

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

## **IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM MATERIAIS POLIMÉRICOS**

Janaina da Silva Crespo

Florianópolis  
1999

Janaina da Silva Crespo

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM  
MATERIAIS POLIMÉRICOS

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em  
Química (área de concentração: Físico-Química)  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como parte dos requisitos para a obtenção  
do grau de Mestre em Química.

Orientador: Valdir Soldi

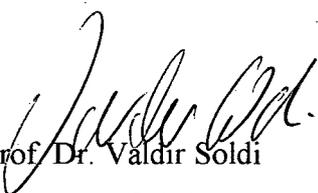
Co-Orientadora: Maria da Graça Nascimento

Florianópolis  
1999

Janaina da Silva Crespo

## IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM MATERIAIS POLIMÉRICOS

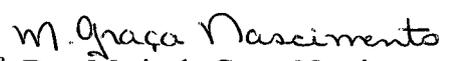
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Valdir Soldi

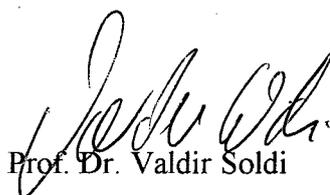
Depto. de Química

Orientador

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria da Graça Nascimento

Depto. de Química

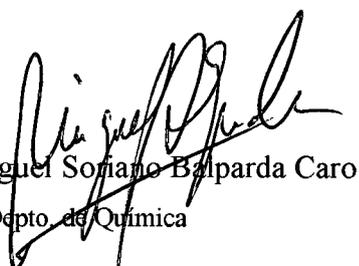
Co-Orientadora



Prof. Dr. Valdir Soldi

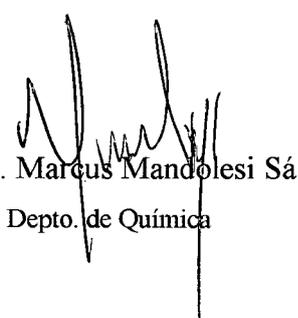
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Depto. de Química



Prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá

Depto. de Química



Prof. Dr. Renato Wendhausen Junior

Depto. de Química

Universidade Regional de Blumenau

A meus pais e ao Marcelo pelo  
carinho, estímulo e apoio

## Agradecimentos

- ◆ A professora Maria da Graça Nascimento pela liberdade de trabalho, dedicação, orientação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.
- ◆ Ao professor Valdir Soldi pelo incentivo, orientação e amizade sempre presentes ao longo da realização deste trabalho.
- ◆ Ao professor Miguel B. Caro pela sua paciência e valiosa contribuição nas análises de RMN  $^1\text{H}$ .
- ◆ A Marly pela amizade, contribuição e ajuda nas análises térmicas.
- ◆ Ao LABMAT pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.
- ◆ Aos professores e demais funcionários do Departamento de Química que colaboraram para o êxito do trabalho.
- ◆ Aos colegas do Laboratório de Polímeros e Laboratório de Biocatálise, em especial a Taís que muito contribuiu para o desenvolvimento da dissertação.
- ◆ Ao CNPq e a UFSC pelo apoio financeiro.
- ◆ A Novo Nordisk e a Amano pela doação das enzimas.
- ◆ As amigas Fabíola e Marcia pelo companheirismo, amizade e incentivo para a realização deste trabalho.
- ◆ Ao Marcelo pelo carinho e incentivo, além da valiosa contribuição no manuscrito do trabalho.

## Sumário

Lista de Símbolos e Abreviaturas .....	i
Lista de Figuras .....	iii
Lista de Tabelas .....	vii
Resumo .....	ix
Abstract .....	x
<b>CAPÍTULO I</b>	
1. Introdução .....	1
1.1. Definição de Polímeros .....	1
1.2. Definição de Enzimas .....	2
1.2.1. Catálise Enzimática .....	5
1.2.2. Lipases .....	9
1.2.2.1. Lipases de Gênero <i>Candida</i> .....	11
1.2.2.2. Lipases de Gênero <i>Pseudomonas</i> .....	13
1.2.3. Resolução Enzimática .....	15
1.2.4. Imobilização de Enzimas .....	17
1.3. Rotação Óptica .....	19
1.4. Análises Térmicas e Morfológicas .....	20
1.5. Objetivos .....	23
<b>CAPÍTULO II</b>	
2. Parte Experimental .....	24
2.1. Materiais .....	24

2.2. Métodos .....	26
2.2.1. Preparação dos Filmes com Enzimas Imobilizadas .....	26
2.2.2. Síntese dos Ésteres .....	27
2.2.3. Separação e Purificação dos Produtos .....	28
2.2.4. Hidrólise dos Ésteres .....	29
2.2.5. Caracterização dos Suportes e Produtos .....	29
<b>CAPÍTULO III</b>	
3. Resultados e Discussão .....	32
3.1. Justificativa da Escolha do Polímero e Enzimas .....	32
3.2. Caracterização dos Suportes PEO/CCL e PEO/PSL .....	38
3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura .....	38
3.2.2. Análises Térmicas .....	43
3.3. Aplicação dos Suportes para Reações em Meio Orgânico .....	48
3.3.1. Efeito do Tempo de Reação, Temperatura, Concentração de Enzima e Meio Reacional na Reação de Esterificação Catalisada por CCL e PSL Imobilizadas em PEO .....	50
3.3.2. Reutilização dos Suportes PEO/CCL e PEO/PSL .....	56
3.4. Aplicação dos Suportes PEO/CCL e PEO/PSL para a Resolução Enantiosseletiva do (R,S)-2-octanol .....	58
3.5. Caracterização dos Produtos .....	62

## **CAPÍTULO IV**

4. Conclusões .....	66
---------------------	----

## **CAPÍTULO V**

5. Referências .....	68
----------------------	----

## **CAPÍTULO VI**

6. Anexos-Produção Acadêmica 1998-1999 .....	77
6.1. Cursos Realizados .....	77
6.2. Participação em Eventos .....	77
6.3. Trabalhos Apresentados em Colóquios, Conferências, Congressos, Encontros e Seminários .....	78
6.4. Trabalhos Submetidos e Aceitos em Congresso .....	79
6.5. Publicações .....	79

### Lista de Símbolos e Abreviaturas

Asp	ácido aspártico
ATP	adenosina trifosfato
TG	análise termogravimétrica
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
DSC	calorimetria de varredura diferencial
CHCl <sub>3</sub>	clorofórmio
l	comprimento da cela polarimétrica
c	concentração da solução
ccd	cromatografia de camada delgada
DTG	derivada da análise termogravimétrica
DMF	dimetil formamida
E <sub>a</sub>	energia de ativação
E	enzima
EC	<i>Enzyme Commission</i>
IV	espectroscopia de infravermelho
ee	excesso enantiomérico
ee <sub>p</sub>	excesso enantiomérico do produto
ee <sub>s</sub>	excesso enantiomérico do substrato
NaOH	hidróxido de sódio
His	histidina
A	lipase de <i>Aspergillus niger</i>
LIL	lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>
LCA	lipase de <i>Candida antarctica</i>
CCL	lipase de <i>Candida cylindracea</i>
AY	lipase de <i>Candida rugosa</i>
M	lipase de <i>Mucor javanicus</i>
LIZ	lipase de <i>Mucor miehei</i>
LPF	lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>

PSL	lipase de <i>Pseudomonas sp.</i>
PAL	lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
F	lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
PPL	lipase pancreática do porco
Mw	massa molar média em peso
MEV	microscopia eletrônica de varredura
nd	não determinada
P	polaridade do solvente
Carbopol	poli(ácido acrílico)
PVA	poli(álcool vinílico)
PS	poli(estireno)
PEO	poli(óxido de etileno)
XAD-7	resina de poli(éster acrílico)
XAD-8	resina de poli(éster acrílico)
RMN <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de próton
$[\alpha]_D^T$	rotação óptica específica
$\alpha$	rotação óptica observada
Ser	serina
S	suporte
T	temperatura
T <sub>c</sub>	temperatura de cristalização
T <sub>m</sub>	temperatura de fusão cristalina
T <sub>g</sub>	temperatura de transição vítrea
t	tempo de reação
THF	tetraidrofurano
TMS	tetrametilsilano
IUB	União Internacional de Bioquímica
u	unidade de lipase
LU	unidade de lipase
$\Delta G^\circ$	variação da energia livre padrão

## Lista de Figuras

1. Estrutura tridimensional da $\alpha$ -quimiotripsina .....	3
2. Mecanismo de atuação das enzimas .....	5
3. Diagrama de energia livre em função da coordenada de reação para uma reação catalisada e não catalisada por enzima .....	7
4. Representação da ligação de um substrato por três pontos ao sítio ativo enzimático, segundo A.G. Ogston .....	8
5. Estrutura tridimensional de uma lipase do pâncreas humano .....	10
6. Reação de esterificação enantiosseletiva do naproxen, em meio orgânico .....	11
7. Reação de esterificação do geraniol com ácido acético, em hexano .....	11
8. Reação de esterificação da diol lactona com S-(+)-ácido-2-metilbutírico, em hexano.....	12
9. Reação de transesterificação do (+/-)-trans-2-fenil-1-cicloexanol com acetato de vinila, em meio orgânico .....	13
10. Modelo de sítio ativo para as lipases de <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Candida cylindracea</i> e colesterol esterase .....	14
11. Reação de hidrólise seletiva de um éster .....	14
12. Reação de transesterificação enantiosseletiva do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila, em meio orgânico .....	15
13. Estruturas da S-warfarina, S-propranolol e (-)-levorfanol .....	16
14. Técnicas utilizadas para a imobilização de enzimas .....	18
15. Curva de TG e DTG do poli(óxido de etileno) .....	20

16. Curva de DSC da poli(amida 6, 10) .....	21
17. Região ampliada do espectro de RMN <sup>1</sup> H, evidenciando os grupos de prótons utilizados na determinação da percentagem de conversão em éster, para a reação de esterificação padrão .....	33
18. Influência da quantidade de PEO na blenda PEO/Carbopol, em função do grau de conversão da reação de esterificação padrão, utilizando-se o suporte PEO/Carbopol/CCL a 25 e 35°C .....	35
19. Valores de percentagem de conversão em éster obtidos utilizando-se diversas enzimas imobilizadas em PEO a 25 e 35°C .....	37
20. Micrografias da CCL pura .....	39
21. Micrografias da PSL pura .....	40
22. Micrografias das fraturas do PEO puro e suportes PEO/CCL e PEO/PSL .....	41
23. Micrografias das superfícies do PEO puro e suportes PEO/CCL e PEO/PSL ..	42
24. Curvas de TG e DTG para a CCL, PSL, PEO e suportes PEO/CCL e PEO/PSL .....	44
25. Curva de DSC do PEO puro .....	45
26. Curvas de DSC para a CCL e suporte PEO/CCL .....	46
27. Curvas de DSC para a PSL e suporte PEO/PSL .....	47
28. Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do tempo de reação a 25 °C, utilizando-se os suportes PEO/CCL e PEO/PSL, variando-se a concentração de enzima no suporte .....	52

29. Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do tempo de reação a 25 e 35°C, utilizando-se os suportes PEO/CCL e PEO/PSL .....	53
30. Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do tempo de reação a 25°C, utilizando-se os suportes PEO/CCL e PEO/PSL e os solventes acetona, cicloexano, n-hexano e n-heptano .....	55
31. Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do tempo de reação a 25 e 35°C, utilizando-se os suportes PEO/CCL e PEO/PSL .....	55
32. Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do número de reutilizações a 25 e 35°C, utilizando-se os suportes PEO/CCL e PEO/PSL .....	57
33. Região ampliada do espectro de RMN $^1\text{H}$ para o 2-octanol e laurato de 2-octila, evidenciando os prótons utilizados para a determinação da percentagem de conversão em éster .....	59
34. Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação enantiosseletiva em função do tempo de reação a 25 e 35°C, utilizando-se os suportes PEO/CCL e PEO/PSL .....	59
35. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do laurato de n-pentila, em $\text{CDCl}_3$ .....	63
36. Espectro de IV do laurato de n-pentila (filme) .....	63
37. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do laurato de 2-octila, em $\text{CDCl}_3$ .....	64

38. Espectro de IV do laurato de 2-octila (filme) .....	64
39. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 2-octanol, em $\text{CDCl}_3$ .....	65
40. Espectro de IV do 2-octanol (filme) .....	65

**Lista de Tabelas**

1. Classificação de enzimas, segundo a IUB .....	4
2. Aplicações de lipases .....	9
3. Enzimas utilizadas .....	25
4. Parâmetros utilizados nas análises térmicas .....	31
5. Valores de percentagem de conversão em éster obtidos com a CCL imobilizada na blenda PEO/Carbopol .....	34
6. Valores de percentagem de conversão em éster obtidos para as diversas lipases imobilizadas em PEO .....	36
7. Resultados obtidos na análise termogravimétrica .....	43
8. Resultados obtidos na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, utilizando-se as enzimas em suspensão e imobilizadas em PEO .....	49
9. Resultados de percentagem de conversão obtidos na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, utilizando-se os suportes PEO/CCL e PEO/PSL a 25 e 35 °C .....	51
10. Resultados de percentagem de conversão para a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisadas por CCL e PSL imobilizadas em PEO em diferentes solventes orgânicos, a 25 e 35 °C .....	54
11. Medidas de rotação óptica do éster, álcoois reativo e não reativo para a reação de esterificação enantiosseletiva catalisada pela CCL e PSL, imobilizadas em PEO .....	60

<b>12. Valores de excesso enantiomérico dos álcoois reativo e não reativo e razão enantiomérica para a reação de esterificação enantiosseletiva, catalisada pela CCL e PSL immobilizadas em PEO .....</b>	<b>61</b>
---	-----------

## Resumo

Neste trabalho, lipases de várias fontes foram imobilizadas nos polímeros poli(óxido de etileno) (PEO), poli(ácido acrílico) (Carbopol) e blendas PEO/Carbopol. Posteriormente, as atividades enzimáticas foram avaliadas em reações de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, em meio orgânico. Parâmetros tais como tempo e temperatura de reação, concentração de enzima no suporte e meio reacional foram avaliados. A aplicação destes suportes para esterificações enantiosseletivas de álcoois secundários foi estudada para a reação do ácido láurico com (R,S)-2-octanol, catalisada pelas lipases de *Candida cylindracea* (CCL) e *Pseudomonas sp.* (PSL) imobilizadas em PEO. A imobilização foi realizada mediante dissolução do polímero em água e adição do biocatalisador, com posterior evaporação do solvente para formação e obtenção dos suportes. Estes foram caracterizados e a presença de enzima foi constatada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e análises térmicas de Termogravimetria (TG) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC). As lipases utilizadas foram as de *Candida cylindracea*, Pancreática do porco, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* e *Pseudomonas sp.* A análise dos resultados iniciais mostrou que o PEO foi o melhor suporte para a imobilização das lipases, principalmente porque este não causa a inativação dos biocatalisadores. Além disto, a solução polimérica do PEO possui pH 6,5, indicando que não foram necessárias correções no pH do meio para realizar a imobilização. Os sistemas mais estudados foram os das lipases de *Candida cylindracea* e *Pseudomonas sp.*, imobilizadas em PEO. As micrografias de MEV mostraram uma homogeneidade completa do suporte e que as enzimas estão localizadas preferencialmente na superfície do polímero. Os termogramas de TG mostraram a decomposição das lipases e do PEO em 250 e 400 °C, respectivamente. As análises de DSC indicaram as transições referentes às enzimas e ao PEO puro. Na esterificação do ácido láurico com n-pentanol, os suportes PEO/CCL e PEO/PSL apresentaram uma maior conversão em éster à medida que aumentaram o tempo, a temperatura de reação e a concentração de enzima no suporte. Para o suporte PEO/CCL, os melhores valores de percentagem de conversão em éster foram obtidos em n-hexano, e para o suporte PEO/PSL em n-heptano. Na reação de esterificação enantiosseletiva, as lipases CCL e PSL foram mais seletivas a 25 °C. O R-(-)-2-octanol foi obtido com ee de 86 e 98%, respectivamente. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o PEO pode ser utilizado para a imobilização de lipases, pois forma filmes homogêneos e as enzimas mantêm sua atividade catalítica.

## Abstract

In this work, lipases from different sources were immobilized in the polymers poly(oxyethylene) (PEO), poly(acrylic acid) (Carbopol) and PEO/Carbopol blends and their efficiency was evaluated in esterification reactions of lauric acid with n-pentanol, in organic media. Parameters such as time and temperature reaction, enzyme concentration in support and reactional media, were also evaluated. The application of these supports in enantioselective esterification of secondary alcohols was studied for the reaction of lauric acid with (R,S)-2-octanol catalyzed by lipases of *Candida cylindracea* (CCL) and *Pseudomonas sp.* (PSL) immobilized in PEO. The immobilization was performed by dissolving the polymer in water, with further solvent evaporation for obtaining these supports. They were characterized and the enzyme presence confirmed by Scanning Electronic Microscopy (SEM), thermal analysis of Thermogravimetry (TG) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The lipases used were *Candida cylindracea*, porcine pancreas, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* and *Pseudomonas sp.* From the analysis of initial results, PEO was used as support for lipases immobilization, mainly due to the fact that no biocatalyst inactivation was observed. Moreover, PEO solution has a pH of 6.5, indicating that a pH correction for the immobilization process is not necessary. The most studied systems were of *Candida cylindracea* and *Pseudomonas sp.* lipases immobilized in PEO. SEM micrographs showed a total support homogeneity and that the enzymes are preferentially located on the polymer surface. TG thermograms showed lipases and PEO decompositions in 250 and 400°C, respectively. DSC analysis indicated the transitions related to enzymes and pure PEO. In the esterification of lauric acid with n-pentanol, PEO/CCL and PEO/PSL supports showed higher ester conversion values as time, reaction temperature and enzyme concentration in support increased. For CCL/PEO support the higher ester conversion values were obtained in n-hexane, and for PEO/PSL in n-heptane. In the enantioselective esterification reaction, CCL and PSL lipases were more selective at 25°C. The R-(-)-2-octanol was obtained with enantiomeric excess of 85 and 98% using CCL and PSL, respectively. From the obtained results, it is concluded that PEO can be used as support for lipases immobilization, as it forms homogeneous films and the enzymes maintain their catalytic activity.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Definição de Polímeros

Polímeros são macromoléculas que apresentam massa molar da ordem de  $10^3$  a  $10^6$  g mol<sup>-1</sup> e em cuja estrutura encontram-se unidades de repetição, denominadas “meros”. Essas macromoléculas apresentam características próprias que podem ser diferentes das propriedades que decorrem da natureza química dos átomos ou dos grupos de átomos que as constituem. Essas propriedades decorrem de interações intra ou inter moleculares do tipo ligações de hidrogênio, dipolo - dipolo ou de Van der Waals.<sup>1</sup>

Ao contrário de moléculas simples, os polímeros podem apresentar uma grande variação de massa molar que está diretamente relacionada com o número de repetições da unidade monomérica. Esse grau de repetição da unidade monomérica é denominado de grau de polimerização. Geralmente, os polímeros apresentam uma larga faixa de massa molar, devido à dificuldade de se controlar o grau de polimerização durante a síntese.<sup>1,2</sup>

São conhecidos muitos polímeros, com propriedades e aplicações específicas. Nas últimas décadas têm-se aumentado o interesse pela mistura física desses polímeros. Misturas de dois ou mais polímeros são denominadas blendas poliméricas. As mesmas podem apresentar propriedades intermediárias ou superiores às dos componentes puros que as constituem. Essas modificações podem fazer com que este material adquira propriedades específicas, com um custo menor do que a síntese de um novo polímero.<sup>2</sup>

Polímeros ou plásticos estão intimamente relacionados com nossa vida cotidiana, em eletrodomésticos, automóveis, embalagens, cosméticos, etc. Polímeros podem ser naturais, como o amido e proteínas; ou sintéticos, como poli(óxido de etileno), náilon e poli(ácido acrílico). O Carbopol, um poli(ácido acrílico) com ligações cruzadas, é muito utilizado na indústria de cosméticos, em géis, shampoos e cremes.<sup>1</sup>

