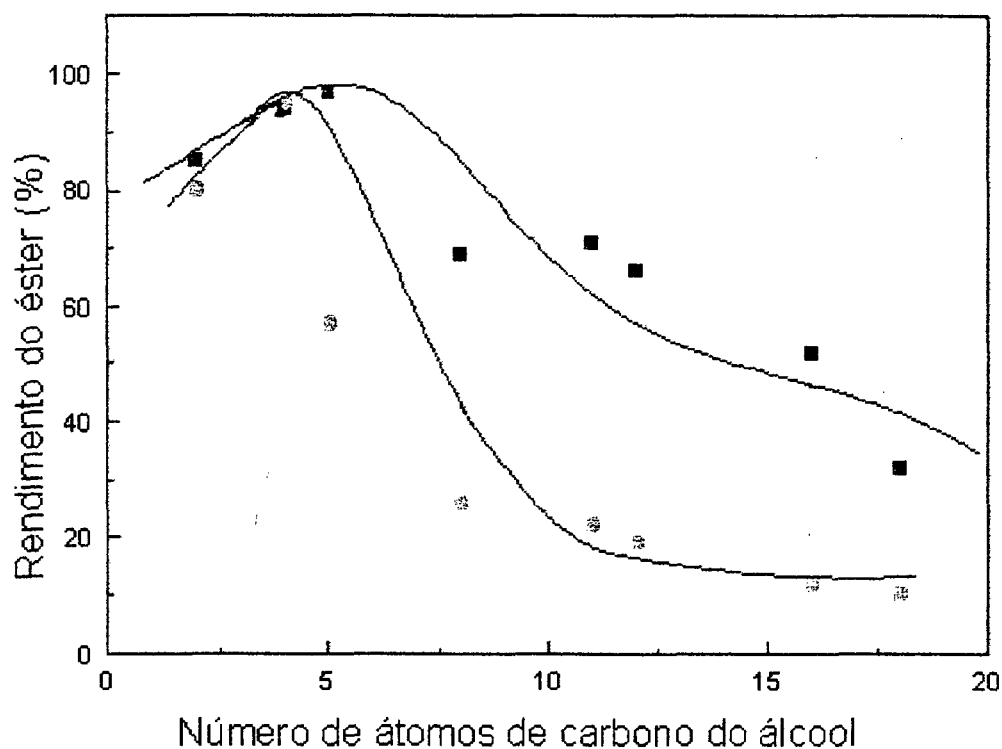


Figura 20. Rendimentos obtidos para os ésteres derivados do ácido láurico (■) e ácido hexanóico (●), usando palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano, a 25 °C. Tempo = 6 horas, [enzima] = 60 mg/mL.

O hexanoato de etila e hexanoato de butila foram os ésteres que não apresentaram uma diferença significativa no rendimento, quando comparados com o laurato de etila e n-butila. Os outros ésteres tiveram uma diferença em torno de 30% para o mesmo álcool. Há indicação de que para a enzima a hidrofobicidade é mais importante do que o tamanho da cadeia, pois os lauratos de n-alquila foram obtidos com rendimentos maiores (Tabela 5) do que os hexanoatos de n-alquila (Tabela 6).

Através dos resultados obtidos verifica-se em relação ao comprimento da cadeia alquílica dos álcoois que a polaridade dos álcoois também influencia no

rendimento do ésteres, mostrando que a hidrofobicidade em relação ao nucleófilo deve ser um fator importante. Através da **Figura 20** observa que o decréscimo no rendimento à medida que o impedimento estérico aumento e a nucleofilicidade diminui, sendo que para o etanol acredita-se que a polaridade influencia mais do que a nucleofilicidade.

3.5.4. Estudo do efeito de ramificação e insaturação em reações de esterificação usando palatase M imobilizada em organo-gel

A atividade catalítica de palatase M imobilizada em organo-gel de n-heptano foi também testada em reações de esterificação, com álcoois possuindo ramificação, ligação insaturada e centro quiral. Estes resultados são mostrados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Reações de esterificação usando palatase M imobilizada em organo-gel, a 25 °C, como catalisador.

Reagentes	Rend. 6h (%) ^a	Rend. 96 h (%) ^a
ác. láurico + 1-pentanol	97	---
ác. láurico + 4-pentino-1-ol	99	---
ác. láurico + 3-pentino-1-ol	80	---
ác. láurico + 2-pentanol	41	100
ác. láurico + 2-metil-1-pentanol	48	89
ác. hexanóico + 1-pentanol	57	---
ac. hexanóico + 4-pentino-1-ol	72	---
ác. hexanóico + 3-pentino-1-ol	60	---
ác. hexanóico + 2-metil-1-pentanol	16	---

a) Rendimento determinado por RMN ¹H.

O efeito da distância da tripla ligação, no rendimento da reação, pode ser observado através dos dados da **Tabela 7**. Comparando o rendimento do laurato de n-pentila com o laurato de 4-pentinila, não observa-se nenhum efeito da tripla ligação, sendo o rendimento de 97 e 99 %, respectivamente. Porém o laurato de

3-pentinila é formado com rendimento menor, de 80 %. Este efeito não é observado para as reações realizadas com o ácido hexanóico. Por exemplo, o hexanoato de n-pentila é obtido com 57 % e o hexanoato de 3-pentinila com 60 %.

Um ponto em comum entre os álcoois insaturados e os álcoois de cadeia simples, observado nas reações de esterificação do ácido dodecanóico e hexanóico, é que ambos apresentam um decréscimo no rendimento do éster, quando substitui o ácido dodecanóico pelo hexanóico. Estas diferenças devem estar relacionadas com efeitos estéricos e também com a diminuição da hidrofobicidade da cadeia alquílica do ácido, conforme discutido anteriormente.

O efeito da presença de um carbono quiral na reação de esterificação do ácido dodecanóico também foi estudado. A esterificação do ácido láurico com o 2-pentanol, foi realizada na mesma condição que a com n-pentanol. A mudança do centro nucleofílico da posição 1 para 2 no álcool leva a um decréscimo de 56 % no rendimento do éster, isto em 6 horas de reação (**Tabela 7**). Aumentando o tempo de reação para 96 horas, verificou que a reação foi completa, obtendo-se o éster com rendimento quantitativo (100 %).

Outro estudo realizado foi a influência da ramificação na cadeia do álcool, no rendimento do éster. O grupo metila próximo ao centro reacional do álcool, leva a formação de produto com menor rendimento, conforme **Tabela 7**. O laurato de 2-metil-1-pentila foi obtido com 48 %, e o hexanoato com 16 % de rendimento, após 6 horas de reação. Aumentando o tempo para 96 horas, o laurato de 2-metil-1-pentila foi obtido com 89 % de rendimento.

Foram estudadas também, as reações de esterificação do ácido láurico com linalol, 2-hexanol e trifluoretanol. Com o linalol não se obteve o correspondente éster após um período de 37 dias, a 25 °C. Porém, o laurato de 2-hexila e o laurato de trifluoretila, foram obtidos com rendimentos de 8 % e 22%, respectivamente, após 16 horas de reação a 25 °C. Ao utilizar trifluoretanol, observou-se que o organo-gel perde a sua estabilidade e uma parte se dissolve, provavelmente devido a alta polaridade e acidez deste álcool.

3.6. Imobilização de Palatase M em gel de ágar

3.6.1. Efeito do pH na reação de esterificação

Para verificar o efeito do pH na eficiência catalítica da enzima imobilizada em gel de ágar, estudou-se a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol. Como mostrado anteriormente, esta foi a reação que apresentou melhor resultado, usando palatase M imobilizada em organo-gel.

As condições utilizadas para a reação foram: tempo = 24 horas; [palatase] = 60 mg/mL no gel de ágar; pH = 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 e temperatura a 25 °C. Os resultados obtidos em diferentes pH, mostraram que para esta reação o pH não interfere no rendimento do produto. Para todas as reações, o rendimento em éster ficou em torno de 100% (**Figura 21**).