Além das aplicações usuais, os polímeros vêm sendo utilizados como suporte para a imobilização de enzimas. Entre estes, encontram-se o poli(metil-metacrilato)<sup>3</sup>, o poli(estireno),<sup>4</sup> o poli(cloreto de vinila),<sup>5, 6</sup> o poli(propileno),<sup>7, 8</sup> o poli(etileno),<sup>6</sup> o poli(uretano)<sup>9</sup> e a poli(acrilamida).<sup>10</sup>

Em comparação com outros suportes, tais como sílica, alumina e celite, polímeros hidrofóbicos como poli(etileno) e poli(propileno), levam a um aumento da atividade de enzimas da classe das lipases.<sup>11</sup> Nestes suportes, as enzimas são facilmente adsorvidas. O aumento da atividade de lipases imobilizadas também foi verificado em resinas de poli(éster acrílico), tais como a XAD-7. Resinas de troca iônica vêm sendo utilizadas para a imobilização e reações em solventes orgânicos.<sup>12</sup>

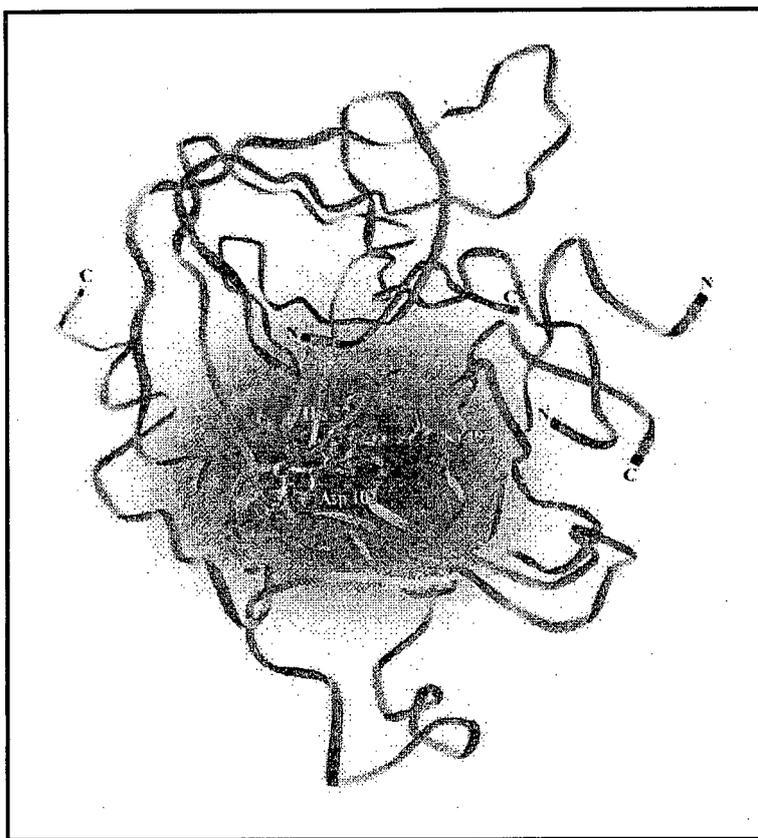
Poli(uretano) foi utilizado na imobilização de enzimas para a síntese de aspartame, em acetato de etila.<sup>13</sup>

Neste trabalho, os polímeros poli(óxido de etileno) (PEO), poli(ácido acrílico) (Carbopol) e blendas poliméricas PEO/Carbopol foram utilizados para a imobilização de lipases, a fim de se avaliar a aplicação destes suportes nas reações de esterificação, em meio orgânico.

## 1.2. Definição de Enzimas

Enzimas são biomoléculas formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, possuindo em suas estruturas grupos polares, tais como COOH, OH, NH<sub>2</sub>, SH e CONH<sub>2</sub>, que podem atuar como catalisadores.<sup>14</sup> Os resíduos de aminoácidos ligam-se covalentemente, formando longos polímeros não-ramificados. Estes estão unidos em um arranjo “cabeça-cauda”, mediante ligações amídicas, denominadas ligações peptídicas. As mesmas surgem pela eliminação de água do grupo carboxílico de um aminoácido e de um  $\alpha$ -aminogruppo do aminoácido subsequente.<sup>15</sup> As enzimas possuem estruturas complexas, sendo que poucas têm sua estrutura tridimensional resolvida. Um exemplo é a  $\alpha$ -quimiotripsina (Figura 1).<sup>16</sup>

Estas biomoléculas apresentam especificidade e poder catalítico superiores aos catalisadores produzidos sinteticamente.<sup>17</sup> Sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação protéica nativa (estrutura tridimensional). A desnaturação ou dissociação de uma enzima em subunidades pode eliminar a atividade catalítica.<sup>15</sup>



**Figura 1.** Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -quimiotripsina.

Ao contrário dos catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais e óxidos metálicos, as enzimas são muito específicas. Em outras palavras, cada enzima pode hidrolisar ou sintetizar um composto particular. Em alguns casos, sua ação pode ser limitada a ligações específicas dentro dos compostos com os quais reagem. Além disso, as enzimas são catalisadores extremamente versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para as diferentes reações orgânicas clássicas.<sup>18</sup>

As reações catalisadas por enzimas ocorrem em condições suaves, normalmente em temperaturas na faixa de 20-40°C (preferencialmente próximo a 30°C) e em faixa de pH de 5-8 (pH próximo do neutro). São altamente eficientes, aumentando a velocidade das reações na ordem de  $10^{12}$  vezes e geralmente muito seletivas em termos dos tipos de reações catalisadas, com relação à estrutura e estereoquímica do substrato e do produto. Esta propriedade constitui a especificidade de uma enzima, sendo uma característica importante para a sua utilização em síntese orgânica.<sup>19</sup>

Existem mais de 2000 enzimas catalogadas. Os grupos são classificados de acordo com o tipo de reação catalisada. A **Tabela 1** apresenta a classificação das enzimas, segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB).<sup>20</sup>

**Tabela 1.** Classificação das enzimas, segundo a IUB.

Grupo	Tipo de Reação
<b>Oxidorrredutases</b>	Catalisam reações de oxi-redução, envolvendo oxigenação ( $\text{CH} \rightarrow \text{C} - \text{OH}$ )
<b>Transferases</b>	Catalisam a transferência de grupos, tais como acila, açúcares, fosforila e aldeído ou cetona, de uma molécula para outra.
<b>Hidrolases</b>	Promovem a reação de hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, peptídeos e outros grupos contendo função C - N, bem como a hidratação de ligações C = C e epóxidos.
<b>Liases</b>	Catalisam reações de adições, geralmente de HX, à duplas ligações, tais como C = C, C = N, C = O e reações reversas.
<b>Isomerases</b>	Catalisam a migração de duplas ligações ou funções oxigenadas, racemização e rearranjos.
<b>Lipases</b>	Catalisam a formação de ligações C - O, C - S, C - C e de éster fosfatos.

Fonte: União Internacional de Bioquímica, 1995.

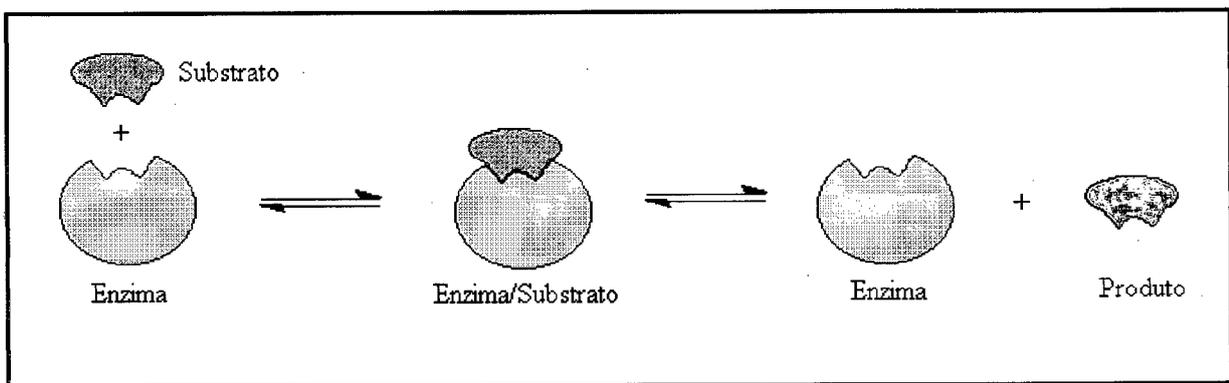
Cada enzima é identificada por um código, consistindo de quatro números separados por pontos. O primeiro dígito do código mostra a qual classe pertence a enzima. O segundo e o terceiro dígito descrevem o tipo de reação catalisada. O quarto dígito define o substrato. A *Enzyme Commission* (EC) designou a cada enzima um nome sistemático, além do

nome trivial já existente. Este nome sistemático é obtido a partir do substrato ou substratos com o sufixo “ase”, indicando a natureza do processo catalítico, com exceção das enzimas proteolíticas que normalmente apresentam o sufixo “ina”.<sup>21, 22</sup>

Como exemplo, tem-se a creatina-quinase (nome trivial) que possui o nome sistemático ATP: creatina-fosforotransferase, baseado na reação que catalisa. Seu número de classificação é EC 2.7.3.2. O primeiro dígito (2) indica o nome da classe (transferases), o segundo dígito (7) indica a reação de transferência do grupo fosforila, o terceiro dígito (3) indica que as fosforotransferases apresentam um grupo nitrogênio comoceptor, e o quarto dígito (2) indica a creatina-quinase.<sup>23</sup>

### 1.2.1. Catálise Enzimática

As enzimas se combinam com o substrato, formando um complexo enzima/substrato e posteriormente se separam, formando o produto e a enzima livre. A **Figura 2** expressa este processo.<sup>16</sup>



**Figura 2.** Mecanismo de atuação das enzimas.

Apenas uma região restrita da enzima está envolvida no processo de catálise. A mesma é denominada de sítio ativo ou sítio catalítico. A **Figura 1** evidencia os resíduos de aminoácidos que constituem o sítio ativo da  $\alpha$ -quimiotripsina, que é formado pela histidina 57, serina 193 e ácido aspártico 102.<sup>16</sup>

Emil Fischer, em 1894, propôs que a interação entre a enzima e o substrato era análoga a um conjunto “chave-fechadura”. Um modelo mais refinado para explicar as propriedades das enzimas é o modelo do “encaixe induzido”, proposto por Koshland Jr., no final da década de sessenta. No modelo de Emil Fischer, presume-se que o centro ativo é pré-formado para encaixar o substrato. No modelo do encaixe induzido, o substrato induz a uma mudança conformacional na enzima. Assim, os resíduos de aminoácidos são posicionados em uma orientação espacial favorável, ocorrendo a formação do complexo enzima/substrato. A seqüência exata das etapas envolvidas nas mudanças da conformação induzida pelo substrato, ainda não foram totalmente estudadas, e existem várias possibilidades.<sup>14</sup>

As enzimas aumentam a velocidade de reação, diminuindo a energia de ativação ( $E_a$ ) entre reagentes e produtos. A capacidade catalítica é devido à aproximação favorável entre substrato e enzima para formar o complexo enzima/substrato.<sup>5</sup> A **Figura 3** apresenta o diagrama de energia livre, em função da coordenada de reação para uma reação não catalisada (1) e uma catalisada por enzima (2).<sup>16</sup>

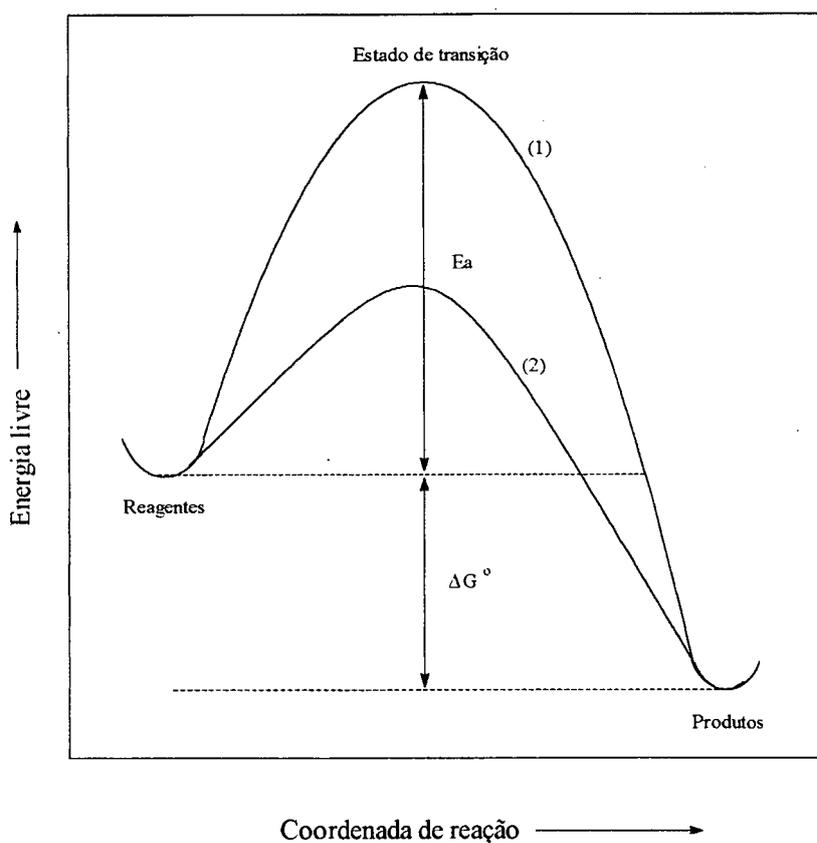
De maneira geral, em síntese orgânica, a utilização de enzimas está associada a três características principais:<sup>5, 24</sup>

- **Quimiosseletividade:** como as enzimas atuam em grupos funcionais específicos, funções químicas sensíveis a reações através de métodos sintéticos clássicos, podem ser preservadas. Por exemplo, na hidrólise de um éster não ocorre a quebra de uma ligação acetal.

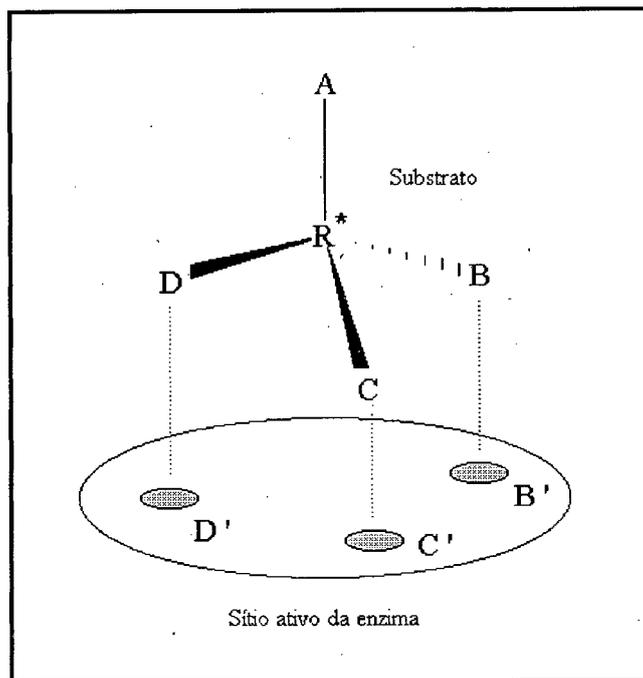
- **Regiosseletividade:** as enzimas podem distinguir grupos funcionais que estão situados em regiões diferentes do substrato.

- **Enantioseletividade:** as enzimas são formadas de L-aminoácidos. Devido a isto, a quiralidade do substrato pode ser reconhecida. Assim, um substrato pró-quiral pode reagir e formar um produto quiral, e o par de enantiômeros em uma mistura se reagir com velocidades diferentes, leva á resolução cinética.

Para explicar a enantiosseletividade das enzimas, A.G. Ogston introduziu uma nova teoria, denominada “regra de três pontos”. A mesma indica que a enantiosseleção do substrato é realizada em um espaço tridimensional. Como consequência disto, existe somente três pontos de encaixe do substrato ao sítio ativo (B', C', D') (Figura 4).<sup>5</sup>



**Figura 3.** Diagrama de energia livre em função da coordenada de reação para uma reação não catalisada (1) e uma reação catalisada por enzima (2).  $E_a$  é a energia de ativação e  $\Delta G^\circ$  a variação da energia livre padrão entre reagentes e produtos.



**Figura 4.** Representação da ligação de um substrato por três pontos ao sítio ativo enzimático, segundo A.G. Ogston.

A catálise enzimática depende do meio no qual se encontra a enzima. Geralmente, a catálise é mais favorável em meio aquoso. Entretanto, estudos realizados anteriormente, mostram que estes biocatalisadores podem catalisar reações, em uma ampla variedade de solventes orgânicos.<sup>25-28</sup>

### 1.2.2. Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam reações de esterificação, tioesterificação, hidrólise de triglicerídeos, entre outras. Elas têm sido isoladas de uma ampla variedade de tecidos de animais e plantas, sendo também produzidas por processos de fermentação (fungos e bactérias).<sup>29</sup>

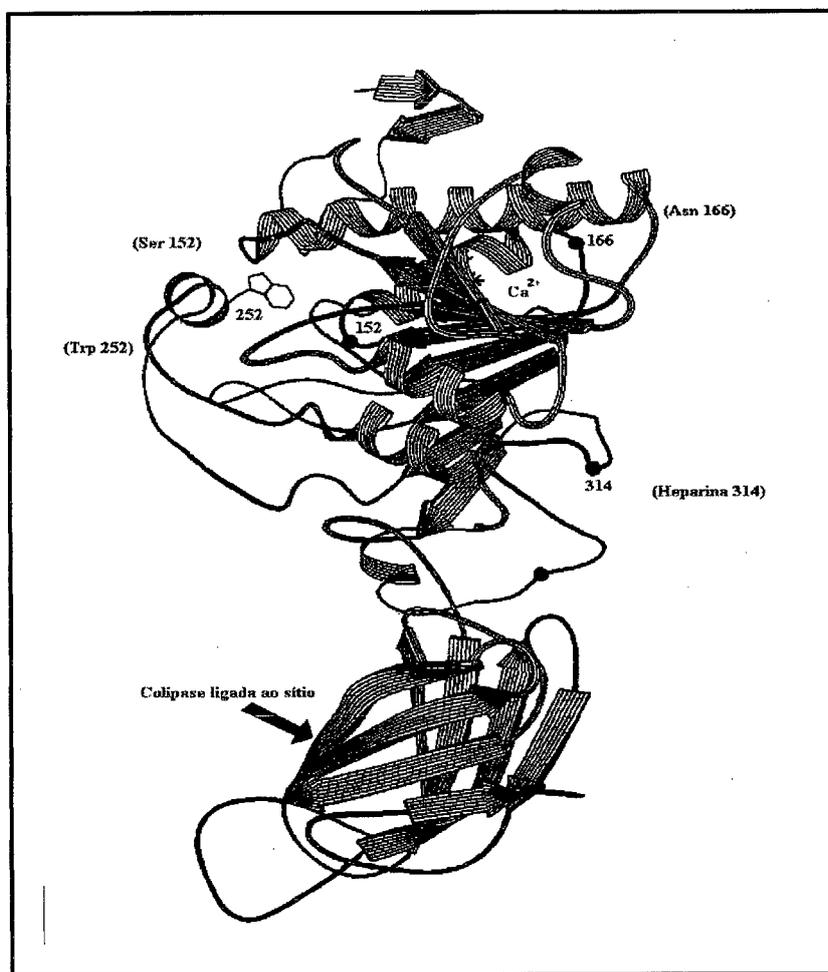
A **Tabela 2** apresenta algumas aplicações das lipases em vários setores industriais.<sup>30, 31</sup> Atualmente, elas vêm sendo muito utilizadas em síntese orgânica, devido à enantio e estereosseletividade, versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo, a não necessidade de cofatores, por catalisarem reações específicas para posições 1, 3 de triglicerídeos, e por atuarem em uma ampla faixa de pH e em temperaturas que variam de 20-70 °C.<sup>29</sup>

**Tabela 2.** Aplicações de lipases.

Setor Industrial	Aplicação
Detergentes	Remoção de proteínas, gorduras, amido
Têxtil	Alvejamento, remoção de gomas
Rações animais	Complemento enzimático
Fermentação	Fermentação do malte, fermentos
Vinhos e sucos	Clareamento e filtração, conservação do aroma
Açúcares	Degradação de polissacarídeos
Óleos e gorduras	Síntese de ésteres, hidrólise de triglicerídeos
Papel	Clareamento
Cosméticos	Limpeza de lentes de contato, limpeza dentária
Laticínios	Maturação de queijos, modificação de proteínas do leite
Químico	Sínteses de compostos quirais, hidrólises de ésteres e amidas
Medicamentos	Formulações digestivas

Fonte: Adaptado de [www.novo.dlk](http://www.novo.dlk) e Gandhi, N. N., 1997.