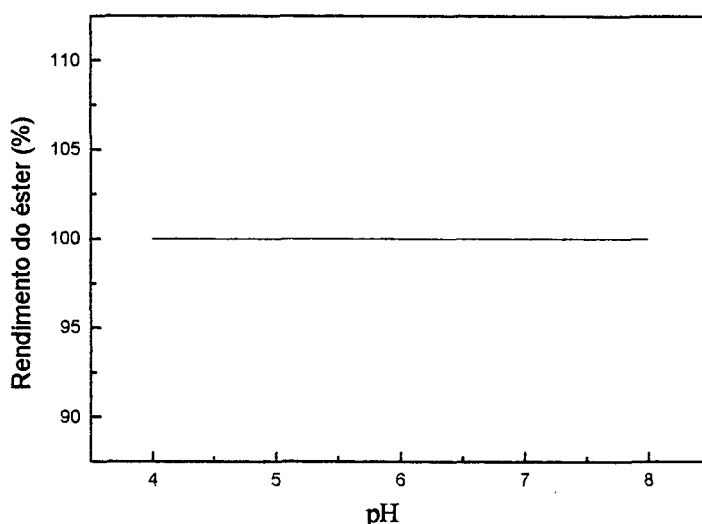


Figura 21. Efeito do pH na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, catalisada por palatase M imobilizada em gel de ágar, a 25 °C.

Este resultado pode ser explicado pelo fato de que palatase M é um lipase que atua em uma faixa de pH bastante ampla, diferindo das maiorias das outras enzimas que apresentam um pH característico em que sua atividade é máxima, sendo que acima ou abaixo desse pH a sua atividade é diminuída.²

A inter-relação da atividade enzimática com o pH para qualquer enzima depende do comportamento ácido-básico desta e do substrato, bem como de

muitos fatores que em geral, são difíceis de serem analisados quantitativamente. Variando o pH de uma reação enzimática a conformação da enzima pode mudar e/ou ocorrer a ionização dos reagentes e de alguns resíduos de aminoácidos. A nova conformação da enzima e a distribuição de cargas pode ou não ser responsável por sua atividade, e também pode ou não alterar a seletividade quanto ao tipo de substrato.³

Outra consideração referente ao pH é o efeito que ele terá sob possíveis reações laterais. Foi mostrado que para reações catalisadas por esterase do pâncreas do porco (PLE), que embora a velocidade catalítica de hidrólise foi muito mais rápida em pH = 8,0, a reação também foi beneficiada em um pH menor, onde a contribuição da hidrólise não enzimática foi pequena. Na preparação de lactonas, monoéster e ácido ciclo-hexanodicarboxílico enantiomericamente puro, foi observado que reduzindo a hidrólise não catalisada, o excesso enantiomérico pode ser aumentado. Portanto, a otimização do pH pode ser extremamente útil nas reações sintéticas catalisadas por enzimas.⁶⁹

3.6.2. Efeito da temperatura na reação de esterificação

De modo análogo ao que ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas aumentam geralmente com a temperatura, dentro de uma faixa na qual a enzima é estável e mantém sua atividade integral. Ainda que as vezes as reações catalisadas por enzimas pareçam muitas vezes, apresentar uma temperatura ótima, isto ocorre porque as enzimas, sendo proteínas, são desnaturadas pelo calor e tornam-se inativas à medida que a temperatura aumenta.³

Na **Figura 22** pode ser observado o efeito da temperatura, na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, catalisada por palatase M. O rendimento do éster aumentou quando a temperatura foi alterada de 25 °C para 35 °C. Acredita-se, que a enzima ainda permanece estável e mantém sua atividade catalítica integral, nesta faixa de temperatura (25-35 °C). Para temperaturas superiores a 35 °C, ocorre um decréscimo no rendimento do éster,

indicando que acima desta temperatura a enzima não está com sua atividade catalítica máxima.

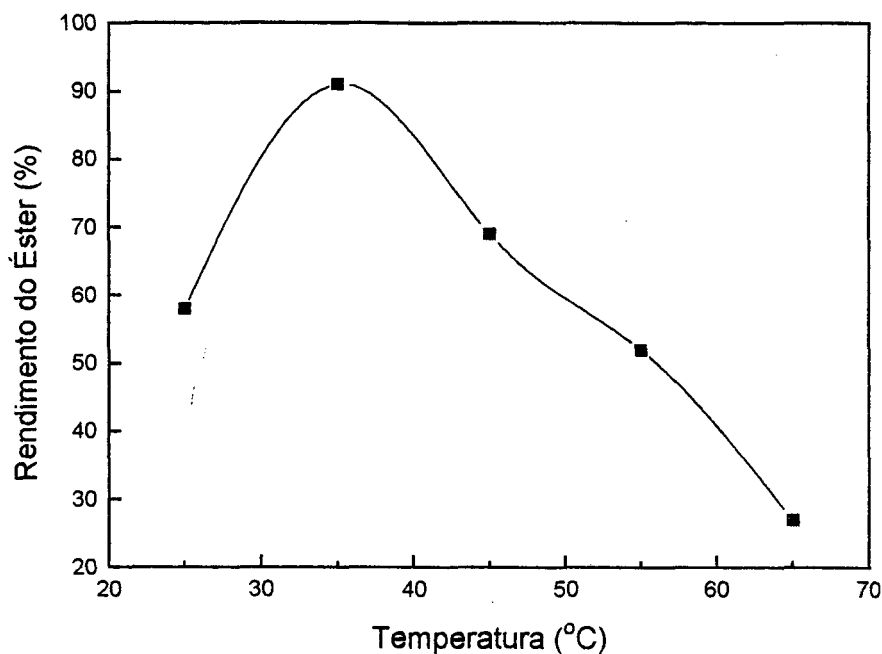


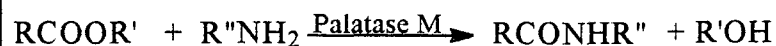
Figura 22. Efeito da temperatura na reação de esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol, catalisada por palatase *M* imobilizada em gel de ágar.

Tempo = 12 horas, palatase = 60 mg/mL

3.6.3. Palatase *M* em reações de aminólise de ésteres

Está bem estabelecido que enzimas hidrolíticas, tais como lipases, esterases e proteases são estáveis em solventes orgânicos e podem ser utilizadas em hidrólise enantiosseletiva, esterificação e transesterificação. Pesquisas recentes tem demonstrado que as enzimas hidrolíticas podem também ser usadas para a acilação de alquil aminas. As reações de amidação catalisadas por hidrolases, têm sido aplicadas nas sínteses de peptídeos de D ou L-aminoácidos N-protetido, e na aminólise para a resolução de ácidos carboxílicos quirais e aminas quirais.⁷⁰

Neste trabalho, investigou-se a síntese de amidas N-substituídas, através da reação de amidação (ácido carboxílico e amina), usando papaína como catalisador. Os resultados mostraram que ocorre a formação de sal para a reação de amidação. Uma nova tentativa de síntese de amidas foi usar a palatase M, como catalisador na reação de aminólise de ésteres (**Equação 6**), visto que com a reação de amidação ocorre a formação de sal (**Figura 16**).



Esquema 7. Equação geral para a reação de aminólise de ésteres (éster e amina).

Os ésteres utilizados foram o hexanoato de tricloroetila e butirato de etila. Os resultados são mostrados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Reações de aminólise de ésteres usando n-octilamina como nucleófilo, em várias condições.

Reagentes	Rendimento (%)
Hexanoato de tricloroetila (palatase M/gel de ágar)	92
Hexanoato de tricloroetila (palatase M/em suspensão)	84
Hexanoato de tricloroetila (sem enzima)	82
Butirato de etila (palatase M/gel de ágar)	31
Butirato de etila (sem enzima)	4

tempo = 10 horas, T = 35 °C.

a) rendimento determinado por RMN ¹H.

Os resultados foram surpreendentes, usando o hexanoato de tricloroetila como substrato, a formação da amida ocorreu com ou sem catalisador, com

rendimentos próximos. Este resultado pode ser explicado, considerando que ($-\text{CH}_2\text{CCl}_3$) é um bom grupo de saída. O mesmo efeito não foi observado quando se utiliza o butirato de etila. A formação da amida usando a enzima ocorreu com rendimento de 31 %. Com a ausência do catalisador, o rendimento da amida foi muito baixo (4%). Comparando os dois ésteres pode-se ter idéia de quanto um grupo de saída influencia numa reação.