A **Figura 5** mostra a estrutura tridimensional de uma lipase.<sup>29</sup>



**Figura 5.** Estrutura tridimensional de uma lipase do pâncreas humano.

Dentre as lipases mais comumente utilizadas em síntese orgânica, destacam-se as do gênero *Candida*<sup>3, 7, 32-37</sup> e *Pseudomonas*.<sup>8, 27, 37-41</sup> Lipases obtidas destas e de outras fontes, foram imobilizadas em PEO, Carbopol e blenda PEO/Carbopol e as atividades catalíticas foram avaliadas em reações de esterificação, em solventes orgânicos.

### 1.2.2.1. Lipases do Gênero *Candida*

As lipases de *Candida lipolytica*, *Candida antarctica* (LCA) e *Candida cylindracea* (CCL), atualmente denominada *Candida rugosa*, são muito utilizadas em síntese orgânica. A Figura 6 exemplifica a reação de resolução do naproxen, um antiinflamatório, utilizando-se a CCL. A resolução torna-se necessária, pois o enantiômero S é cerca de 28 vezes mais ativo do que o enantiômero R.<sup>35</sup>

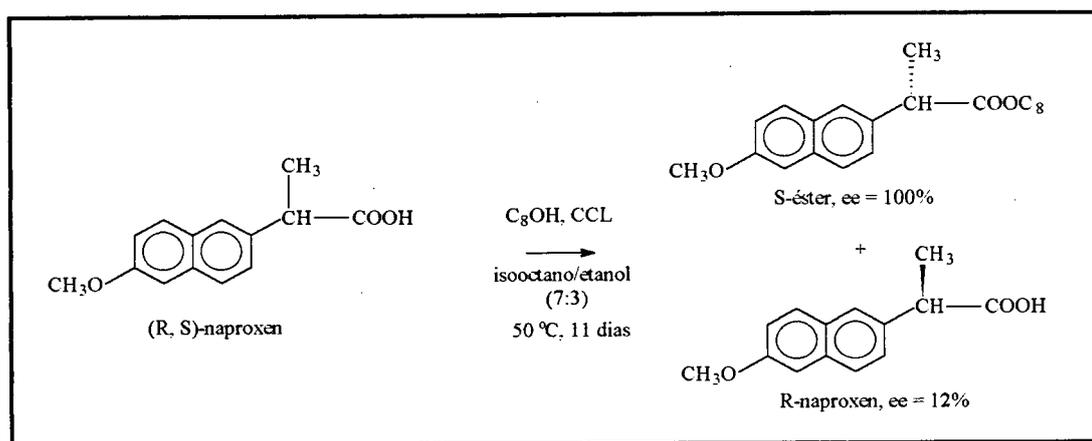


Figura 6. Reação de esterificação enantiosseletiva do naproxen, em meio orgânico.

Akoh e col. utilizaram a LCA na reação de esterificação do geraniol com ácido acético em hexano, sendo que o acetato correspondente foi obtido com alto rendimento (Figura 7).<sup>37</sup>

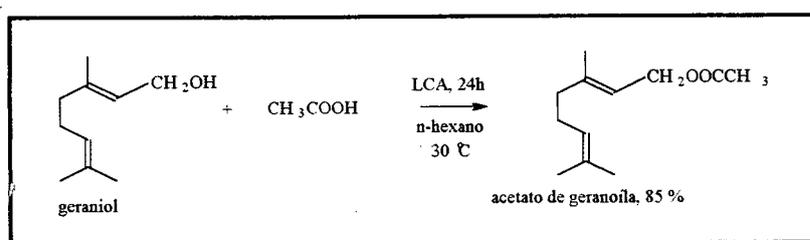
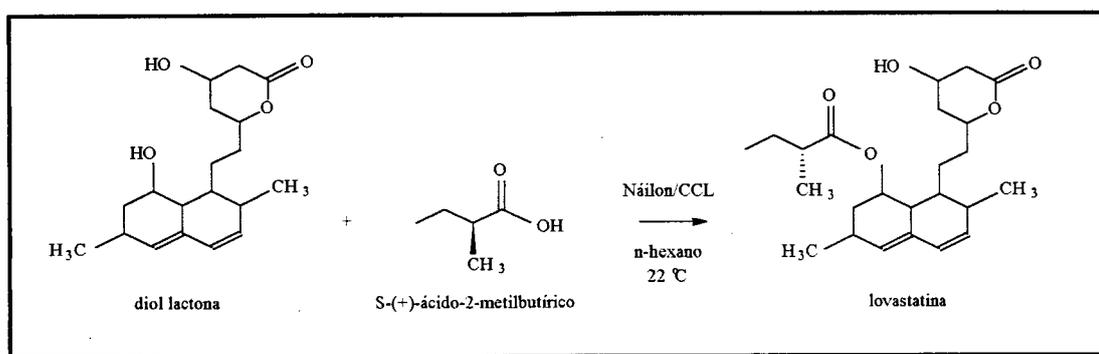


Figura 7. Reação de esterificação do geraniol com ácido acético, em hexano.

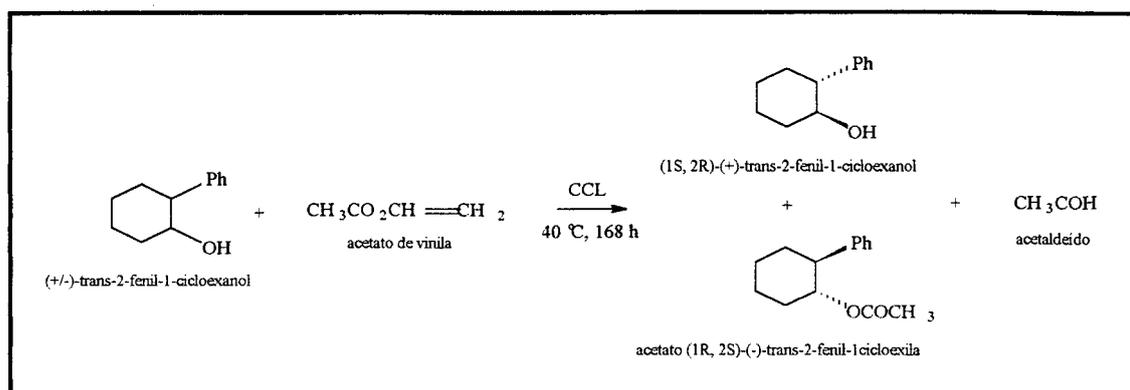
Yang e col. utilizaram a CCL, imobilizada em náilon, na reação de esterificação regioseletiva da diol lactona com S-(+)-ácido-2-metilbutírico. O produto obtido foi a lovastatina, um fármaco de grande importância na indústria farmacêutica, por diminuir os níveis de colesterol (**Figura 8**).<sup>42</sup>



**Figura 8.** Reação de esterificação da diol lactona com S-(+)-ácido-2-metilbutírico, em hexano.

Sabe-se que o meio reacional utilizado influencia na enantiosseletividade da CCL. Por exemplo, na reação de esterificação do racemato do ácido 2-(4-clorofenóxi) propiônico com n-butanol, a formação do enantiômero R ocorre preferencialmente em n-hexano, isooctano e tolueno, enquanto que em diclorometano, acetona, n-butanol e THF, forma-se preferencialmente o enantiômero S.<sup>24</sup>

Celia e col. estudaram o efeito do meio reacional na reação de transesterificação do (+/-)-trans-2-fenil-1-cicloexanol com acetato de vinila, catalisada pela CCL. Em todos os solventes (decano, hexano, dioxano, benzeno, acetona, etc), a enzima mostrou preferência pelo isômero (1R, 2S)-(-)-trans-2-fenil-1-cicloexanol, sendo o excesso enantiomérico do produto ( $ee_p$ ) de 100% (**Figura 9**).<sup>33</sup>



**Figura 9.** Reação de transesterificação do (+/-)-trans-2-fenil-1-cicloexanol com acetato de vinila, em meio orgânico.

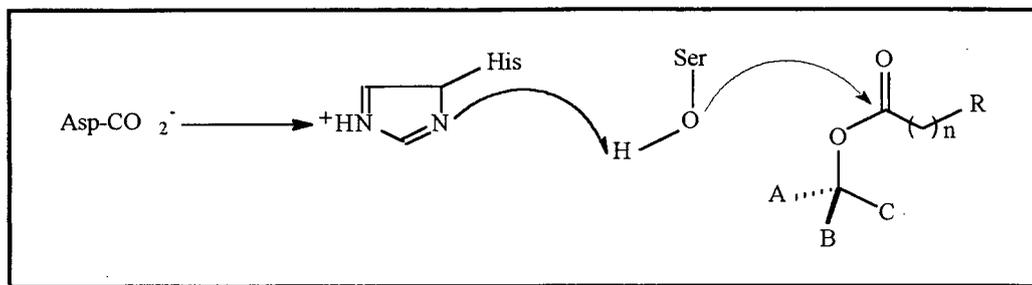
#### 1.2.2.2. Lipases do Gênero *Pseudomonas*

As lipases isoladas de diferentes espécies de *Pseudomonas*, possuem alta seletividade na reação de hidrólise de ésteres a álcoois secundários e sua correspondente reação reversa. As lipases *Pseudomonas sp.* (PSL), disponíveis comercialmente, possuem uma preferência estereoquímica para a configuração R, em centros reacionais de álcoois secundários.<sup>29</sup> A preferência estereoquímica leva ao desenvolvimento de um modelo de sítio ativo, semelhante ao das enzimas colesterol esterase e *Candida cylindracea* (**Figura 10**).<sup>24</sup>

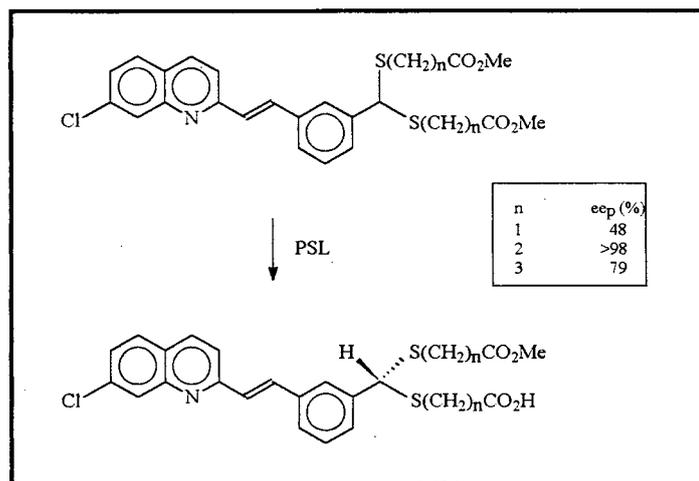
A eficiência e estabilidade foi melhorada quando a enzima foi imobilizada em poli(éster acrílico) (resinas XAD-7 e XAD-8),<sup>43, 44</sup> celite<sup>45</sup> e gelatina.<sup>46</sup> O baixo custo, alta seletividade e estabilidade da PSL, são atrativos interessantes para sua utilização em síntese orgânica.<sup>24</sup>

A **Figura 11** apresenta como exemplo a reação de hidrólise enantiosseletiva de um éster com um centro pró-quiral, catalisada pela PSL.<sup>24</sup>

Nascimento e col. utilizaram a PSL para a resolução enzimática de álcoois secundários, em n-hexano. Os álcoois (-)-2-hexanol e (-)-2-octanol, foram obtidos com ee<sub>p</sub> de 97 e 95 %, respectivamente.<sup>39</sup>

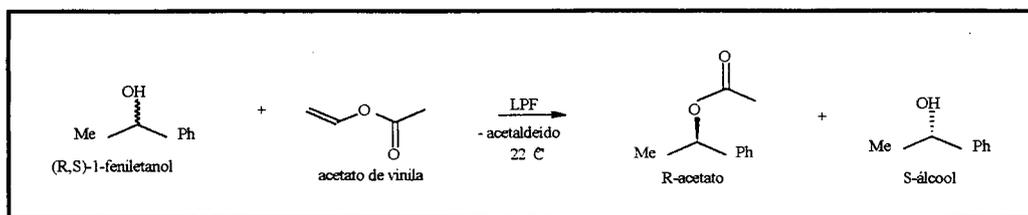


**Figura 10.** Modelo de sítio ativo para as lipases de *Pseudomonas sp.*, *Candida cylindracea* e colesterol esterase. Onde A = cadeia pequena, B = cadeia média e C = cadeia longa para substratos ésteres.



**Figura 11.** Reação de hidrólise seletiva de um éster.

Ivanov e col. estudaram a reação de transesterificação do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila, catalisada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF). O R-acetato e o S-álcool foram obtidos com alta pureza ótica ( $ee > 99\%$ ) (Figura 12).<sup>40</sup>



**Figura 12.** Reação de transesterificação enantiosseletiva do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila, em meio orgânico.

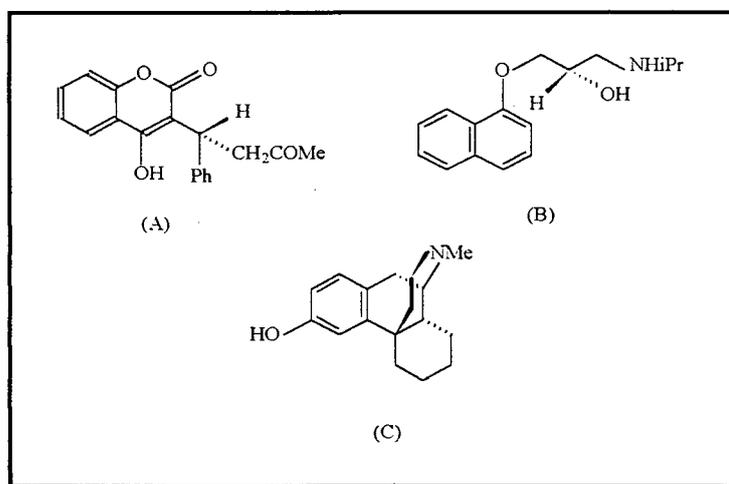
Catoni e col. utilizaram a PSL imobilizada em ACR-sílica gel. A reação de esterificação do 1-feniletanol com anidrido acético, foi realizada em diferentes solventes orgânicos. Observou-se que a percentagem de conversão e o  $ee_p$  são altamente dependentes do solvente utilizado na reação. Em  $\text{CHCl}_3$ , a conversão foi de 36% e o  $ee_p = 93\%$ . Entretanto, em DMF, a conversão diminuiu para 2% e o  $ee_p$  para 50%.<sup>27</sup>

### 1.2.3. Resolução Enzimática

A utilização de lipases em aplicações sintéticas tem envolvido a conversão assimétrica, que é um dos temas centrais em síntese orgânica. A indústria farmacêutica tem demonstrado grande interesse, devido à atividade biológica de muitas drogas racêmicas residirem em somente um enantiômero.<sup>47</sup> Mais de 50% das drogas comercializadas são quirais. Entretanto, somente 10% destas são vendidas em sua forma enantiomericamente pura.

Exemplos de pares de enantiômeros, que possuem diferenças em sua atividade farmacológica, são citados abaixo.<sup>48</sup>

- A S-warfarina é 6 vezes mais ativa como anticoagulante do que o seu enantiômero R (**Figura 13(A)**),
- O S-propranolol é utilizado no tratamento de hipertensão e angina. Entretanto, o seu enantiômero R age como contraceptivo (**Figura 13(B)**),
- O alcalóide (-)-levorfanol é um potente analgésico. O enantiômero (+) apresenta propriedade antitussígena, mas não é empregado na medicina (**Figura 13(C)**).



**Figura 13.** Estruturas; (A) S-warfarina, (B) S-propranolol e (C) (-)-levorfanol.

Álcoois são excelentes compostos para serem utilizados em síntese orgânica, devido a sua versatilidade química e facilidade de conversão para outra classe de compostos.

A resolução de álcoois racêmicos vem sendo estudada, utilizando-se enzimas hidrolíticas. Os álcoois opticamente ativos podem ser obtidos em soluções aquosas por hidrólise dos correspondentes ésteres racêmicos,<sup>39</sup> por esterificações em solvente orgânico<sup>49, 50</sup> e por transesterificações dos correspondentes álcoois racêmicos.<sup>40</sup>

A escolha do método depende de muitos fatores, tais como seleção do biocatalisador, rendimento, pureza, velocidade da reação, separação dos produtos e estabilidade das enzimas.

A utilização de enzimas em síntese orgânica vêm sendo de grande importância. A grande dificuldade está em estabilizar estes catalisadores em meio orgânico para reutilização, uma vez que algumas enzimas, dependendo do tipo, fonte, pureza e reação a ser catalisada, possuem custo elevado. A metodologia que vem sendo utilizada para estabilizar estes catalisadores é a imobilização em suportes orgânicos e inorgânicos.

#### 1.2.4. Imobilização de Enzimas

As enzimas podem sofrer inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos. Para a sua utilização em meio orgânico é necessário que a mesma seja estável, mantenha sua atividade catalítica e estereosseletividade.<sup>51</sup> Devido a isto, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas para a utilização de enzimas neste meio, com sua posterior recuperação e reutilização.<sup>5</sup>

A imobilização em diferentes suportes é uma das técnicas mais importantes e que vem sendo utilizada na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas, em solventes orgânicos.<sup>33, 37, 52</sup> Por razões práticas e econômicas, é freqüentemente vantajoso utilizar enzimas imobilizadas sobre suportes sólidos, por serem fáceis de manusear, serem recuperados em qualquer tempo da reação e serem reutilizados repetidamente, sem considerável perda da atividade catalítica.<sup>38, 40, 53</sup>

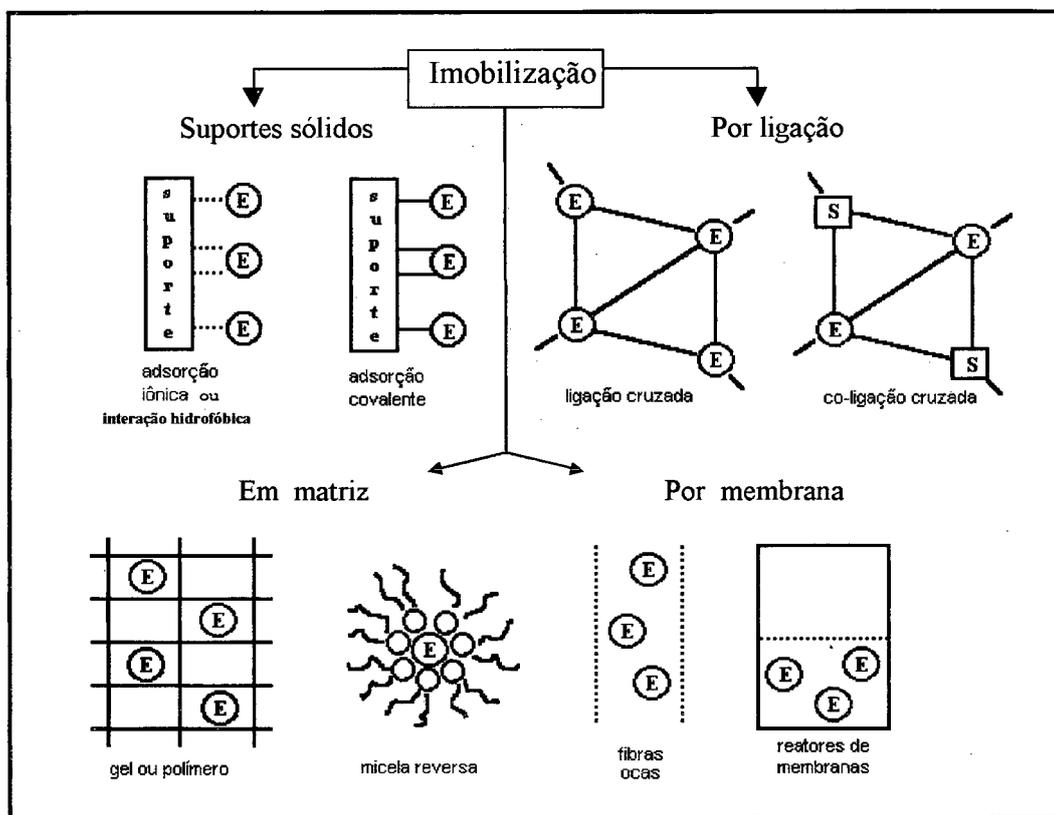
A atividade catalítica está relacionada a manutenção da estrutura terciária, a nível do sítio ativo enzimático. Os processos de imobilização devem, portanto, fazer uso de métodos brandos e bem controlados, respeitando a sua estrutura nativa.<sup>24</sup>

Sistemas como celite,<sup>3, 40</sup> polímeros,<sup>28, 42, 54, 55</sup> sílica,<sup>27, 56</sup> organo gel,<sup>57, 58</sup> gel de ágar,<sup>52</sup> amberlite<sup>3</sup> e crisotila,<sup>59, 60, 61</sup> vêm sendo utilizados como suportes para enzimas, microorganismos e células inteiras.