3.7. Análise espectroscópica de RMN ^1H

Os rendimentos dos produtos obtidos, como descrito nos itens 3.2, 3.2.3, 3.3, 3.4, 3.5.1, 3.5.2, 3.5.4, 3.6.1 e 3.6.2, foram quantificados por espectros de RMN ^1H e a estrutura confirmada por IV, RMN ^1H e massa quando necessário. A **Tabela 9** mostra os deslocamentos químicos dos sinais característicos dos prótons metilênicos ($-\text{CH}_2\text{OOCR}$) dos ésteres e das amidas ($-\text{CH}_2\text{NHCOR}$).

Tabela 9. Deslocamentos químicos dos produtos (ésteres e amidas).

COMPOSTOS	PRODUTOS	δ_H (ppm)	δ_H (ppm)
		-CH ₂ OCOR	-CH ₂ NHCOR
1	RCOOCH ₂ CH ₃	4,10 (q)	---
2	RCOOCH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	4,06 (t)	---
3	RCOOCH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	4,06 (t)	---
4	RCOOCH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃	4,06 (t)	---
5	RCOOCH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃	4,06 (t)	---
6	RCOOCH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃	4,05 (t)	---
7	RCOOCH ₂ (CH ₂) ₁₄ CH ₃	4,06 (t)	---
8	RCOOCH ₂ (CH ₂) ₁₆ CH ₃	4,08 (t)	---
9	R'COOCH ₂ CH ₃	4,11 (q)	---
10	R'COOCH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	4,08 (t)	---
11	R'COOCH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	4,06 (t)	---
12	R'COOCH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃	4,06 (t)	---
13	R'COOCH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃	4,05 (t)	---
14	R'COOCH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃	4,06 (t)	---
15	R'COOCH ₂ (CH ₂) ₁₄ CH ₃	4,07 (t)	---
16	R'COOCH ₂ (CH ₂) ₁₆ CH ₃	4,07 (t)	---
17	RCOOCH ₂ (CH ₂) ₂ C \equiv CH	4,17 (t)	---
18	RCOOCH ₂ CH ₂ C \equiv CHCH ₃	4,12 (t)	---
19	R'COOCH ₂ (CH ₂) ₂ C \equiv CH	4,16 (t)	---
20	R'COOCH ₂ CH ₂ C \equiv CHCH ₃	4,13 (t)	---
21	RCOOCH(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH ₃	4,12 (m)	---
22	RCOOCH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH ₃	3,88 (m)	---
23	RCOOCH ₂ CF ₃	4,46 (q)	---
24	R'CONHCH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃	---	3,16 (q)
25	R''CONHCH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃	---	3,16 (q)

s = singlete; t= triplete; q = quarteto e m = multiplete

R = CH₃(CH₂)₉CH₂-; R' = CH₃(CH₂)₃CH₂-; R'' = CH₃(CH₂)₂CH₂-

3.8. Espectros no IV, de RMN ^1H e de massas do laurato de *n*-pentila e *N*-octilhexamida

A análise dos espectros no IV, de RMN ^1H e de massas, será apresentada para o laurato de *n*-pentila (**Figuras 23-25**) e *N*-octilhexamida (**Figuras 26-28**). Os outros compostos obtidos possuem comportamento semelhantes.

Os ésteres possuem duas bandas de absorção bastante intensas provenientes das deformações axiais de C=O e C-O. Em 1738 cm^{-1} tem-se a banda de deformação axial de C=O. A banda de deformação axial de C-O, são na verdade duas vibrações assimétricas acopladas: C-C(=O)-O (1174 cm^{-1}) e O-C-C (1114 cm^{-1}), a primeira sendo mais importante.⁷¹

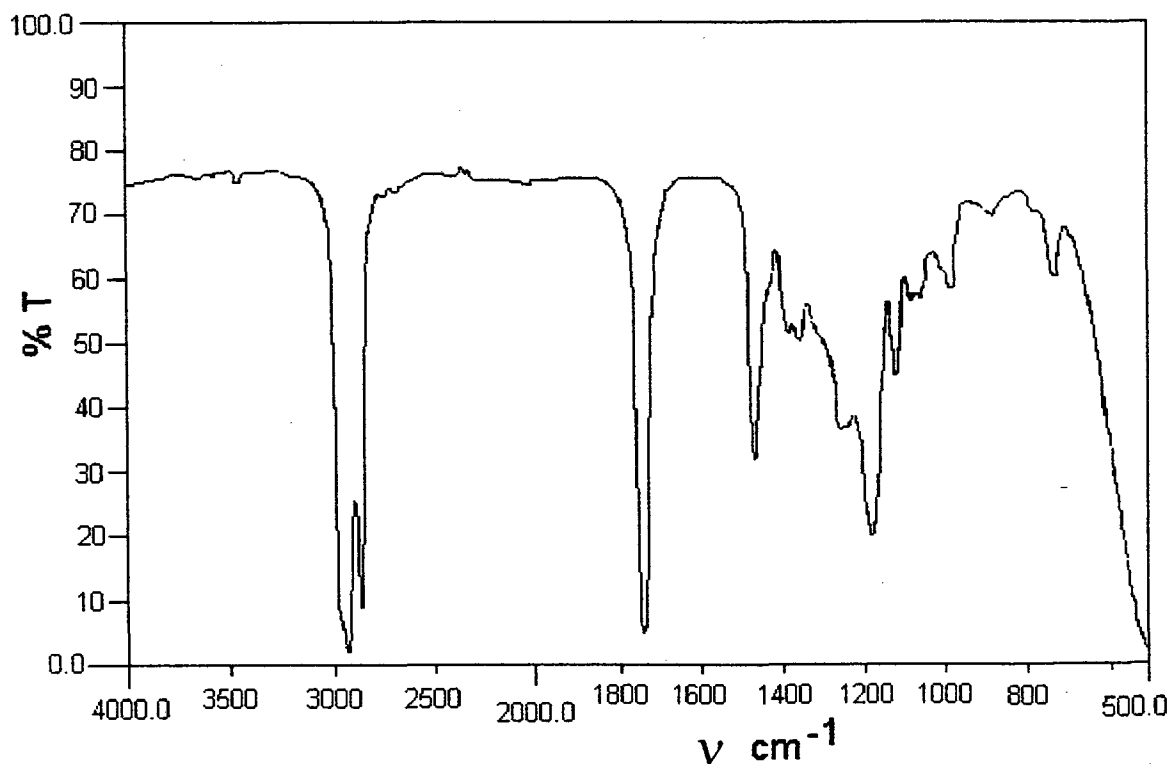


Figura 23. Espectro de absorção na região do infravermelho do laurato de *n*-pentila, em filme.

O espectro de RMN ^1H (Figura 24) mostra um triplete em 4,05 ppm que corresponde aos prótons metilênicos ligado ao oxigênio [$-\text{CH}_2-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{R}$] evidenciando a formação do éster. Em 2,29 ppm tem-se o sinal dos prótons metilênicos ligados a carbonila [$-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}(\text{OR})$]. Os demais prótons referentes aos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ apresentam-se como multipletes na região de 0,8 -1,7 ppm.

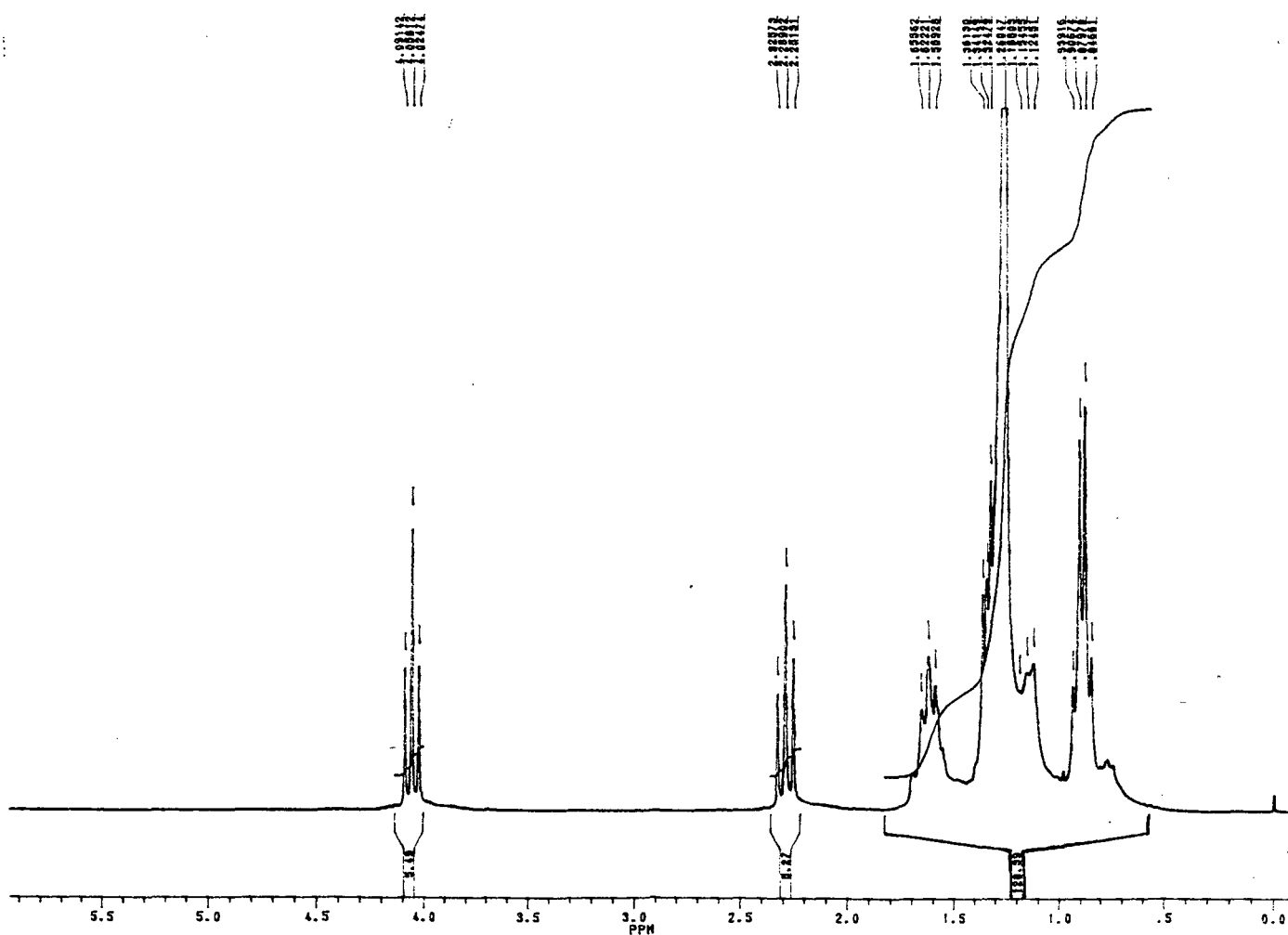
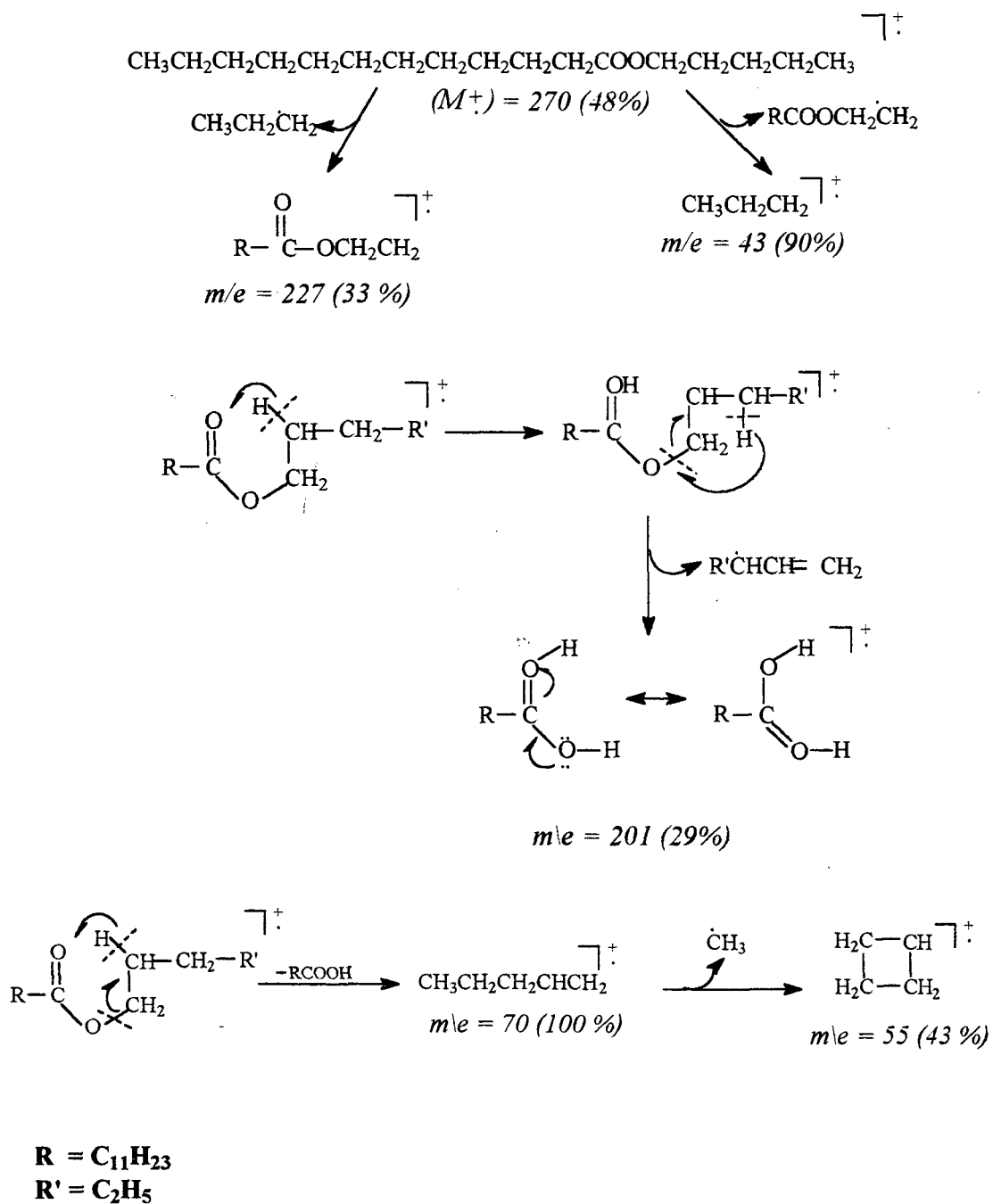


Figura 24. Espectro de RMN ^1H do laurato de *n*-pentila, usando CDCl_3 como solvente e TMS como padrão interno.

Os principais fragmentos observado no espectro de massas (**Figura 25**) do laurato de n-pentila são apresentadas a seguir:



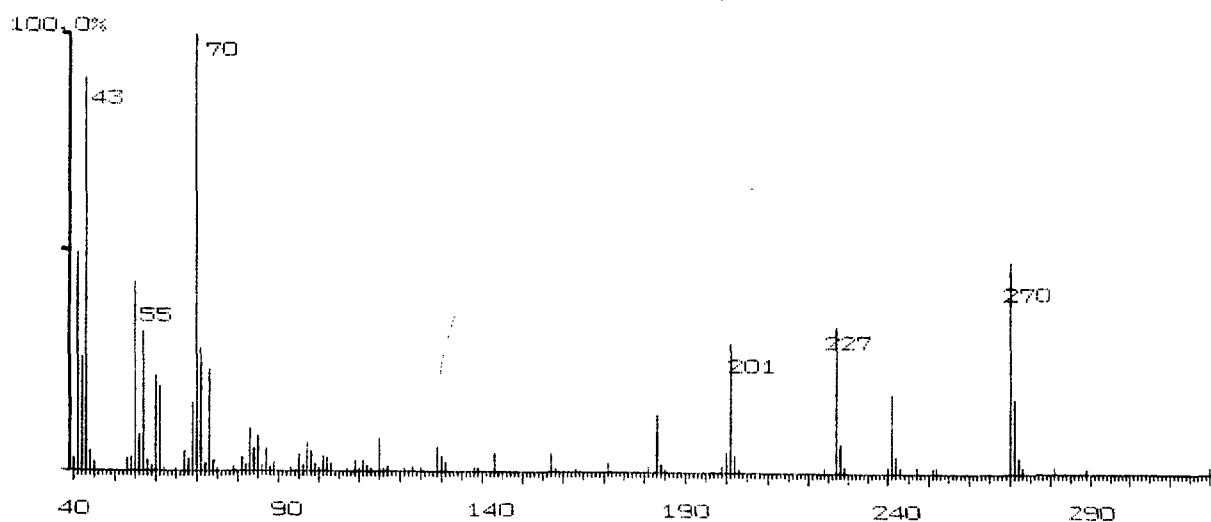


Figura 25. Espectro de massas do laurato de *n*-pentila.