Celia e col. observaram um aumento na atividade da lipase de *Candida cylindracea* (CCL), após sua imobilização em gotas de poli(ácido acrílico). A atividade foi determinada com a tributirina, a pH 7,4 e 37 °C. As atividades foram de 3,0 e 4,5  $\mu\text{eq min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para a CCL livre e imobilizada, respectivamente.<sup>33</sup>

Moreno e col. obtiveram um aumento na atividade da CCL quando imobilizada em sílica, alumina e agarose.<sup>34</sup>

A **Figura 14** mostra alguns procedimentos recentes que vêm sendo utilizados para a imobilização de enzimas.



**Figura 14.** Técnicas utilizadas para a imobilização de enzimas, sendo E = enzima e S= suporte.

### 1.3. Rotação Óptica

Desde 1960, o método mais utilizado na determinação da pureza enantiomérica de uma substância química é a rotação óptica, medida no comprimento de onda do sódio, mercúrio ou outra fonte. A polarimetria é um dos métodos clássicos espectrais para a determinação do excesso enantiomérico ou pureza óptica de uma amostra. Utilizando-se um polarímetro, determina-se o ângulo de rotação da luz polarizada provocada por uma amostra. Parâmetros como temperatura, solvente, concentração, comprimento da luz incidente e comprimento da cela influenciam na medida. Determinada a rotação óptica observada, a mesma é convertida para rotação óptica específica, através da **Equação 1**.<sup>48</sup>

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad (1)$$

onde,

$[\alpha]_D^T$  = rotação óptica específica;

T = temperatura na qual foi realizada a medida;

$\alpha$  = rotação óptica observada;

l = comprimento da cela polarimétrica (dm);

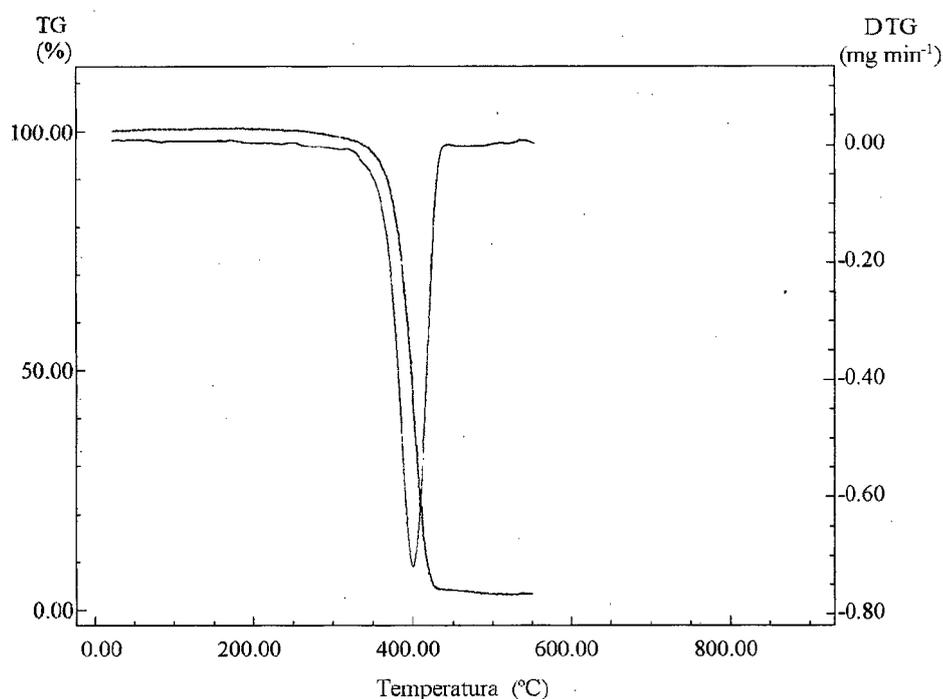
c = concentração da solução ( $\text{g mL}^{-1}$ ).

Através da rotação óptica da amostra, pode-se determinar a pureza óptica relacionando-se o valor calculado (determinado experimentalmente) com o valor do enantiômero puro encontrado na literatura. A pureza óptica descreve a razão da mistura de enantiômeros, em relação ao enantiômero puro. Esta razão é igual o excesso enantiomérico (ee) que descreve a composição da mistura.<sup>62</sup>

#### 1.4. Análises Térmicas e Morfológicas

A análise termogravimétrica (TG) é utilizada para analisar a decomposição e a perda de massa de diversos materiais, com o aumento da temperatura. Para enzimas, esta técnica é utilizada para determinar a quantidade de água presente na estrutura e a estabilidade frente à temperatura.<sup>63</sup>

Para polímeros, determina-se a perda de massa com o aumento de temperatura. A **Figura 15** apresenta uma curva de TG e DTG (derivada da análise termogravimétrica), mostrando a perda de massa do poli(óxido de etileno) com o aumento da temperatura.

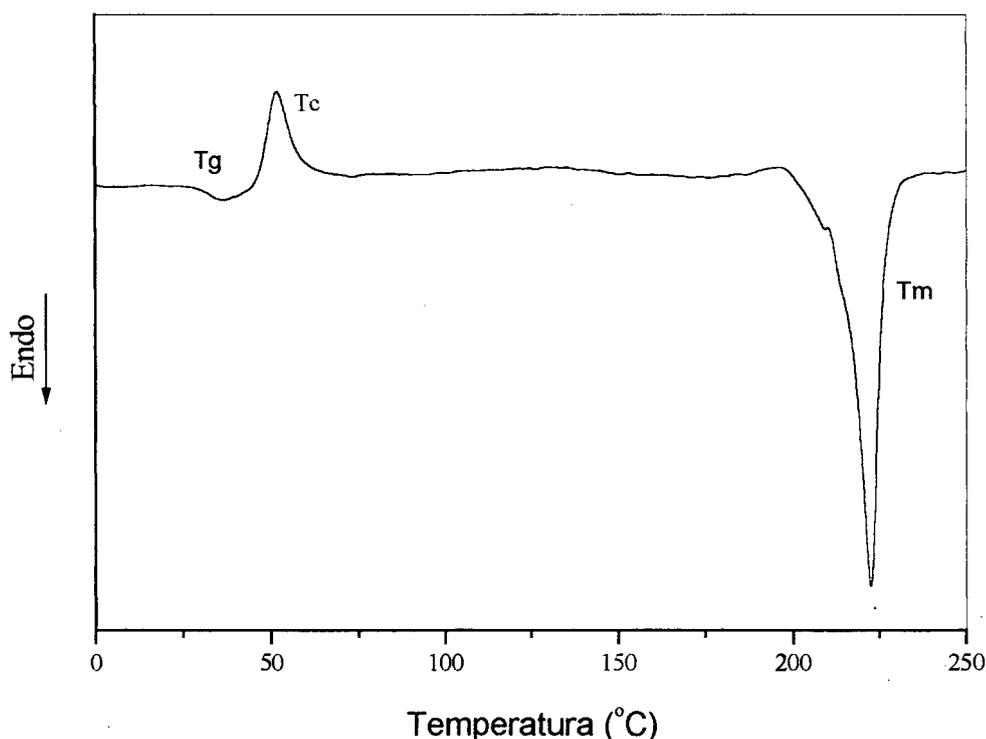


**Figura 15.** Curva de TG e DTG do poli(óxido de etileno).

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) possibilita a análise de transições térmicas de primeira e segunda ordem, em polímeros. Estas transições dependem em geral das diferentes formas em que um polímero pode cristalizar.

Polímeros cristalinos, cujas moléculas estão orientadas na sua estrutura, apresentam transição de primeira ordem e endotérmica denominada  $T_m$  (temperatura de fusão cristalina). A temperatura na qual ocorre a orientação das cadeias poliméricas, é denominada  $T_c$  (temperatura de cristalização). Polímeros que não apresentam orientação das cadeias são denominados amorfos. Esses polímeros apresentam uma transição de segunda ordem denominada  $T_g$  (temperatura de transição vítrea), a partir da qual as regiões amorfas adquirem progressivamente a sua mobilidade. Polímeros semi-cristalinos são aqueles que estão intermediários aos cristalinos e amorfos, ou seja, parte das cadeias encontram-se ordenadas e partes desordenadas. Como são polímeros intermediários, apresentam  $T_g$  que seria uma temperatura característica de polímeros amorfos e também  $T_m$  e  $T_c$ , temperaturas que caracterizam um polímero cristalino.<sup>2</sup>

A **Figura 16** apresenta um comportamento típico de uma curva de DSC para um polímero semi-cristalino, onde são observadas as transições endotérmicas ( $T_m$  e  $T_g$ ) e a exotérmica ( $T_c$ ).



**Figura 16.** Curva de DSC da poli(amida 6, 10).

Como são biopolímeros, as enzimas podem apresentar transições térmicas com um aumento de temperatura.<sup>63</sup> As técnicas de TG e DSC são utilizadas para verificar a presença da enzima no suporte polimérico.<sup>64</sup>

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostram a morfologia da superfície e fratura (interior), bem como presença de poros no material polimérico. Para suportes constituídos de polímeros e enzimas, esta técnica foi utilizada para verificar a homogeneidade do sistema e se os biocatalisadores estão localizados na superfície ou na fratura do suporte polimérico.<sup>41, 55</sup>

Griffithis e col. realizaram análises de MEV para o poli(estireno) (PS) e suporte constituído de PS e células de *Citrobacter freundii*. Foram observadas mudanças na morfologia da fratura do material polimérico, indicando a presença da célula no suporte.<sup>4</sup>

Células de *Saccharomyces cerevisiae*, foram imobilizadas em crisotila. As micrografias de MEV mostraram que as células estão envolvidas pelas fibras da crisotila.<sup>65</sup>

Análises de MEV foram realizadas para verificar a presença de urease em microcápsulas de quitosana e poli(álcool vinílico) (PVA). Foram observadas mudanças na morfologia interna da microcápsula após encapsulação da urease.<sup>66</sup>

## 1.5. Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho são:

- Imobilização de lipases nos polímeros puros PEO e Carbopol e blendas poliméricas PEO/Carbopol;
- Avaliação da estabilidade, determinação da morfologia e da presença de enzima no suporte (enzima/polímero), por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises térmicas (DSC e TG);
- Determinação da atividade enzimática, através da reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol;
- Verificação da possível reutilização do suporte e determinação da atividade enzimática após sua estocagem, em solvente orgânico;
- Resolução do (R,S)-2-octanol, através da reação de esterificação enantiosseletiva com ácido láurico, catalisada por lipases;
- Determinação da percentagem de conversão, através de RMN  $^1\text{H}$ ;
- Caracterização dos produtos através de RMN  $^1\text{H}$ , IV e  $[\alpha]_D^{17^\circ\text{C}}$ .

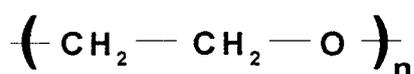
## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Materiais

Neste trabalho, os polímeros foram utilizados sem purificação prévia. As estruturas dos monômeros estão relacionadas abaixo e o valor da massa molar (Mw) foi fornecida pelo fabricante.

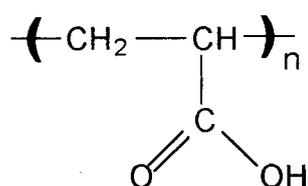
**PEO:** [poli(óxido de etileno)]

Mw = 300.000 g mol<sup>-1</sup>, Aldrich, lote 01729JZ



**Carbopol:** [poli(ácido acrílico)], com ligações cruzadas

Mw = superior a 700.000 g mol<sup>-1</sup>, BF Goodrich, lote 934P



Os solventes e os reagentes foram: ácido láurico (Vetec), n-hexano (Grupo Química), n-heptano (Grupo Química), cicloexano (Vetec), acetona (Grupo Química), n-pentanol (Vetec), (R,S)-2-octanol (Aldrich), acetato de etila (Grupo Química), etanol (Merck), éter etílico (Vetec), clorofórmio (Nuclear), sulfato de magnésio anidro (Vetec), hidróxido de sódio (Vetec), bicarbonato de sódio (Vetec), sílica para cromatografia de camada delgada (Aldrich 0,05-0,20 mm), sílica para coluna (Carlo Erba 70-200 mesh).

As enzimas utilizadas neste trabalho, estão apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Enzimas utilizadas

Fontes de lipases	Sigla	Atividade	Fornecedor/Lote
<i>Candida cylindracea</i> <sup>a</sup>	CCL	905 u mg <sup>-1</sup> (b)	Sigma/32H0702
Pancreática do porco	PPL	135 u mg <sup>-1</sup> (b)	Sigma/63H1027
<i>Rhizomucor miehei</i>	PAL	1000 LU g <sup>-1</sup> (c)	Novo Nordisk /LMN02011
<i>Aspergillus oryzae</i>	LIL	100 KLU g <sup>-1</sup> (c)	Novo Nordisk /LAP1064
<i>Mucor miehei</i>	LIZ	10,000 LU g <sup>-1</sup> (c)	Novo Nordisk /LMN0013
<i>Aspergillus niger</i>	A	120,000 u g <sup>-1</sup> (d)	Amano/LV05508
<i>Rhizopus oryzae</i>	F	150,000 u g <sup>-1</sup> (d)	Amano/LFV05516
<i>Candida rugosa</i>	AY	30,000 u g <sup>-1</sup> (d)	Amano/LAYV06517
<i>Mucor javanicus</i>	M	10,000 u g <sup>-1</sup> (d)	Amano/LMV01528
<i>Pseudomonas sp.</i>	PSL	30,000 u g <sup>-1</sup> (d)	Amano/LPSAV09502

a: atualmente denominada *Candida rugosa*

Fonte: Fichas técnicas das lipases utilizadas

Por definição<sup>(b)</sup> 1 unidade de lipase (u) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido graxo por minuto, utilizando-se óleo de oliva como substrato, a 37 °C, sendo o pH 7,2 e 7,7 para a CCL e PPL, respectivamente.<sup>67</sup>

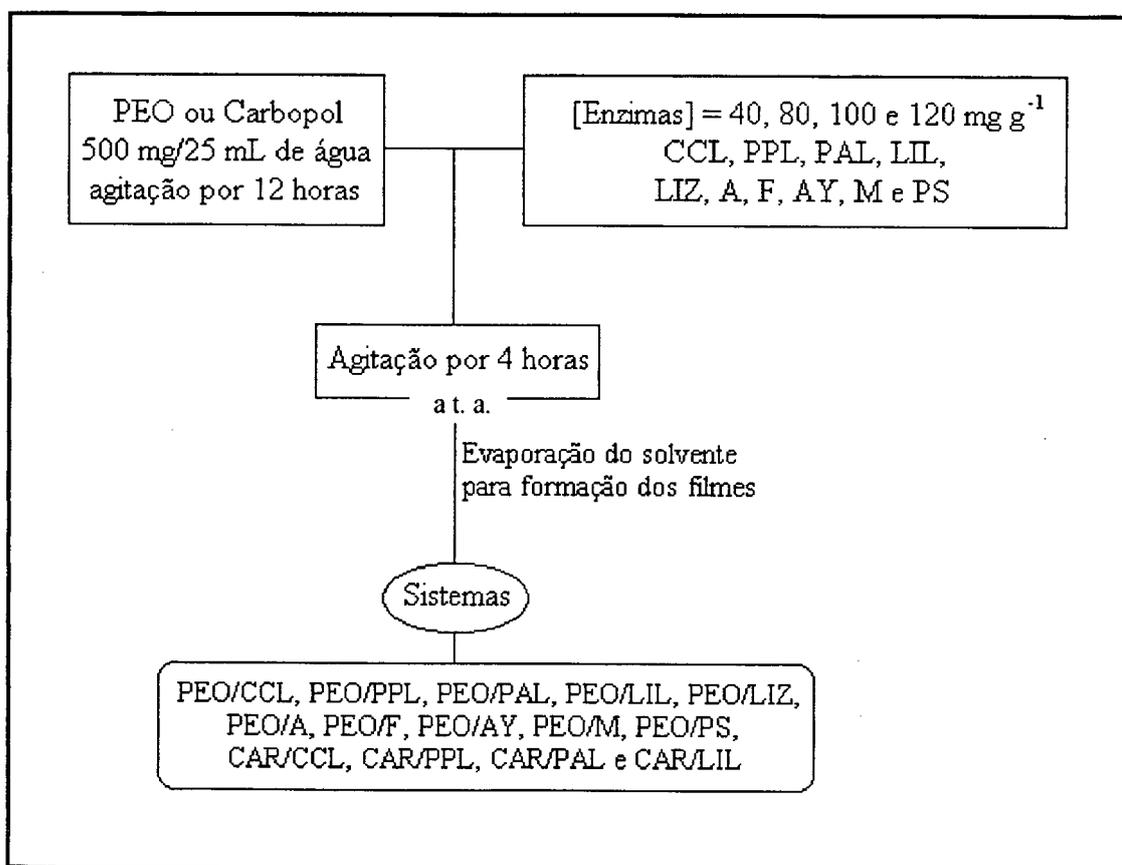
Por definição<sup>(c)</sup>, 1 unidade de lipase (LU) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido butírico por minuto, utilizando-se tributirina como substrato, a pH 7,0 e 30 °C.<sup>68</sup>

Por definição<sup>(d)</sup>, 1 unidade de lipase (u) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido graxo por minuto, utilizando-se óleo de oliva como substrato, a pH 7,0 e 37 °C.<sup>69</sup>

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Preparação dos Filmes com Enzimas Imobilizadas

Para a imobilização das lipases nos polímeros puros (Carbopol e PEO), foram solubilizadas 500 mg do polímero em 25 mL de água, com agitação constante por 12 horas. Após este período, adicionaram-se as enzimas, separadamente, em várias concentrações. O sistema foi mantido sob agitação constante por mais 4 horas. Evaporou-se o solvente para a formação e obtenção dos filmes (**Esquema I**). Todas as etapas de preparação dos filmes poliméricos com enzimas imobilizadas, foram realizadas a temperatura ambiente.



Esquema I. Preparação dos filmes poliméricos com enzimas imobilizadas.

Para a imobilização de enzimas, em blendas poliméricas (Carbopol/PEO), os polímeros foram solubilizados separadamente, em 12,5 mL de água com agitação constante por 12 horas. Após este período, as soluções contendo os polímeros foram misturadas e o sistema foi mantido sob agitação constante por mais 12 horas.

As amostras foram preparadas variando-se a composição dos polímeros de 0-100% (m/m), sendo a massa total de 500 mg. A adição de enzima e evaporação do solvente foi idêntica ao procedimento efetuado com os polímeros puros.