A seguir será apresentado a análise dos espectros no IV, de RMN ^1H e de massas, para a N-octilhexamida (**Figuras 26-28**).

O espectro no IV da N-octilhexamida (**Figura 26**), mostra as bandas características das vibrações de deformação axial de N–H em 3294 e 3090 cm^{-1} . Estas bandas somente são observadas quando o grupamento amida ligam-se, produzindo dímeros em conformação cis e polímeros em conformação trans.⁷⁰ Todas amidas mostram um banda de absorção de carbonila, mais conhecida como banda de amida I. A vibração de deformação axial de C=O para a N-octilhexamida é observada em 1640 cm^{-1} . A banda em 1554 cm^{-1} corresponde à vibração de deformação angular do N–H (banda de amida II).

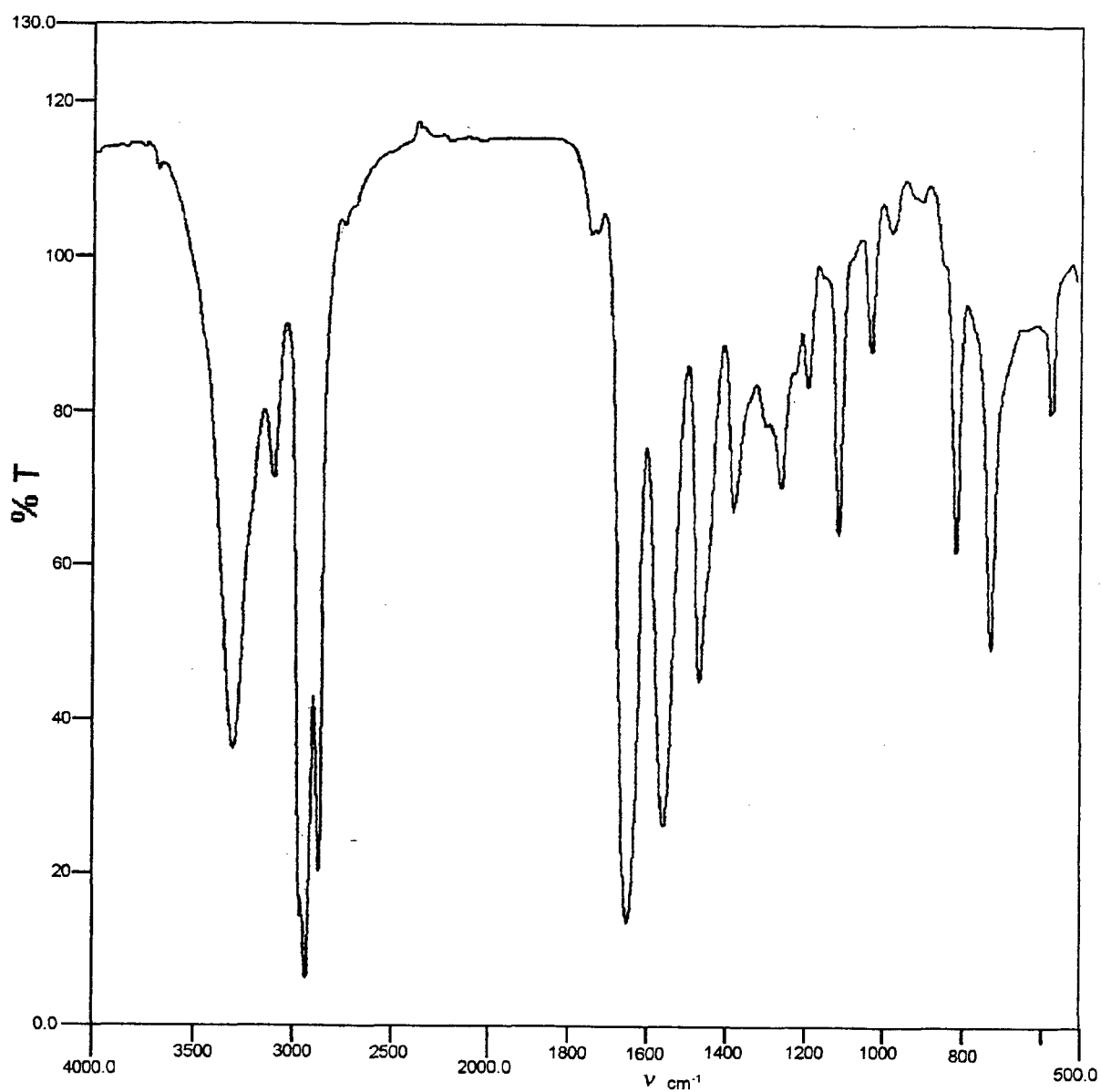


Figura 26. Espectro de absorção na região do infravermelho da N-octilhexamida, em filme.

O espectro de RMN ^1H da N-octilhexamida (**Figura 27**), mostra um quarteto em 3,13 ppm que corresponde aos prótons metilênicos ligado ao nitrogênio [$-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{R}$] evidenciando a formação da amida. Em 2,09 ppm tem-se o sinal dos prótons metilênicos ligados a carbonila [$-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}(\text{NHR})$]. Os demais prótons referentes aos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ apresentam-se como multipletes na região de 0,5-1,7 ppm. Em 5,9 ppm tem-se o sinal do hidrogênio ligado ao nitrogênio (N-H).