### 2.2.2. Síntese dos Ésteres

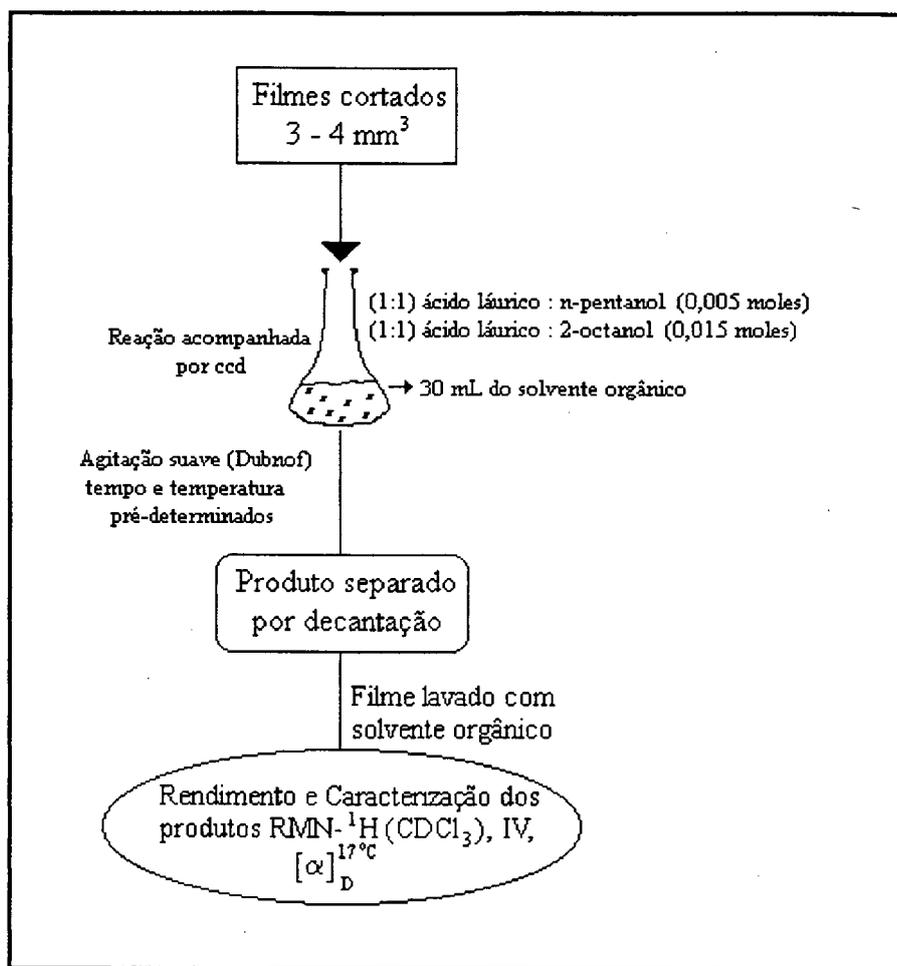
Os filmes, obtidos no item 2.2.1, foram cortados em secções de volume regulares de aproximadamente 3-4 mm<sup>3</sup>.

Em seguida, o filme foi colocado em um erlenmeyer contendo 30 mL do solvente orgânico utilizado. Os reagentes (ácido láurico e n-pentanol) foram adicionados na proporção de 1:1 (0,005 moles). Para a reação do (R,S)-2-octanol com ácido láurico, utilizou-se 0,015 moles dos reagentes.

O sistema foi deixado sob agitação suave (agitador Dubnoff, com banho termostaticado, MARCONI), de acordo com a temperatura e tempo necessário para a reação ocorrer. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada, utilizando-se como eluente uma mistura de n-hexano:acetato de etila (15:1).

Ao término da reação, os produtos e substratos remanescentes foram separados do filme, através de decantação, sendo este lavado várias vezes com solvente orgânico para remover os reagentes remanescentes e o produto. O solvente orgânico foi evaporado em um rotaevaporador RE111 da BÜCHI. Aliquotas do produto bruto isolado, foram coletadas para determinar a percentagem de conversão em éster por RMN <sup>1</sup>H (**Esquema II**).

Não ocorreu formação do produto na reação controle que foi realizada com os suportes poliméricos sem enzima, sob as mesmas condições experimentais.



Esquema II. Síntese e caracterização dos ésteres obtidos

### 2.2.3. Separação e Purificação dos Produtos

Os produtos obtidos foram dissolvidos em 30 mL de éter etílico e fêz-se a extração do ácido láurico não reativo com solução de NaHCO<sub>3</sub> 10%. O éster e o álcool não reativo foram separados por cromatografia em coluna. A coluna apresentava as dimensões de 70 x 0,25 cm. A mesma foi preenchida com sílica gel (40 cm), com diâmetro de 70-200 mesh. O eluente utilizado foi n-hexano:acetato de etila (15:1). Após eluição do éster, substituiu-se o eluente por n-hexano:acetato de etila (15:3) para obter o álcool não reativo.

#### 2.2.4. Hidrólise dos Ésteres

O éster R-(-)-laurato de 2-octila foi hidrolisado ao correspondente álcool reativo, em meio alcalino. O **Esquema III** mostra a síntese, purificação e hidrólise do R-(-)-laurato de 2-octila, obtido via enzimática.

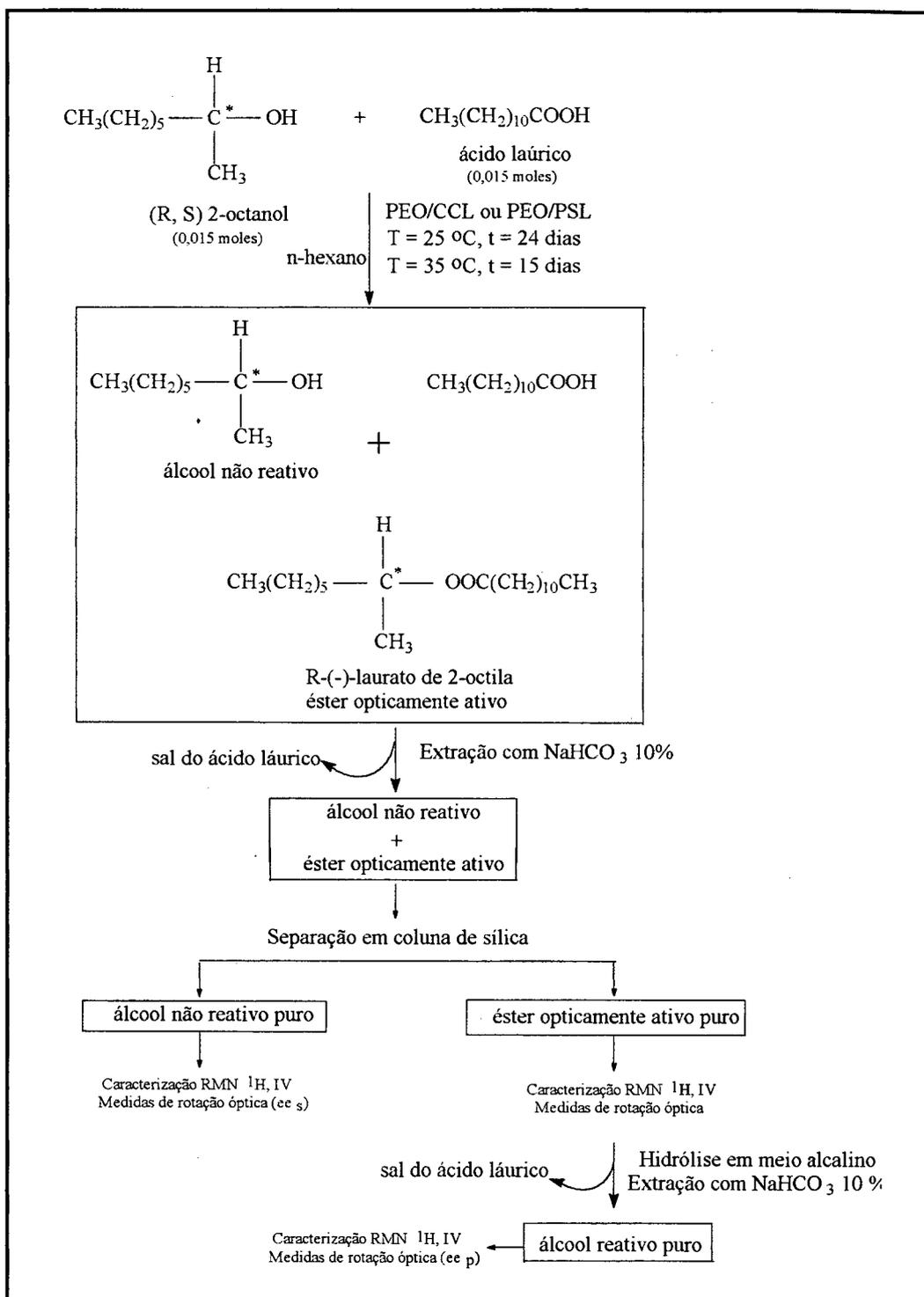
Foi dissolvido 1 g do éster em 25 mL de NaOH 1 M, em etanol. A hidrólise foi realizada sob refluxo suave por um período de 8 horas. O precipitado obtido (sal do ácido láurico) foi filtrado sob vácuo e lavado com éter etílico. Para garantir a total eliminação do ácido, foram realizadas extrações consecutivas com solução de NaHCO<sub>3</sub> 10%. A fase etérea foi seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado para a obtenção do álcool reativo puro.

#### 2.2.5. Caracterização dos Suportes e Produtos

Os espectros de IV foram obtidos em um espectrômetro FTIR da PERKIN ELMER modelo 16C e os espectros de RMN <sup>1</sup>H em um espectrômetro BRUCKER AC 200 MHz, utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e clorofórmio deuterado como solvente.

As medidas de rotação óptica foram realizadas em um polarímetro modelo POLARTRONIC E da SCHMIDT + HAENSCH. As medidas foram realizadas a 17 °C, sendo que as soluções foram preparadas em clorofórmio na concentração de 16,4 .10<sup>-3</sup> g mL<sup>-1</sup>.

A morfologia dos suportes foi obtida em um microscópio eletrônico de varredura modelo PHILIPS XL30. Os filmes com e sem as enzimas, foram fraturados em nitrogênio líquido e análises foram realizadas na superfície e fratura (interior) do material. Para as enzimas, realizou-se somente análise de superfície. As amostras foram metalizadas, com uma fina camada de ouro, em um metalizador modelo P-S2 DIODE SPUTTERING SYSTEM.



Esquema III. Síntese, purificação e hidrólise do R-(-)-laurato de 2-octila

Para as análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC), utilizou-se um DSC-50 da SHIMADZU. A análise termogravimétrica (TG), foi realizada em um TGA-50 da SHIMADZU. Os parâmetros utilizados estão apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Parâmetros utilizados nas análises térmicas

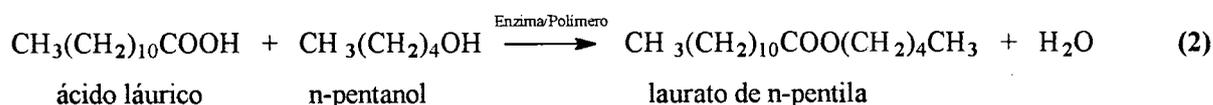
Análise	Massa (mg)	Taxa de aquecimento ( $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ )	Fluxo de $\text{N}_2$ ( $\text{mL min}^{-1}$ )	Faixa de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
DSC	5 - 10	5	50	25 - 250
TG	5 - 10	10	50	25 - 900

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Justificativa da Escolha do Polímero e Enzimas

Inicialmente foi determinada a percentagem de conversão na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol (**Equação 2**), catalisada por lipases imobilizadas em Carbopol, blenda PEO/Carbopol e PEO puro.

Essa reação foi escolhida como padrão, pois as lipases em geral, possuem uma boa atividade frente a ácidos de cadeia longa.<sup>56, 68</sup> Para os polímeros puros PEO e Carbopol, as reações foram realizadas a 25 e 35°C por 30 horas, utilizando-se como meio reacional n-hexano. A concentração de enzima foi de 100 mg g<sup>-1</sup>.

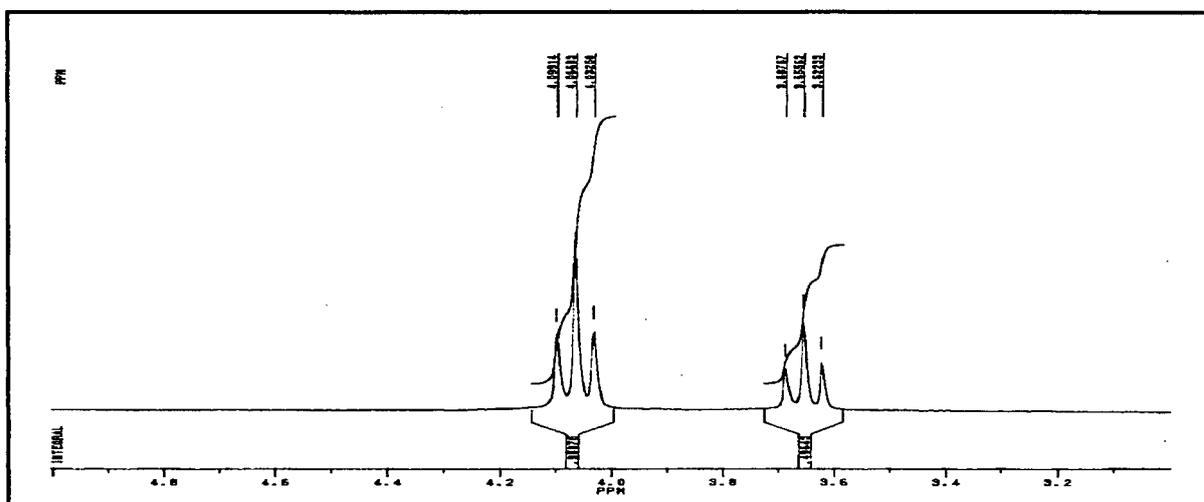


A percentagem de conversão foi determinada quantitativamente, através da análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H. O cálculo foi estimado pela comparação dos deslocamentos químicos dos grupos de prótons metilênicos do álcool e do éster. Para o n-pentanol e o laurato de n-pentila, observam-se tripletes em 3.65 (2H, CH<sub>2</sub>OH) e 4.06 ppm (2H, CH<sub>2</sub>O), respectivamente. Por exemplo, na ampliação do espectro mostrado de RMN <sup>1</sup>H na **Figura 17**, o grau de conversão em éster foi de 65%.

Primeiramente o Carbopol foi utilizado para a imobilização das enzimas CCL, PPL, PAL e LIL. Para as duas temperaturas estudadas (25 e 35 °C), não houve formação do produto utilizando-se as enzimas PPL, PAL e LIL. Estes resultados indicam, que provavelmente este suporte causa a inativação destas enzimas, devido ao pH da solução polimérica ser próximo a 3,0.

Estudos realizados anteriormente mostraram que a atividade enzimática depende do pH, sendo que a maioria das enzimas apresentam atividade máxima em pH próximo da neutralidade.<sup>3, 6-8</sup>

Utilizando o suporte Carbopol/CCL o produto foi formado a 25 °C com um grau de conversão de 93%. Entretanto, a 35 °C o grau de conversão foi 0%. Estes resultados indicam que nesta temperatura, provavelmente ocorrem mudanças na conformação do Carbopol e enzima, levando a inativação do biocatalisador. O aumento de 10 °C na temperatura de reação também pode favorecer interações entre os grupos ácidos do polímero com os resíduos de aminoácidos que constituem o sítio ativo desta enzima, decorrendo na perda da sua atividade catalítica.



**Figura 17.** Região ampliada do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , evidenciando os grupos de prótons utilizados na determinação da percentagem de conversão em éster, para a reação de esterificação padrão.

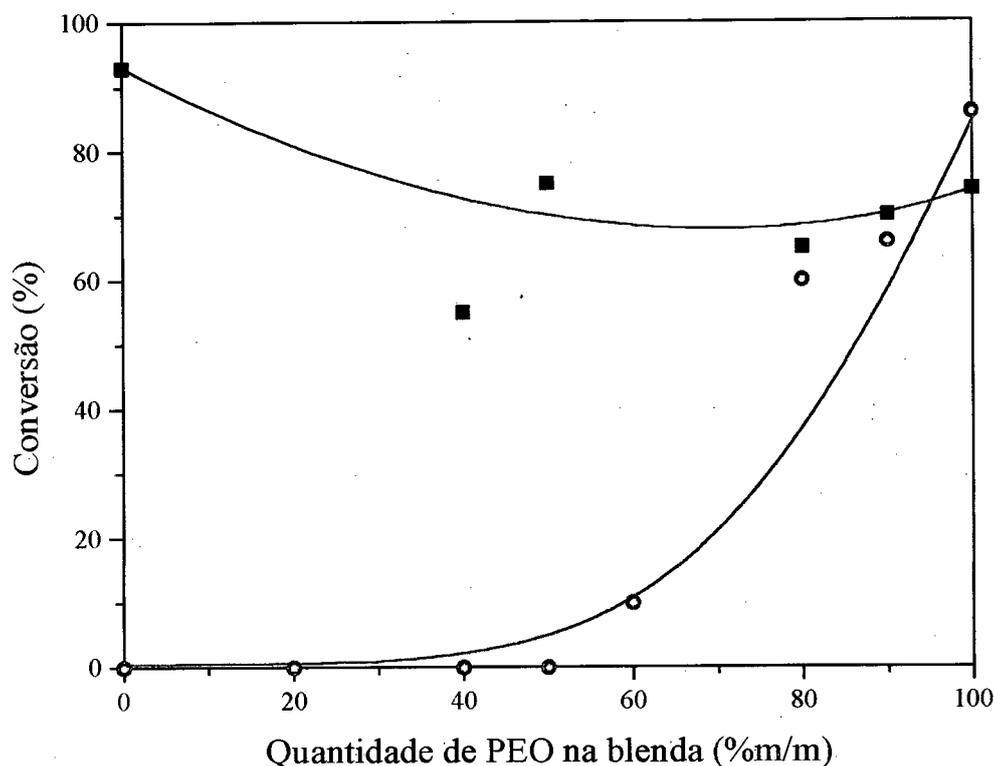
Para avaliar de forma mais efetiva o efeito do Carbopol nos resultados obtidos anteriormente, a CCL foi imobilizada na blenda PEO/Carbopol e a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol foi realizada a 25 e 35 °C, por 120 horas, em n-hexano. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Valores de percentagem de conversão em éster obtidos com a CCL imobilizada na blenda PEO/Carbopol.

Carbopol/PEO (%m/m)	Conversão <sup>a</sup> (%)	
	25 °C	35 °C
100/0	93	0
80/20	80	0
60/40	55	0
50/50	75	0
40/60	50	10
20/80	65	60
10/90	70	66
0/100	74	86

a: obtida por RMN <sup>1</sup>H, [enzima]: 100 mg g<sup>-1</sup>, tempo de reação: 120 horas, solvente: n-hexano

Quando a reação foi realizada na temperatura de 25 °C, observou-se que um aumento na quantidade de PEO na blenda leva a uma diminuição no grau de conversão em éster de 93% (Carbopol puro) para 74% (PEO puro). Entretanto, a 35 °C o aumento da quantidade de PEO, levou a uma maior percentagem de conversão em éster. Devido ao Carbopol puro levar a inativação da CCL a 35 °C, acredita-se que a reação está ocorrendo devido ao aumento gradativo de PEO na blenda. A **Figura 18** mostra a influência da quantidade de PEO na blenda PEO/Carbopol em função do grau de conversão da reação de esterificação padrão catalisada pela CCL, a 25 e 35 °C.



**Figura 18.** Influência da quantidade de PEO na blenda PEO/Carbopol em função do grau de conversão da reação de esterificação padrão, utilizando-se o suporte PEO/Carbopol/CCL a (■) 25 °C e (○) 35 °C; [enzima]: 100 mg g<sup>-1</sup>, solvente: n-hexano; tempo de reação: 120 horas.

CCL e outras lipases foram imobilizadas em PEO puro, para verificar a aplicação deste polímero como suporte. Os resultados obtidos, em termos da percentagem de éster formado (laurato de n-pentila), utilizando-se as diferentes enzimas imobilizadas em PEO estão apresentados na **Tabela 6**.

Os dados apresentados na **Tabela 6**, indicam que as conversões dos ésteres dependem da fonte da lipase bem como da temperatura na qual foi realizada a reação de esterificação padrão.

A **Figura 19** apresenta o efeito da temperatura de reação sobre o grau de conversão em éster, para as diversas lipases imobilizadas em PEO.

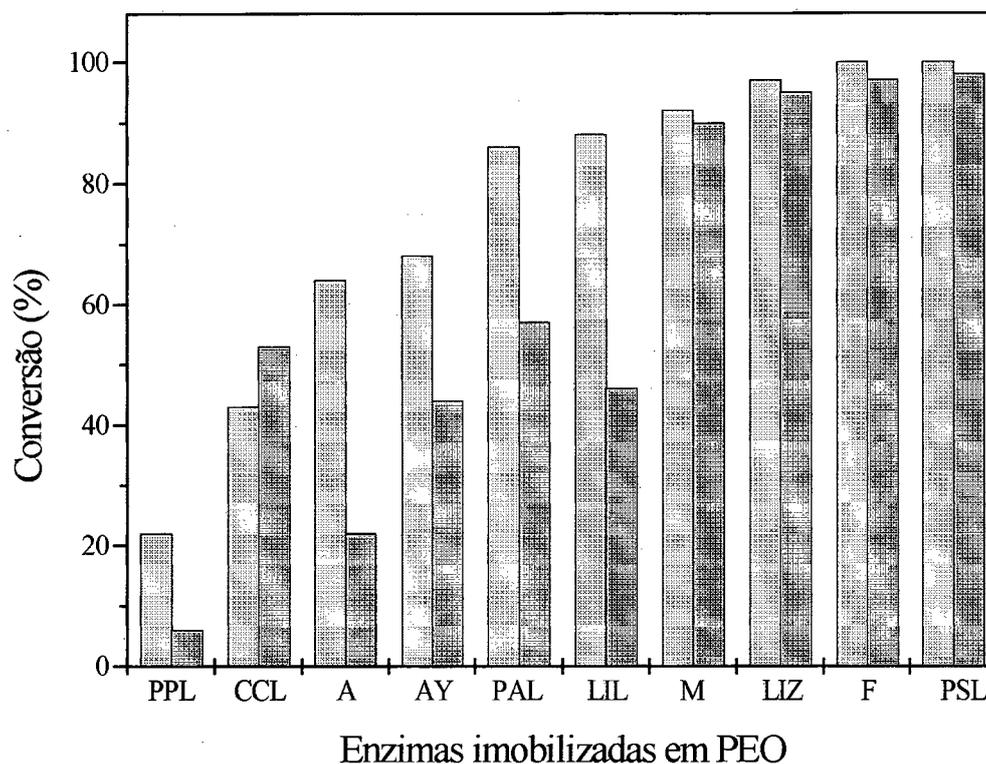
**Tabela 6.** Valores de percentagem de conversão em éster obtidos para as diversas lipases imobilizadas em PEO.

Enzimas	Conversão <sup>a</sup> (%)	
	25 °C	35 °C
PPL	22	6
CCL	43	53
A	64	22
AY	68	44
PAL	86	57
LIL	88	46
M	92	90
LIZ	97	95
F	100	97
PSL	100	98

a: obtida por RMN <sup>1</sup>H, [enzima]: 100 mg g<sup>-1</sup>, tempo de reação: 30 horas, solvente: n-hexano

Os melhores valores de conversão foram obtidos, utilizando-se as enzimas F e PSL (> 95%) imobilizadas em PEO. O aumento da temperatura de reação levou, para algumas lipases, a uma diminuição da percentagem de conversão em éster. Entretanto, para a CCL ocorreu um aumento no grau de conversão com o aumento da temperatura de reação. Este resultado foi concordante com estudos anteriores, para a reação de esterificação da diol lactona com S-(+)-2-ácido metilbutírico, catalisada pela CCL imobilizada em náilon.<sup>42</sup>

De maneira geral, estes resultados indicam que provavelmente está ocorrendo desnaturação das lipases com o aumento da temperatura, considerando que o polímero mantém a sua integridade a nível macroscópico não sendo observadas perdas de material no solvente orgânico.



**Figura 19.** Valores de percentagem de conversão em éster obtidos utilizando-se diversas lipases immobilizadas em PEO, a 25 °C e 35 °C; [enzima]: 100 mg g<sup>-1</sup>, solvente: n-hexano; tempo de reação: 30 horas.

A partir destes resultados iniciais, o PEO foi escolhido como suporte para a imobilização de lipases, visto que o mesmo mantém a atividade enzimática a 25 e 35 °C e não requer um ajuste do pH da solução polimérica, para realizar a imobilização.

As enzimas escolhidas para o prosseguimento deste trabalho foram a CCL e PSL. Embora a CCL tenha apresentado uma conversão menor do que a PSL para a reação padrão, trabalhos anteriores mostram que a CCL foi enantiosseletiva para reações de esterificação de ácidos racêmicos com n-heptanol, em cicloexano.<sup>32</sup> A PSL apresentou um ótimo valor de conversão para a reação de esterificação padrão (>97 %)<sup>a</sup> e a mesma foi enantiosseletiva em reações de esterificação de ácidos alifáticos com álcoois secundários racêmicos, em hexano.<sup>39</sup>

a: dados obtidos neste trabalho, vide tabela 6.

### 3.2. Caracterização dos Suportes PEO/CCL e PEO/PSL

A partir dos resultados obtidos e conforme já mencionado, os suportes PEO/CCL e PEO/PSL foram os mais estudados neste trabalho. A caracterização destes suportes envolveu análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e térmicas de termogravimetria (TG) e calorimetria de varredura diferencial (DSC), dos filmes poliméricos com e sem enzimas.

#### 3.2.L Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para verificar a homogeneidade dos suportes e a presença das enzimas. Estas foram efetuadas para as enzimas CCL e PSL puras, para o PEO puro e suportes PEO/CCL e PEO/PSL.

As **Figuras 20 e 21** apresentam as micrografias das enzimas CCL e PSL puras, respectivamente. A enzima PSL apresentou homogeneidade com relação ao tamanho e característica dos grãos, como observado na **Figura 21 B**, após um aumento de 800x. Por outro lado, a CCL apresentou-se mais aglomerada indicando uma menor homogeneidade nesta enzima (**Figura 20 A**).

A **Figura 22** mostra as micrografias das fraturas do PEO e suportes PEO/CCL e PEO/PSL. Não foram observadas diferenças na morfologia de fratura do PEO puro e na presença das enzimas CCL e PSL. Por outro lado, a morfologia da superfície do PEO e suportes com enzimas, indicam que as lipases estão localizadas preferencialmente na superfície do material polimérico (**Figura 23**). A superfície dos suportes apresentaram uma homogeneidade completa, indicando que neste sistema o processo de imobilização ocorreu por adsorção das enzimas sobre o suporte polimérico.

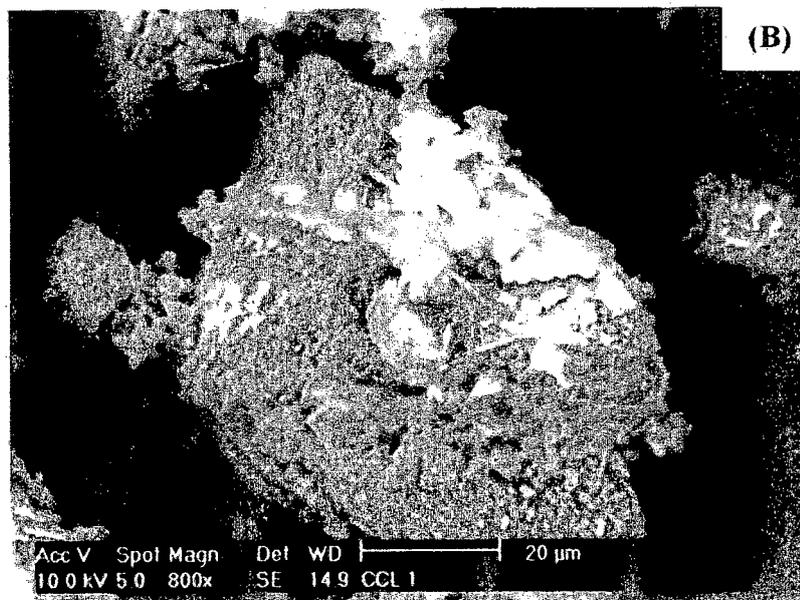
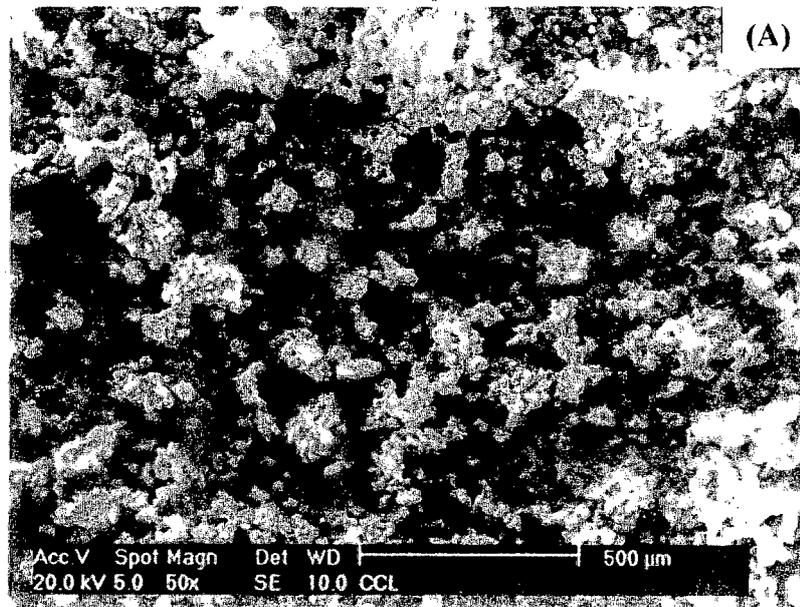


Figura 20. Micrografias da CCL pura: (A) aumento de 50x e (B) aumento de 800x.

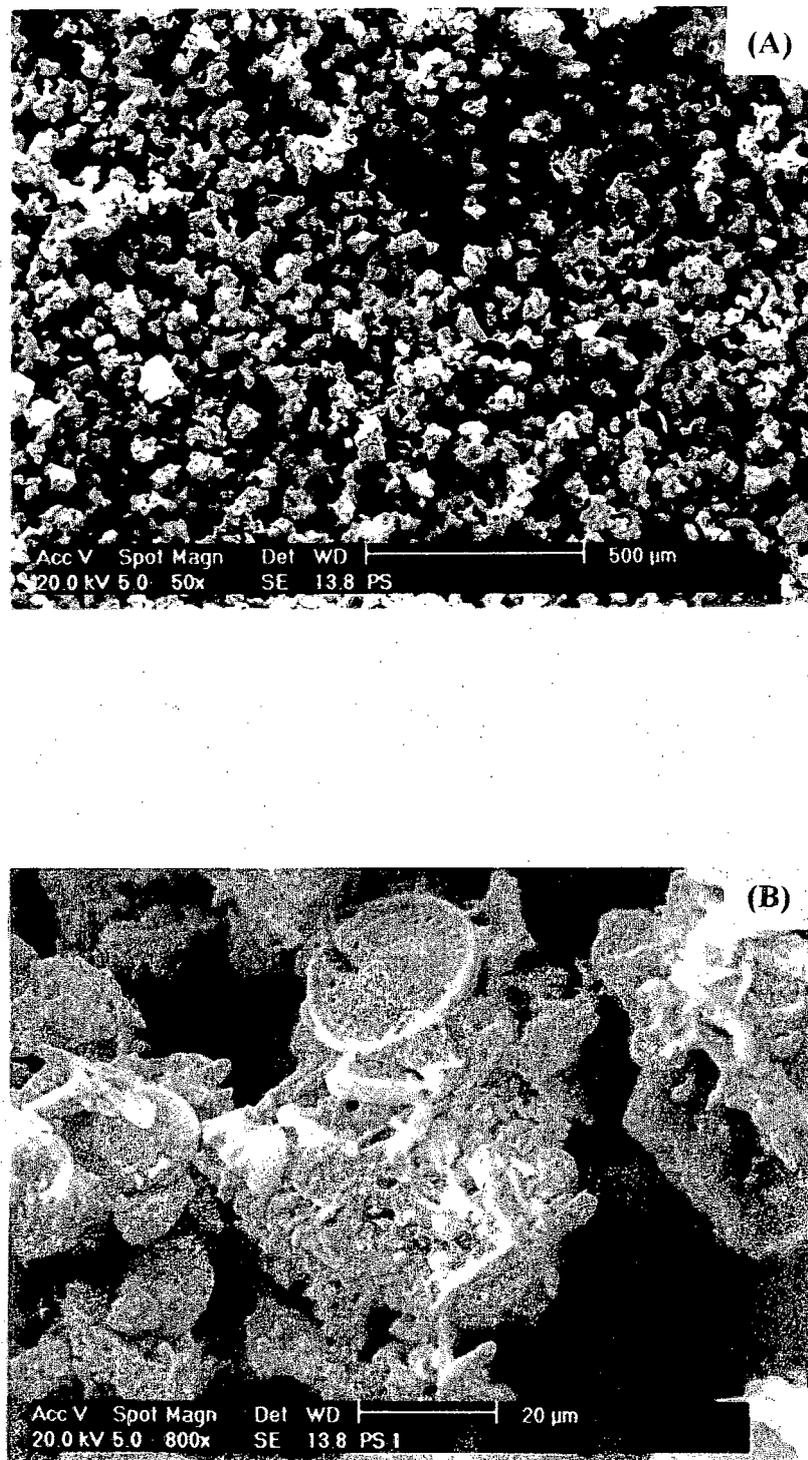


Figura 21. Micrografias da PSL pura: (A) aumento de 50x e (B) aumento de 800x.

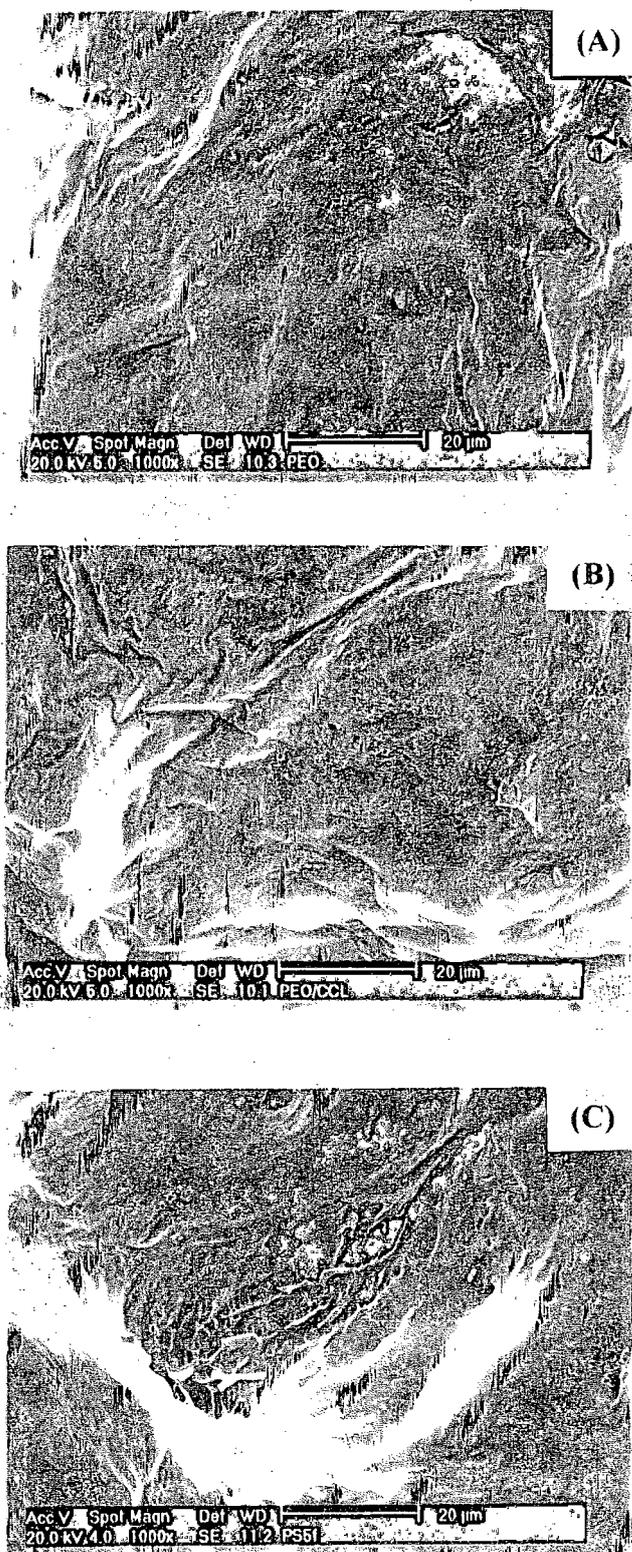


Figura 22. Micrografias das fraturas: (A) PEO puro, (B) suporte PEO/CCL e (C) suporte PEO/PSL, aumento de 1000x.

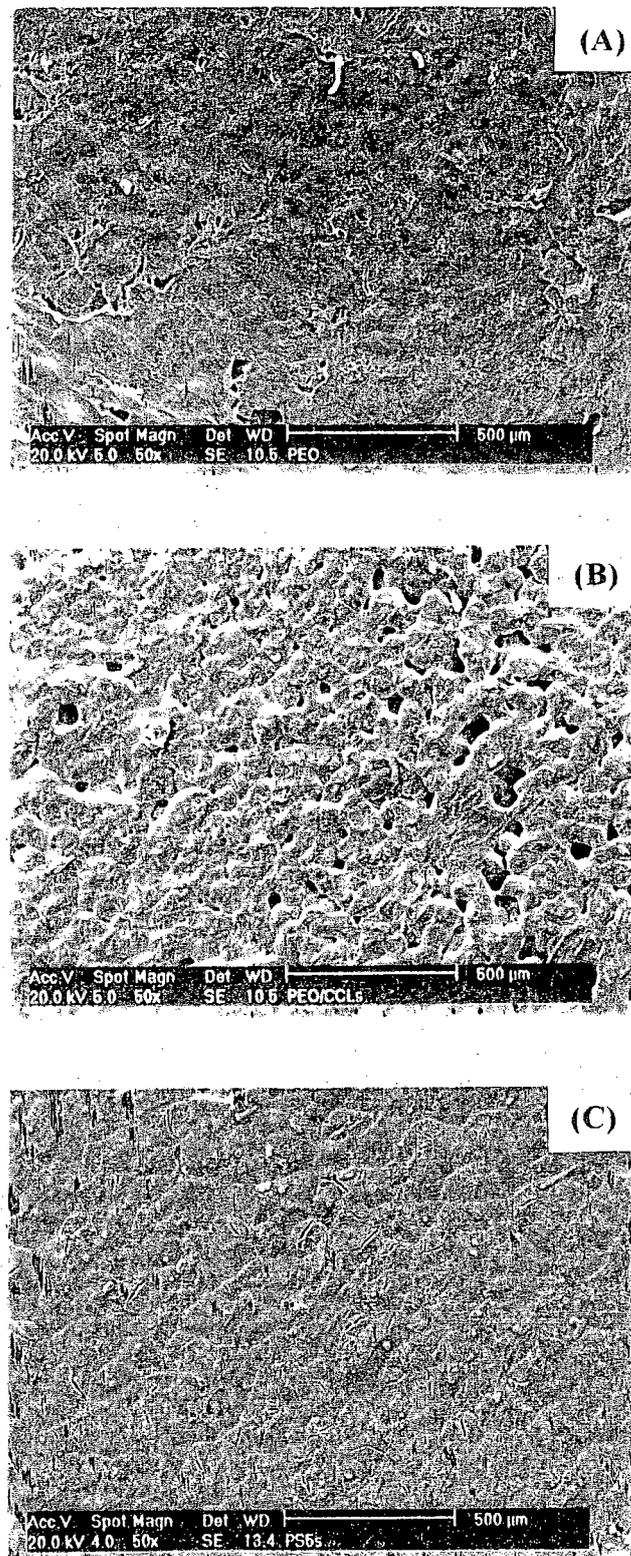


Figura 23. Micrografias das superfícies: (A) PEO puro, (B) suporte PEO/CCL e (C) suporte PEO/PSL, aumento de 50x.

### 3.2.2. Análises Térmicas

Análises termogravimétricas (TG) e de calorimetria de varredura diferencial (DSC) foram realizadas com o objetivo de verificar a decomposição, estabilidade e transições térmicas dos suportes PEO/CCL e PEO/PSL.