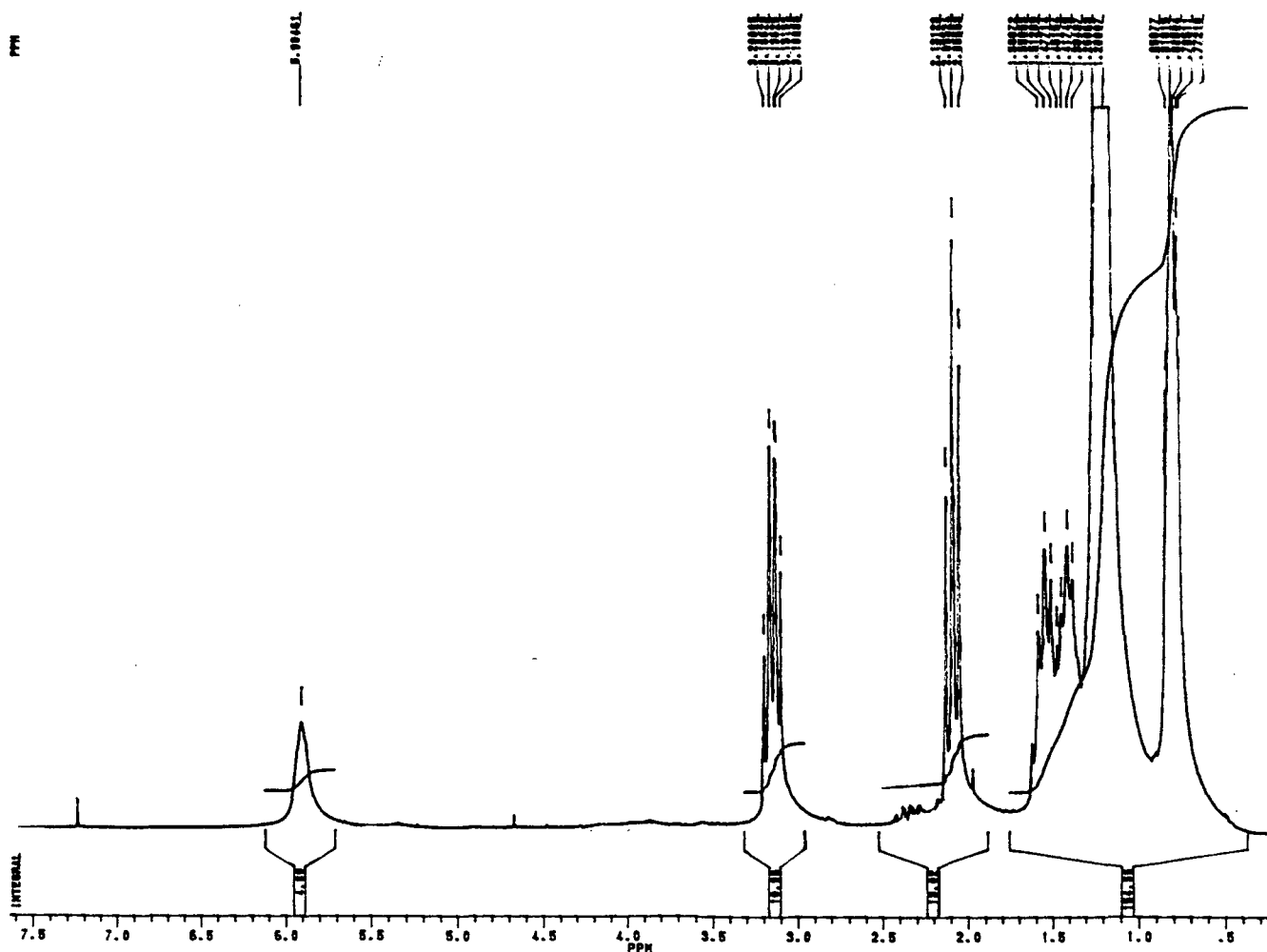
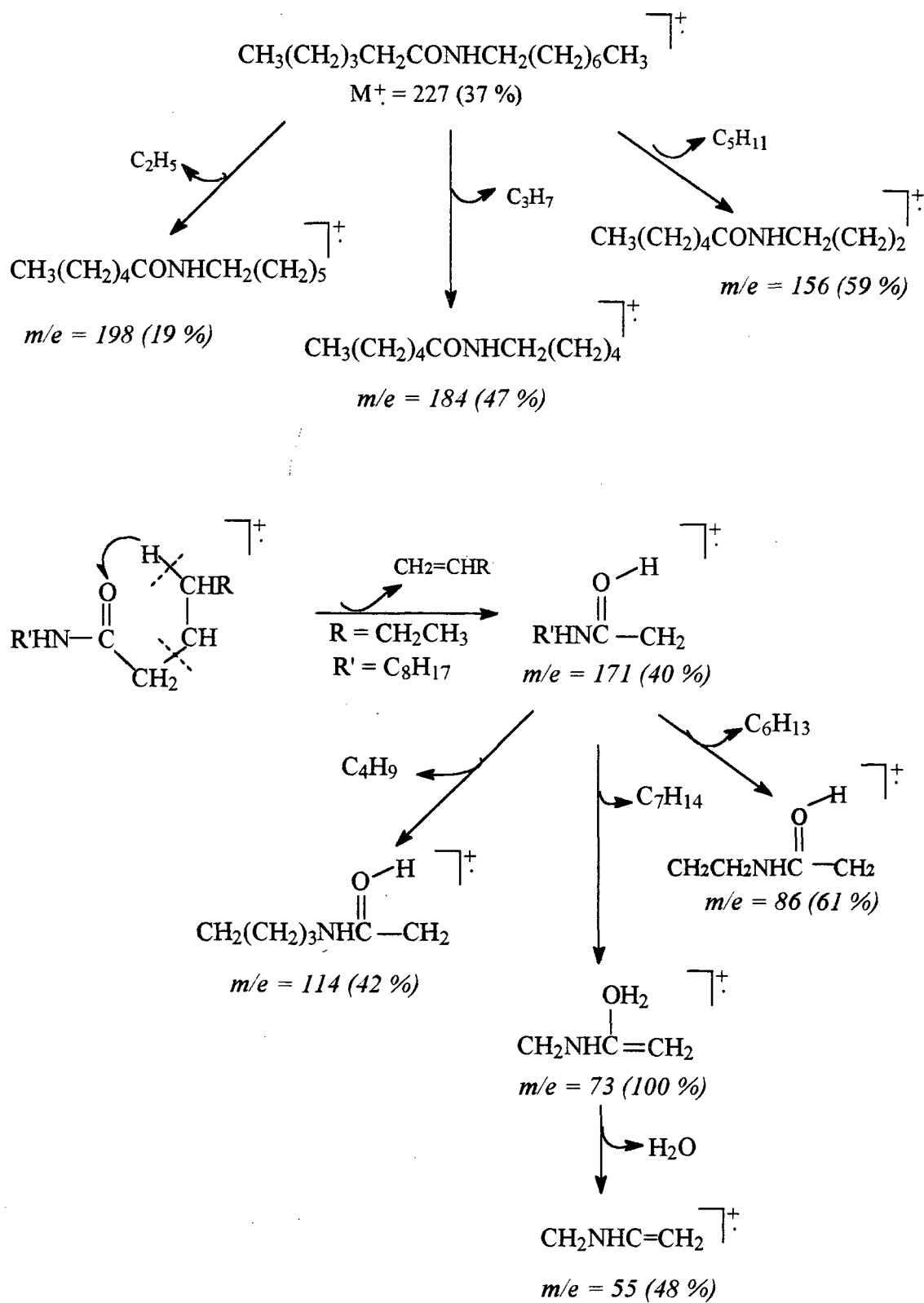


Figura 27. Espectro de RMN ^1H da N-octilhexamida, usando CDCl_3 como solvente e TMS como padrão interno.

Os principais fragmentos observados no espectro de massas de *N*-octilhexamida (Figura 28) são apresentados a seguir:



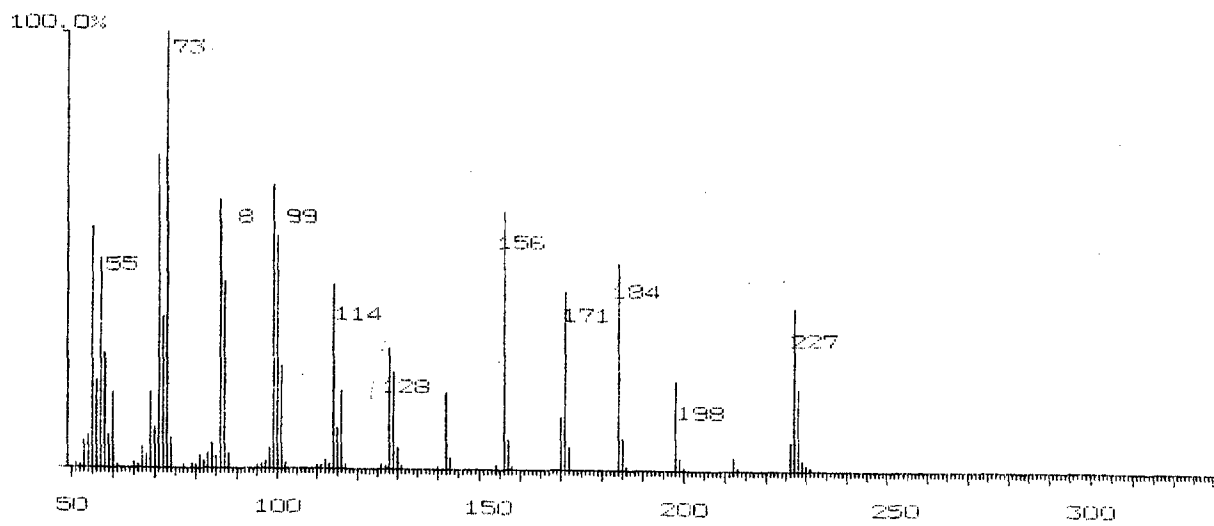


Figura 28. Espectro de massas da N-octilhexamida.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e discutidos no Capítulo III, as principais conclusões deste trabalho são:

- A análise comparativa entre os diagramas de fases, até o momento, mostra que cada solvente interage no sistema de organo-gel de uma forma peculiar à sua estrutura e propriedades físico-químicas. A formação de organo-géis estáveis é também influenciada por W_0 , os géis formam-se mais facilmente em valores de W_0 maiores.
- O organo-gel contendo enzima proporciona um bom método para realizar transformações químicas em solventes orgânicos, obtendo produtos com bons rendimentos. O sistema possui vantagens sobre as microemulsões a/o convencionais, em relação ao isolamento do produto. Para isolar o produto da microemulsão a/o, é necessário fazer separação de fases, enquanto que em organo-gel o produto, é facilmente separado do meio reacional, por decantação.
- O emprego do organo-gel como suporte tem limitações quanto ao tipo de enzima (como foi verificado com a papaína) e quanto aos substratos (como observado para substratos muito polares, por exemplo o trifluoretanol o qual destrói o organo-gel).
- Os organo-géis contendo palatase M apresentaram boa estabilidade com relação a atividade catalítica da enzima e integridade do suporte.