A **Tabela 7** apresenta os resultados de TG, obtidos para a CCL, PSL e PEO puro e suportes PEO/CCL e PEO/PSL. As curvas de TG e DTG estão apresentadas na **Figura 24**.

**Tabela 7.** Resultados obtidos na análise termogravimétrica

Material analisado	Temperatura (°C)	Perda de massa <sup>a</sup> (%)
CCL	69	3,50
	252	42,00
PSL	65	1,25
	274	16,70
PEO	428	97,00
PEO/CCL	38	1,35
	237	3,68
	406	85,25
PEO/PSL	419	83,35

a: perda de massa na temperatura indicada

Para a CCL ocorreu uma pequena perda de massa em 69 °C, devido à presença de água na sua estrutura. A maior perda de massa foi observada em 252 °C, devido a decomposição do biocatalisador e da lactose. Esta enzima possui 30% de  $\alpha$ -lactose monohidratada na sua composição.<sup>63</sup>

Para a PSL, foram observadas perdas de massa em 65 e 274 °C, devido à presença de água na sua estrutura e decomposição do biocatalisador, respectivamente. Para o PEO, observou-se uma única perda de massa em 428 °C, devido à decomposição do polímero.

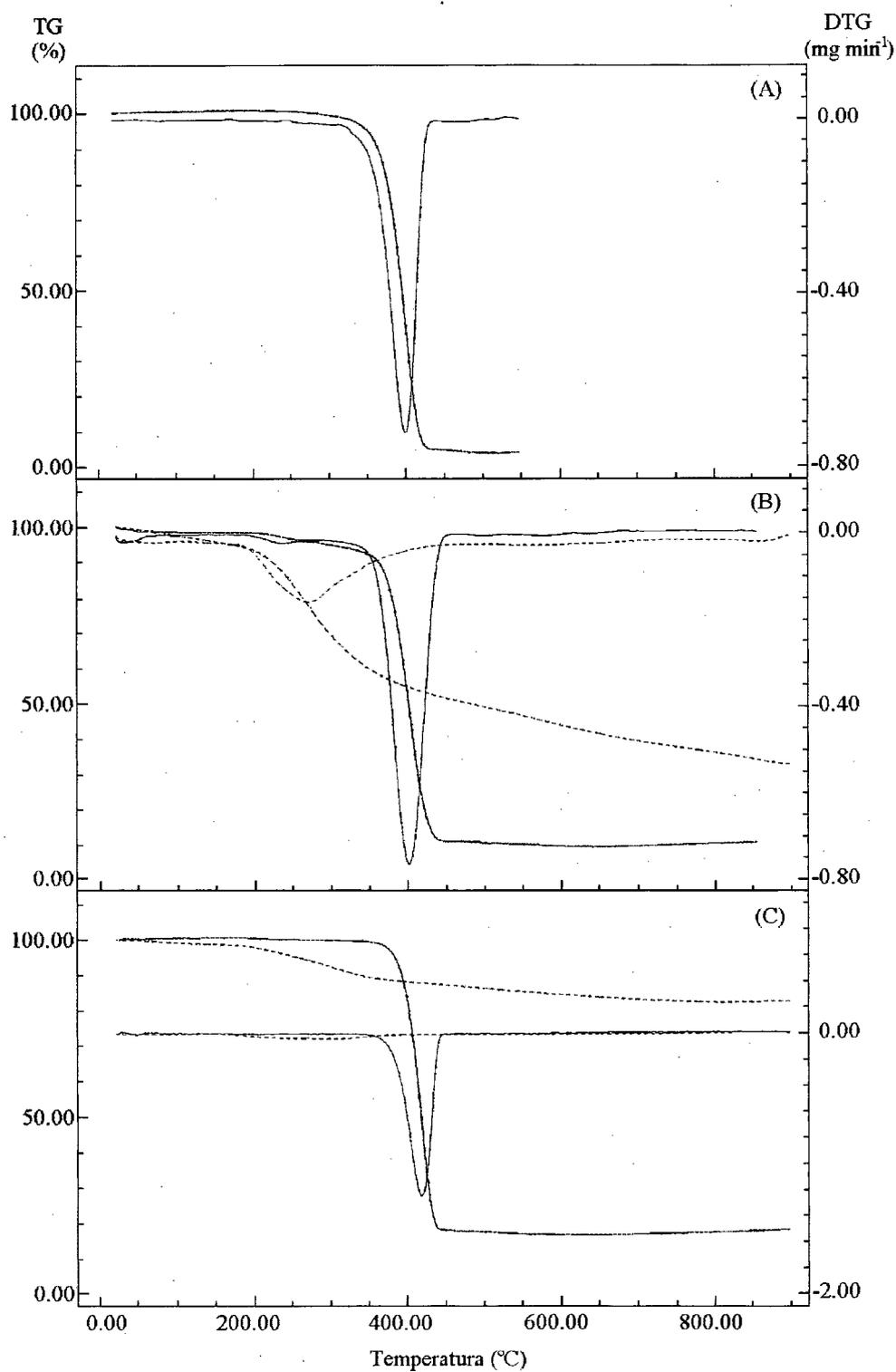
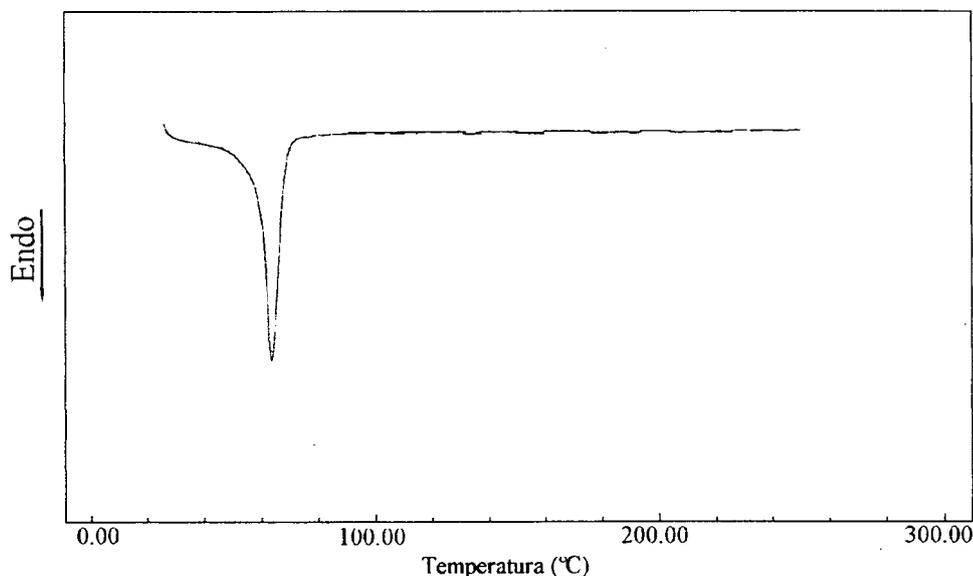


Figura 24. Curvas de TG e DTG: (A) PEO puro, (B) (----) CCL pura e (—) suporte PEO/CCL e (C) (----) PSL pura e (—) suporte PEO/PSL.

Para o suporte PEO/CCL, verificou-se perdas de massa em 38 e 237 °C, referentes à presença da CCL no suporte. A perda de massa em 406 °C indica a decomposição do PEO.

No suporte PEO/PSL, observou-se uma única perda de massa em 419 °C, indicando que após a imobilização, a enzima (PSL) adquiriu uma maior estabilidade térmica. Comportamento semelhante foi observado por Montero e col. após a imobilização de CCL em poli(propileno).<sup>7</sup>

A **Figura 25** mostra a curva de DSC para o PEO puro na qual foi observada uma temperatura de fusão ( $T_m$ ) em 65 °C.

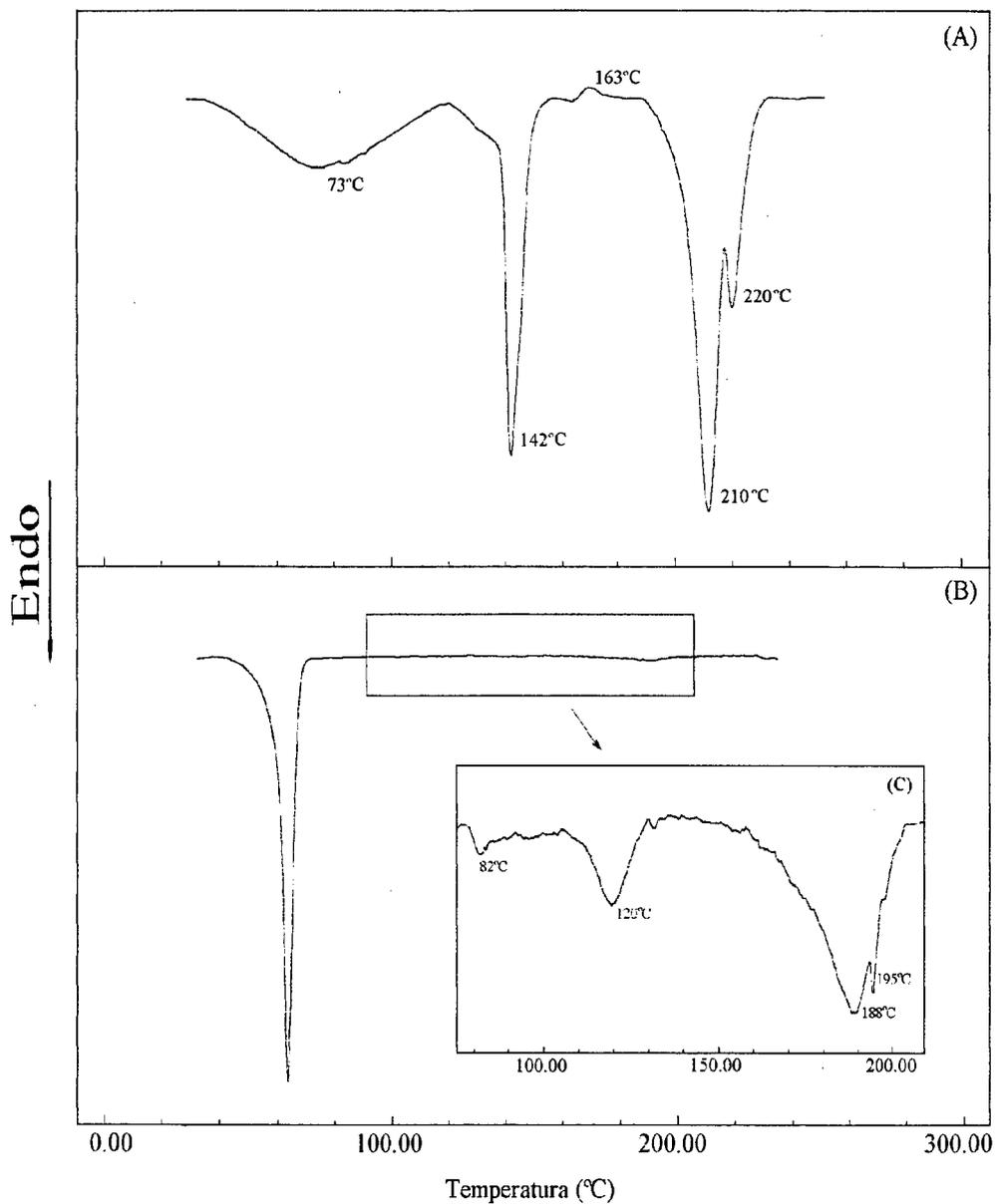


**Figura 25.** Curva de DSC do PEO puro.

A **Figura 26** apresenta as curvas de DSC para a CCL pura e suporte PEO/CCL.

Na curva de DSC da CCL pura, a transição endotérmica em 73 °C indica a perda de água estrutural da enzima. A análise de TG confirmou esta perda em 69 °C. As demais transições são típicas da  $\alpha$ -lactose monohidratada, sendo que as endotérmicas em 142, 210 e 220 °C correspondem à água de cristalização, fusão e decomposição da lactose, respectivamente. A transição exotérmica em 163 °C, corresponde à recristalização de uma pequena porção amorfa da lactose.<sup>63</sup>

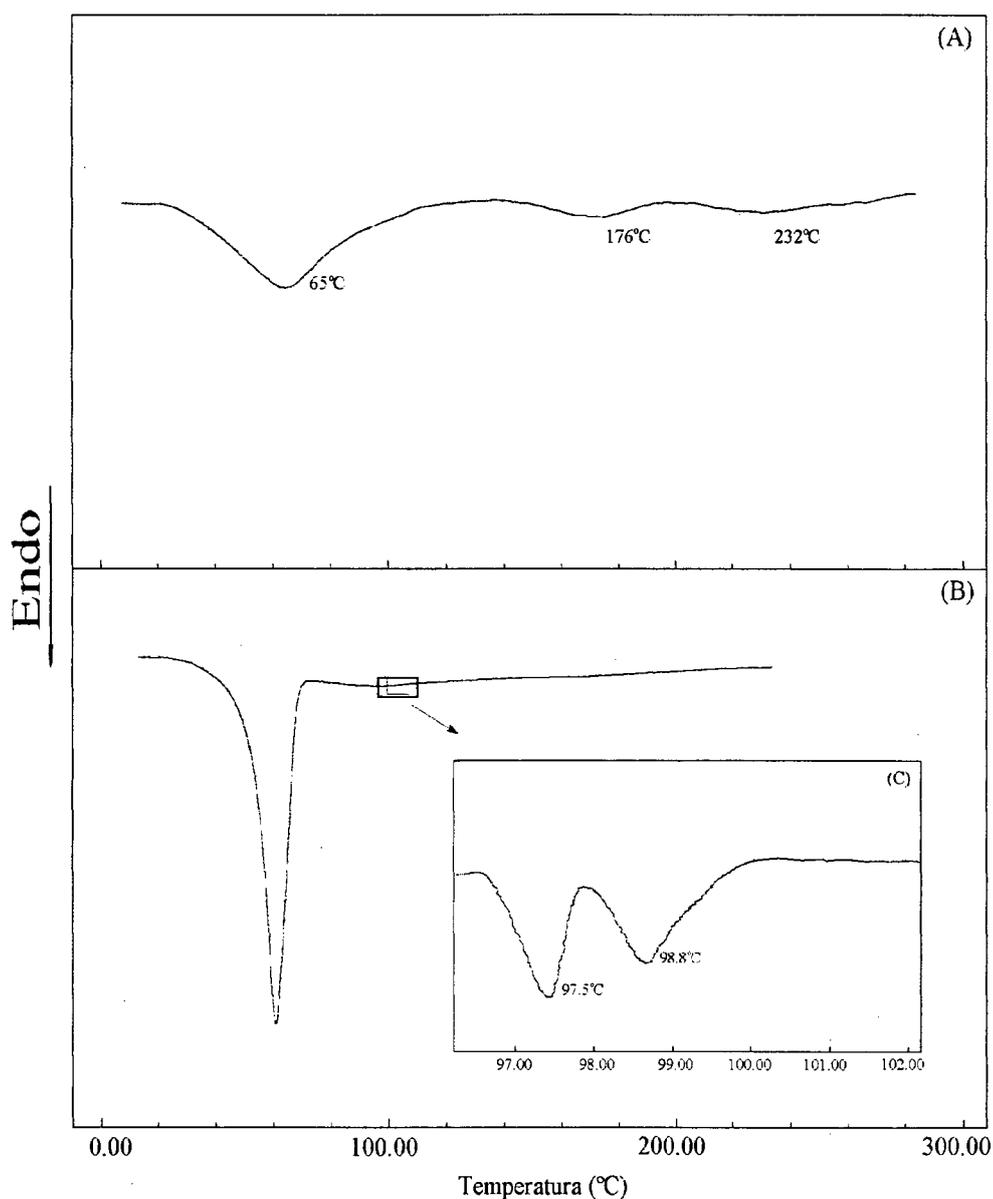
Após imobilização da CCL em PEO (**Figura 26 B**), observaram-se as transições da CCL em 82 °C e da lactose em 120, 188 e 195 °C, respectivamente (**Figura 26 C**).



**Figura 26.** Curvas de DSC: (A) CCL pura, (B) suporte PEO/CCL e (C) ampliação da região de 80-205 °C para o suporte PEO/CCL.

As diferenças nas temperaturas das transições referentes à enzima, após imobilização da mesma em PEO, indicam a ocorrência de interações entre grupos éteres do polímero e resíduos de aminoácidos da enzima, perturbando o equilíbrio térmico da mesma.

A **Figura 27** apresenta as curvas de DSC para a PSL pura e suporte PEO/PSL.



**Figura 27.** Curvas de DSC: (A) PSL pura, (B) suporte PEO/PSL e (C) ampliação da região de 96-102 °C para o suporte PEO/PSL.

Para a PSL, a curva de DSC indica uma transição endotérmica em 65 °C, referente à perda de água da estrutura da enzima, sendo confirmada pela análise de TG. As demais transições endotérmicas foram observadas em 176 °C e 232 °C e devem corresponder a desnaturação e decomposição da PSL. Resultado semelhante foi observado por Zoungrana e col., quando imobilizaram  $\alpha$ -quimiotripsina em poli(estireno).<sup>64</sup>

Observaram-se transições da PSL imobilizada em PEO, em 97,5 e 98,8 °C (Figura 27 C). A transição endotérmica a 65 °C foi encoberta pela T<sub>m</sub> do PEO (Figura 27 B).

Para este suporte, a diferença nas temperaturas das transições térmicas foi maior que para o suporte PEO/CCL, indicativo de interações entre PEO e PSL. Estas interações provavelmente foram responsáveis pelo aumento da estabilidade térmica deste suporte (PEO/PSL) observado na análise termogravimétrica (TG).

### 3.3. Aplicação dos Suportes para Reações em Meio Orgânico

Inicialmente, realizou-se a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol em n-hexano (Equação 2) catalisadas pelas enzimas CCL e PSL em suspensão (método de Klibanov) e imobilizadas em PEO. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Este método foi utilizado pela primeira vez em 1986 por Alexander Klibanov para efetuar reações sintéticas 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; as partículas de enzima devem ser pequenas suficientes e a suspensão deve ser continuamente agitada para minimizar as limitações difusionais.<sup>70</sup>

**Tabela 8.** Resultados obtidos na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, utilizando-se as enzimas em suspensão e imobilizadas em PEO

Sistemas	Conversão <sup>a</sup> (%)	
	25 °C	35 °C
CCL <sup>b</sup>	14	18
PSL <sup>b</sup>	9	7
PEO/CCL <sup>c</sup>	11	40
PEO/PSL <sup>c</sup>	79	94

a: obtida por RMN <sup>1</sup>H, b: método de Klivanov, [enzima]: 60 mg, c: [enzima] = 120 mg/g, tempo de reação: 8 horas, solvente: n-hexano

Os resultados obtidos indicam que após a imobilização em PEO, ocorreu um aumento na atividade catalítica das enzimas CCL e PSL. Resultados semelhantes foram observados por Bagi e col. que utilizaram suportes poliméricos como poli(acrilamida) e poli(etileno-tereftalato), para a imobilização da lipase pancreática do porco (PPL).<sup>10</sup> O aumento da atividade enzimática da CCL foi também observado após imobilização em poli(estireno)<sup>53</sup> e poli(ácido acrílico).<sup>33</sup>

Para a CCL imobilizada em PEO, o aumento na percentagem de conversão em éster ocorreu somente a 35 °C, indicando que a imobilização da CCL em PEO, favoreceu a catálise nesta temperatura.

Para a PSL, a percentagem de conversão em produto foi maior após sua imobilização em PEO, indicando que este suporte estabilizou a enzima para reações em meio orgânico. O aumento da estabilidade da PSL no suporte PEO/PSL foi também confirmado pelas análises de TG e DSC, citadas anteriormente.

### 3.3.1. Efeito do Tempo de Reação, Temperatura, Concentração de Enzima e Meio Reacional na Reação de Esterificação Catalisada por CCL e PSL Imobilizadas em PEO

O tempo de reação, a temperatura e a concentração de enzima nos suportes PEO/CCL e PEO/PSL, foram estudados simultaneamente, na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol (Equação 2), em n-hexano. A Tabela 9 apresenta os valores de percentagem de conversão dos ésteres obtidos utilizando-se a CCL e PSL imobilizadas em PEO.