- As sínteses utilizando palatase M imobilizada em organo-gel formaram os produtos com bons rendimentos, mostrando que a enzima é eficiente para a síntese de ésteres.
- A palatase M apresentou melhor eficiência catalítica para a esterificação do ácido láurico do que para a esterificação do ácido hexanóico.
- O gel de ágar também mostrou ser um bom suporte para a imobilização de palatase M, devido as suas propriedades físico-químicas serem diferentes do organo-gel. Este pode ser utilizado em síntese onde necessite de temperaturas mais elevadas, pois o gel de ágar não apresentou nenhuma alteração quando foi aquecido de 25 a 55 °C.
- A variação no pH, não alterou o rendimento do laurato de n-pentila, enquanto que existe uma temperatura ótima (~35 °C) no qual o rendimento da reação foi maior quando utilizou-se palatase M em gel de ágar como catalisador.

CAPÍTULO V

5. PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

- Novos estudos envolvendo a utilização de papaína como catalisador, em busca da condição ótima de síntese para esta enzima.
- Estudar o efeito do pH na eficiência catalítica de palatase M em tempos diferentes realizados neste trabalho, bem como acompanhamento da reação por RMN ^1H .
- Verificar o efeito da temperatura sobre a eficiência catalítica de palatase M, variando o tempo de reação.
- Observar se realmente o ácido láurico é o melhor substrato para palatase M, através da reação de esterificação, utilizando diferentes ácidos carboxílicos e um álcool específico.
- Estudar o efeito do grupo de saída em reações de aminólise de ésteres, como por exemplo o uso do acetato de vinila.

CAPÍTULO VI

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- DUGAS, H.; PENNEY, C. **Bioorganic chemistry**. New York : Sringer-Verlag, 1981. cap. 4, p. 179-246.
- 2- LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principies of biochemistry**. Worsh Publishers, New York, 1993, p. 198-239.
- 3- WONG, C.; WHITESIDES, M. **Enzymes in synthetic organic chemistry**. v. 12, Pergamon, 1994, cap. 1-2, p. 1-130.
- 4- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Sringer-Verlag New York INC., 1992, cap. 1-2, 1-245.
- 5- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.
- 6- RAWN, J. D. **Biochemistry**. EUA : Neil Patterson publishers, 1989. cap. 7, p. 149-193.
- 7- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. John Wiley & Sons Inc., 1990, p. 109.
- 8- Lowe, G. The cysteine proteinases. **Tetrahedron**, v. 32, p. 291-302, 1976.
- 9- INTERNET: <http://www.mbp.duke.edu/mbp/geom/atlas/pap/gif/pap.gif>
- 10- BONNEAU, R. P.; MARTIN, R.; LEE, T.; et al. Enzymes in organic synthesis. Present and future. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 7, n. 5, p. 357-369, 1996.
- 11- A Concise Dictionary of Chemistry, OXFORD, p. 243, 1990.

- 12- Catálogo da Sigma, p. 875, 1995.
- 13- KAMPHUIS, I. G.; KALK, K.H.; SWARTE, M. B. A.; DREANTH, J. Structure refined of papain at 1,65 Angstrom resolution. **J. Molecular Biology**, v. 179, n.2, p. 233-256, 1984.
- 14- STEHLE, P.; BAHSITTA, H. P.; MONTER, B.; FÜRST, P. Papain-catalysed synthesis of dipeptides: A novel approach using free amino acids as nucleophiles. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 12, p. 56-60, 1990.
- 15- BARBAS, C. F.; WONG, C. Papain catalysed peptide synthesis: control of amidase activity and the introduction of unusual amino acids. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p.533-534, 1987.
- 16- TAI, D. -F.; FU, S. -L.; CHUANG, S. -F.; TSAI, H. Papain catalyzed esterification in polar organic solvents, **Biotech. Lett.**, v. 11, n. 3, p. 173-176, 1989.
- 17- INTERNET: <http://www.york.ac.uk/~clarke/#sources>
- 18- DESNUELLE, P., The lipases. In: **The enzymes**, New York : Academic Press, v. 7, p. 575, 1975.
- 19- BRZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, V.; 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.
- 20- COTTERIL, I. C.; SUTHERLAND, A. G.; ROBERTS, S. M.; GROBBAUER, R.; SPREITZ, J.; FABER, K. Enzymatic resolution of sterically demanding bicyclo[3.2.0]heptanes: Evidence for a novel hydrolase in crude porcine pancreatic using organic media for some of the biotransformation. **J. Chem. Soc. Perkin Trans 1**, p. 1365-1373, 1991.

- 21- LADNER, W. E.; WHITESIDES, G. M. Lipase catalysed hidrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 106, p. 7250-7251, 1984.
- 22- HULTIN, P. G.; JONES, J. B. Dilemma regarding an active site model for porcine pancreatic lipase. **Tetrahedron Lett.**, v. 33, n.11 , p. 1399-1402, 1992.
- 23- MARGOLIN, A. L.; KLIBANOV, A. M. Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvents. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 109, n. 12, p. 3802-3805, 1987.
- 24- FERNANDÉZ, S.; BRIEVA, R.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V. Lipase-catalyzed enantioselective acylation de N-protected or unprotected 2-aminoalkan-1-ols. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1**, n. 21, p. 2885-2889, 1992.
- 25- GUTMAN, A. L.; MEYER, E.; YUE, X.; ABELL, C. Enzymatic formation of lactams in organic solvents. **Tetrahedron Lett.**, v. 33, n. 27, p. 3943-3946, 1992.
- 26- GUTMAN, A. L.; ZUOB, K.; BOLTANSKI, A. Enzymatic lactonisation of γ -hydroxyesteres in organic solvents. Synthesis of optically pure γ -methylbutyrolactones and γ -phenylbutyrolactones. **Tetrahedron Lett.**, v. 28, n. 33, p. 3861-3864, 1987.
- 27- GUTMAN, A. L.; OREN, D.; BOLTANSKI, A.; BRANDO, T. Enzymatic oligomerisation versus lactonisation of ω -hydroxyesteres. **Tetrahedron Lett.**, v. 28, n. 44, p. 5367-5368, 1987.
- 28- MARGOLIN, A. L.; CRENNE, J. Y.; KLIBANOV, A. M., Stereosective oligomerizations catalyzed by lipases in organic solvents. **Tetrahedron Lett.**, v. 28, n. 15, p. 1607-1610, 1987.

- 29- WALLACE, J. S.; REDA, K. B.; WILLIAMS, M. E.; MORROW, C. J. Resolution of chiral ester by lipase-catalyzed transesterification with poly(ethylene glycol) in organic media. **J. Org. Chem.**, v. 55, p.3544-3546, 1990.
- 30- STOKES, T. M.; OEHLISCHLAGER, C., Enzymes reactions in apolar solvents: the resolution of (\pm)-sucatol with porcine pancreatic lipase. **Tetrahedron Lett.**, v. 28, n. 19, p. 2091-2094, 1987.
- 31- JANSSEN, A. J. M.; KLUNDER, A. J. H.; ZWANENBURG, B., Enzymatic resolution of norbor(Ne)nyl-methanols in organic media and an application to the synthesis of (+)-and(-) endo-nobornene lactone. **Tetrahedron**, v. 47, n. 29, p. 5513-5538, 1991.
- 32- NISHIDA, T.; NIHIRA, T.; YAMADA, Y., Facile synthesis of racemic 2-hexyl-3-hydroxy-4-pentanolide (NFX-2) and its optical resolution. **Tetrahedron**, v. 47, n. 29, p. 6623-6634, 1991.
- 33- SUGAI, T.; KAKEYA, H.; OHTA, H.; et al. A synthesis of (-)-deoxypodocarpic acid methyl ester via an enzymatic enantioselective hydrolysis of the key intermediate enol ester. **Tetrahedron**, v. 45, n. 19, p. 6135, 1989.
- 34- KIRCHNER, G.; SCOLLAR, M. P.; KLIBANOV, A. M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 107, p. 7072-7076, 1985.
- 35- BOLAND, N.; FROBL, C.; LORENZ, M. Stereolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. **Synthesis**, v. 12, p. 1049-1072, 1991.
- 36- HUNGHERS, D. L.; BERGAN, J. J.; AMATO, J.S.; BHUPATHY, M.; et. al. Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of esteres having remote chiral/prochiral centers. **J. Org. Chem.**, v. 55, p. 6252-6259, 1990.

- 37- KAZLAUSKAS, R. L. WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **J. Org. Chem.**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.
- 38- PEDERSON, R. L.; LIU, K. K. -C.; RUTAN, J. F.; CHEN, L.; WONG, C. -H., Enzymes in organic synthesis: synthesis of highly enantiomerically pure 1,2- Epoxy aldehydes, epoxy alcohols, thirane, aziridine, and glyceraldehyde 3-phosphate. **J. Org. Chem.**, v. 55, p. 4897-4901, 1990.
- 39- HSU, S. -H.; WU, S. -S.; WANG, Y. -F; WONG, C. -H. Lipase-catalyzed irreversible transesterification using enol ester: XAD-8 immobilized lipoprotein lipase-catalyzed resolution of secondary alcohols. **Tetrahedron Let.**, v. 31, n. 44, p. 6403-6406, 1990.
- 40- BIANCHI, D.; CESTI, P.; BATTISTEL, E., Anhydrides as acylating agents in lipase-catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols. **J. Org. Chem.**, v. 53, p. 5531-5534, 1988.
- 41- NASCIMENTO, M. G.; REZENDE, M. C.; VECCHIA, R. D.; JESUS, P.C; AGUIAR, L. M. Z. Enzyme-catalyzed esterification in microemulsion-based organo gels. **Tetrahedron Lett.**, v. 33, p. 5891-5894, 1992.
- 42- SONNET, P. E. Kinetic resolution of aliphatic alcohols with a fungal lipase from *Mucor miehei*. **J. Org. Chem.**, v. 52, p. 3477-3483, 1987.
- 43- CHAN, C.; COX, P. B.; ROBERTS, S.M. Convergent stereocontrolled synthesis of 13-hydroxy-9Z, 11E-octadecadienoic acid. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 971-972, 1988.

- 44- ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. Synthesis of n-octyl oleate with lipase from *Mucor miehei* immobilized onto polyethylene based graft copolymers. **Biocatalysis**, v. 9, p. 157-167, 1994.
- 45- BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; ZYGMUNT, S; et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.
- 46- Novo Nordisk A/S - Ficha Técnica de Palatase M - Enzyme Process Division, 1996.
- 47- KOSKINEN, A.M.P.; KLIBANOV, A. M. **Enzymatic reactions in organic media**. First edition. Blackie Academic & Professional, 1996. cap. 2, p. 9-37.
- 48- ARNAUD, A.; KUBIAK, C.; BERSET, C.; et al. **Biotecnologia**. Editora Manole, 1985. cap. 3, p. 220-236.
- 49- ROBINSON, B. H. Microemulsions-properties and novel chemistry. **Chemistry in Britain**, v. 4, n. 26, p. 342-348, 1990.
- 50- ATKINSON, P. J.; ROBINSON, B. H.; HOWE, A.M.; et al. Characterization of water-in-oil microemulsions and organo-gel based on sulphonate surfactants. **Colloids and Surfaces**, p. 231-242, 1995.
- 51- REES, G. D.; ROBINSON, B. H. Microemulsions and organo gels : properties and novel applications. **Advanced Material**, p. 609-618, 1993.
- 52- 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.

- 53- PETIT, C.; ZEMB, T.; PILENI, M. P.; et al. Gelation of reverse micelles. **A.I.P. Conf. Proc.**, v. 226, p. 509-517, 1991.
- 54- REES, G. D.; NASCIMENTO, M. G.; TUAH, R. J.; et al. Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organo-gels. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1073, p. 493-501, 1991.
- 55- CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. **Advances in Polymer Science 83**, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1987. p.107-125.
- 56- SUNGUR, S.; AKBULUT, U. Immobilisation of β -galactosidase onto gelatin by glutaraldehyde and chromium (III) acetate. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 59, p. 303-306, 1994.
- 57- ATKINSON, P. J.; GRIMSON, M. J.; HEENAN, R. K.; et al. Structure of microemulsion-based organo-gels. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 1807-1809, 1989.
- 58- SRIVASTAVA, R. C.; MADAMWAR, D. B.; VYAS, V. V. Activation of enzymes by reversed micelles. **Biotech. Bioeng.**, v. 29, p. 901-902, 1987.
- 59- MRANI, I.; FRAS, G.; BÉNET, J. C. Microstructure et propriétés hygro-mécaniques du gel d'agar. **J. Phys. III**, v. 5, p. 985-998, 1985.
- 60- BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M.; HALLING, P. Agarose-Chymotrypsin as a catalyst for peptide and amino acid ester synthesis in organic media. **Biotech. Lett.**, v. 11, n. 11, p. 811-816, 1989.
- 61 - MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes & solventes, 2^a ed., Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo, p. 272-279, 1972.

- 62- LUISI, P. L.; SCARTAZZINI, G. H.; SCHURTENBERGER, P. Organogels from water-in-oil microemulsions. **Colloid & Polym. Sci.**, v. 268, n. 4, p. 356-374, 1990.
- 63- NASCIMENTO, M. G.; AGUIAR, L. Z.; PRUDENCIO G. E.; et al. The preparation of microemulsion-based of n-hexane or cyclohexane for enzyme immobilization. **Química Nova**, v. 16, n.5, p.414-415, 1990.
- 64- AGUIAR, L. Z. Estudo da atividade enzimática e das propriedades físico-químicas do organo-gel através de reações catalisadas pela CV lipase. **Dissertação de Mestrado-UFSC**, 1992.
- 65- VECHHIA, R. D. Síntese de ésteres alifáticos catalisada pelo CV lipase imobilizada em microemulsão água-óleo em sistema de organo-gel. **Dissertação de Mestrado-UFSC**, 1994.
- 66- CANTACUZENE, D.; PASCAL, F.; GUERREIRO, C. Synthesis of amino acid esters by papain. **Tetrahedron**, v. 43, n. 8, p. 1823-1826, 1987.
- 67- LANGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI J. Lipase catalyzed formation of flavour esters. **Biotechnol. Lett.**, v. 10, n. 8, p. 549-554, 1988.
- 68- JOÃO, J. J. Determinação de coeficiente de difusão de ésteres e reações de transesterificação catalisadas por enzimas imobilizadas em organo-gel. **Dissertação de Mestrado-UFSC**, 1994.
- 69- BJOERKLIN, F.; BOUTELJE, J.; GATENBECK, S.; et al. Enzyme catalyzed hydrolysis of the diesters of cis-and-trans-ciclohexanedicarboxylic acids. Bioorganic preparation of enantiomerically pure cyclohexanedicarboxylic acids, monoesters and lactones. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, n. 1-2, p. 16-19, 1985.

70- ZOETE, M. C.; KOCK-VAN DALEN, A. C.; VAN RANTWIJK, f.; et al. A new enzymatic reaction: enzyme catalyzed ammonolysis of carboxylic esters. **Biocatalysis**, v. 10, p. 307-316, 1994.

71- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**, 5th ed., John Wiley & Sons, inc., p. 3-207, 1991.