Para os suportes PEO/CCL e PEO/PSL, observou-se uma maior percentagem de conversão em éster a medida que aumentou o tempo de reação, a temperatura e a concentração de enzima nos suportes. A conversão máxima em éster (100%) foi obtida após 30 e 192 horas de reação, para os suportes PEO/PSL e PEO/CCL, respectivamente. Isto indica que a PSL foi mais efetiva que a CCL, nestas condições experimentais.

Talon e col. observaram que o aumento do tempo de reação leva a uma maior percentagem de conversão, para reações de esterificação de ácidos a álcoois alifáticos, catalisadas pelas lipases de *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus xylosus*, imobilizadas em sílica gel.<sup>56</sup>

Para os dois suportes estudados á medida que a concentração de enzima aumenta, foi observado uma maior percentagem de conversão em éster devido a maior quantidade de biocatalisador disponível para a formação do complexo enzima/substrato. Entretanto nos dois sistemas estudados, a partir da concentração de enzima de 100 mg g<sup>-1</sup>, a percentagem de conversão em éster tornou-se independente da concentração de enzima no suporte, indicando que existe uma relação entre a concentração do substrato e a quantidade de enzima no suporte polimérico.

A Figura 28 mostra as percentagens de conversão em éster em função do tempo de reação, para diferentes concentrações de enzima nos suportes PEO/CCL e PEO/PSL.

A relação entre concentração de enzima e substrato foi observada para a Palatase M imobilizada em organo-gel. Existe uma concentração de enzima limite no organo-gel, a partir da qual o aumento da mesma não influencia a percentagem de conversão em éster, para reações de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, em hexano.<sup>52</sup>

**Tabela 9.** Resultados de percentagem de conversão obtidos na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, utilizando-se os suportes PEO/CCL e PEO/PSL a 25 e 35 °C.

Tempo de Reação (horas)	Conversão <sup>a</sup> (%) 25/35°C			
	[Enzima] (mg g <sup>-1</sup> )			
	40	80	100	120
PEO/CCL				
4	0/0	0/0	0/0	0/0
8	0/0	9/13	11/16	12/20
30	13/17	23/30	26/49	28/48
120	80/82	92/93	97/97	96/98
192	100/100	100/100	100/100	100/100
PEO/PSL				
4	28/40	37/67	49/73	50/73
6	42/58	60/76	65/85	65/87
8	57/62	66/79	61/88	64/92
10	66/84	80/96	80/90	79/95
24	87/90	94/95	86/95	96/100
30	78/93	91/98	98/100	99/100

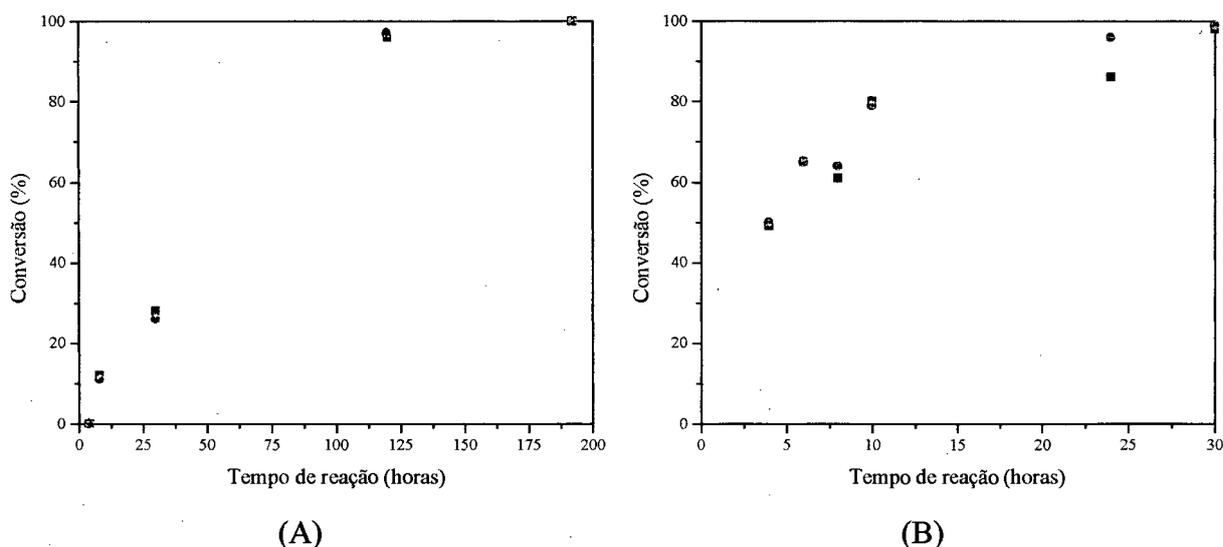
a: obtida por RMN <sup>1</sup>H, solvente: n-hexano

De modo análogo à 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 catalítica. A temperatura ótima de reação é dependente de cada enzima, sendo que as mesmas são desnaturadas pelo calor ou tornam-se inativas a medida que a temperatura aumenta.<sup>24</sup>

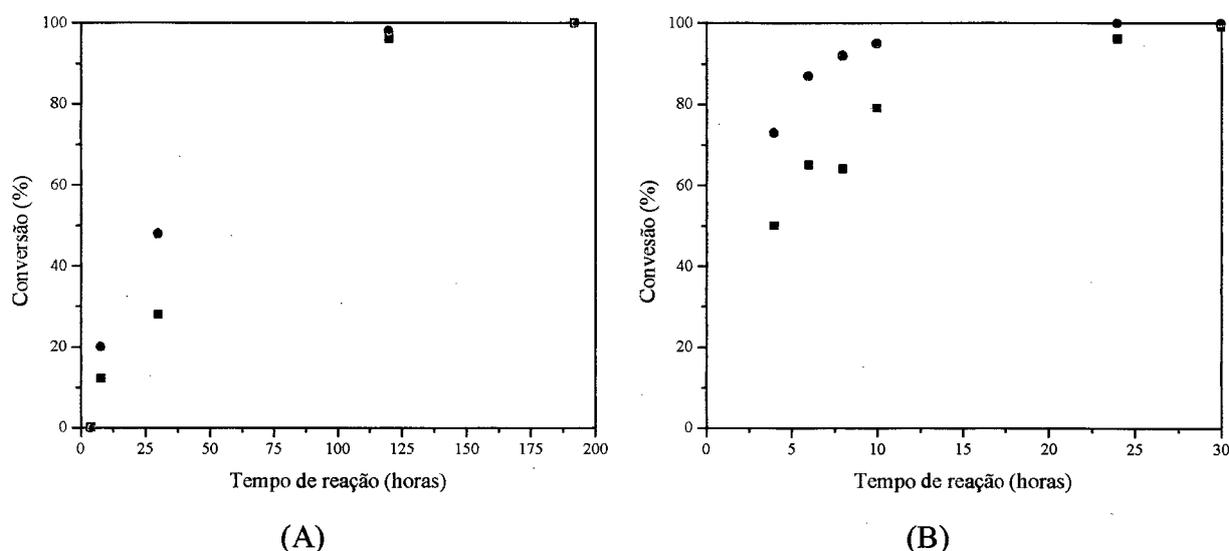
As percentagens de conversões em éster foram superiores, quando a temperatura de reação aumentou de 25 para 35°C, indicando que estas enzimas possuem atividade catalítica melhor nesta temperatura. O aumento da temperatura de reação favorece a difusão do substrato e produtos, levando a um aumento na percentagem de conversão.<sup>7</sup>

A **Figura 29** apresenta os valores de percentagem de conversão em função do tempo de reação para as enzimas CCL e PSL, imobilizadas em PEO a 25 e 35 °C.

Resultados semelhantes foram observados para a CCL imobilizada em resinas de poli(éster acrílico). A enzima possui atividade máxima a 40 °C para reações de esterificação do ácido oleico com n-propanol em solventes orgânicos.<sup>55</sup>



**Figura 28.** Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do tempo de reação a 25 °C, utilizando-se os suportes: (A) PEO/CCL e (B) PEO/PSL; [enzima]: (■) 100 mg g<sup>-1</sup> e (●) 120 mg g<sup>-1</sup>; solvente: n-hexano.



**Figura 29.** Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do tempo de reação a (■) 25 °C e (●) 35 °C, utilizando-se os suportes: (A) PEO/CCL e (B) PEO/PSL; [enzima]: 120 mg g<sup>-1</sup>; solvente: n-hexano.

A seguir, avaliou-se o efeito do meio reacional ou seja o solvente orgânico utilizado na reação de esterificação padrão (Equação 2) a 25 e 35 °C, para os suportes PEO/CCL e PEO/PSL. Estes resultados estão apresentados na Tabela 10 e Figuras 30 e 31.

Na Figura 30, observou-se um aumento na conversão em éster com o aumento do tempo de reação para os solventes apolares n-hexano, n-heptano e cicloexano, para as reações catalisadas pela CCL e PSL imobilizadas em PEO.

Para o suporte PEO/CCL os ésteres foram obtidos com boa conversão (>80%), quando os solventes externos utilizados foram n-hexano, n-heptano e cicloexano. Porém ao utilizar acetona, um solvente bastante polar ( $\log P = -0,23$ ) não ocorreu a formação do produto. Solventes polares provavelmente levam a modificações na estrutura da enzima, diminuindo assim a sua atividade catalítica.<sup>25</sup>

Os ésteres foram obtidos com grau de conversões superiores a 95 % utilizando o suporte PEO/PSL e n-hexano, n-heptano e cicloexano como solventes externos. Em acetona ocorreu a formação do produto com percentagem de conversão em éster inferior a 20 %. Este resultado também é esperado considerando-se a alta polaridade do meio que pode desnaturar a enzima.<sup>27</sup>

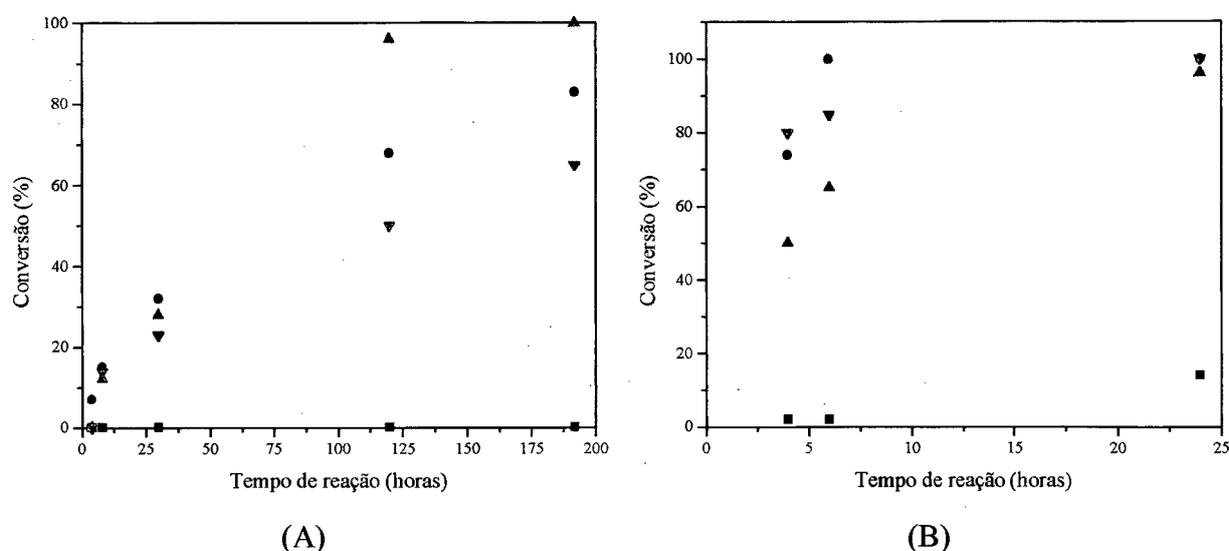
Os resultados obtidos foram bastante coerentes com outros trabalhos descritos na literatura que demonstraram que os melhores solventes orgânicos, para serem usados em biocatálise são os apolares, refletidos pelos valores de  $\log P$ .<sup>3, 26, 28</sup>

**Tabela 10.** Resultados de percentagem de conversão para a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisadas por CCL e PSL imobilizadas em PEO em diferentes solventes orgânicos, a 25 e 35 °C.

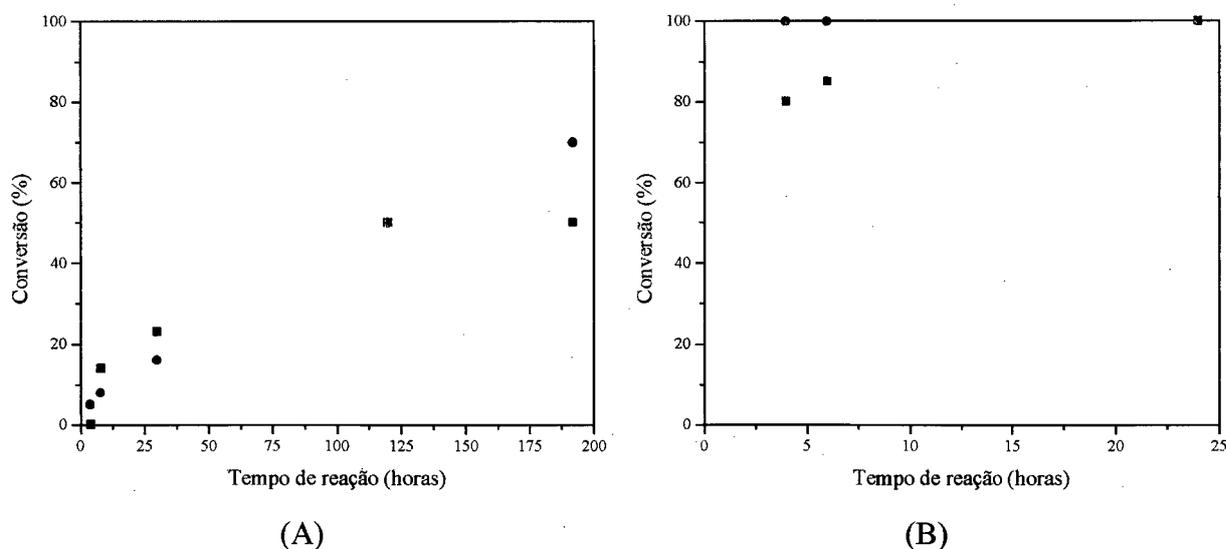
Tempo de Reação (horas) PEO/CCL	Conversão <sup>a</sup> (%), 25/35°C			
	Acetona $\log P^b = -0,23$	Cicloexano $\log P = 3,20$	Hexano $\log P = 3,50$	Heptano $\log P = 4,0$
4	0/ nd	7/3	0/0	0/5
8	0/ nd	15/8	12/20	14/8
30	0/ nd	32/24	28/48	23/16
120	0/ nd	68/41	96/98	50/50
192	0/ nd	83/100	100/100	65/70
PEO/PSL				
4	2/nd	74/94	50/73	80/100
6	2/nd	100/100	65/87	85/100
24	14/nd	100/100	96/100	100/100

a: obtida por RMN <sup>1</sup>H, b: ref. 25, [enzima]: 120 mg g<sup>-1</sup>, P: polaridade do solvente, nd: não determinado

Na **Figura 31**, observa-se a variação da percentagem de conversão em éster em função do tempo de reação utilizando-se a CCL e PSL imobilizadas em PEO. A reação de esterificação padrão foi realizada a 25 e 35 °C, utilizando-se como solvente externo n-heptano. Estes resultados são concordantes com os anteriores onde verifica-se que a 35 °C, obtêm-se as melhores percentagens de conversão em éster, evidenciando a importância do ajuste de condições experimentais para uma catálise mas efetiva.



**Figura 30.** Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do tempo de reação a 25°C, utilizando-se os suportes: **(A)** PEO/CCL e **(B)** PEO/PSL; [enzima]: 120 mg g<sup>-1</sup>; solventes utilizados: (■) acetona, (●) cicloexano, (▲) n-hexano e (▼) n-heptano.



**Figura 31.** Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do tempo de reação a (■) 25 °C e (●) 35 °C, utilizando-se os suportes: **(A)** PEO/CCL e **(B)** PEO/PSL; [enzima]: 120 mg g<sup>-1</sup>; solvente: n-heptano.

### 3.3.2. Reutilização dos suportes PEO/CCL e PEO/PSL

A reutilização do biocatalisador é um fator importante quando considera-se a aplicação prática de um determinado método sintético, especialmente quando o catalisador é de alto custo. Para os dois suportes a reação de reutilização estudada foi a esterificação padrão (**Equação 2**) e a mesma foi realizada a 25 e 35 °C, em n-hexano, sendo a concentração do biocatalisador de 120 mg g<sup>-1</sup>. Entre as reutilizações os suportes foram estocados em n-hexano a temperatura ambiente.

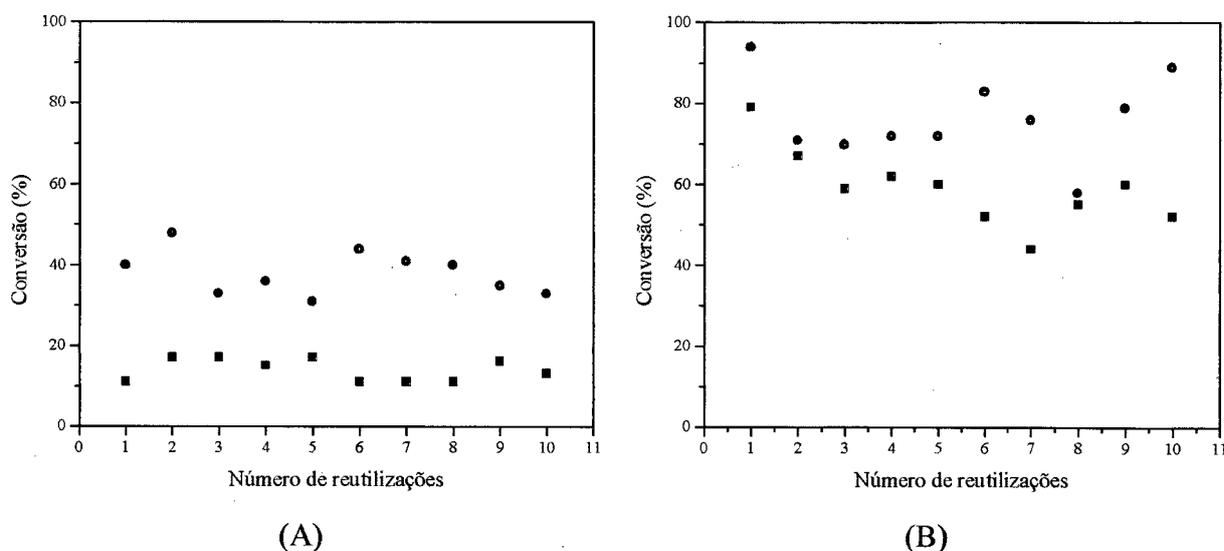
A **Figura 32** apresenta os valores de percentagens de conversão em éster em função do número de reutilizações, para os suportes PEO/CCL e PEO/PSL.

Utilizando-se o suporte PEO/CCL, a percentagem de conversão em éster manteve-se na faixa de 11-17 % à 25 °C, e na faixa de 18-48 % à 35 °C. Para o suporte PEO/PSL na faixa de 44-79 % à 25 °C, e na faixa de 58-94 % à 35 °C. Esta variação na percentagem de conversão provavelmente foi devido a presença de reagentes remanescentes e produto no suporte polimérico e também devido a diminuição da atividade enzimática após estocagem e reutilização em solventes orgânicos.

Na **Figura 32**, observa-se que a atividade enzimática foi conservada após sucessivas reutilizações. Além disto não foram observadas mudanças na aparência física do suporte (polímero) durante o período total do experimento (~ 120 dias).

A reutilização dos suportes pode ser realizada com reagentes diferentes, pois sucessivas lavagens com o solvente orgânico retiram todo o produto e reagentes remanescentes do suporte.

Rezende e col. imobilizaram CCL em crisotila. As reações de reutilização foram realizadas com diversos ácidos e álcoois de cadeia alifática. Após dez reutilizações os produtos foram obtidos com rendimentos na faixa de 80-100%, dependendo do ácido e álcool utilizados no experimento.<sup>71</sup>



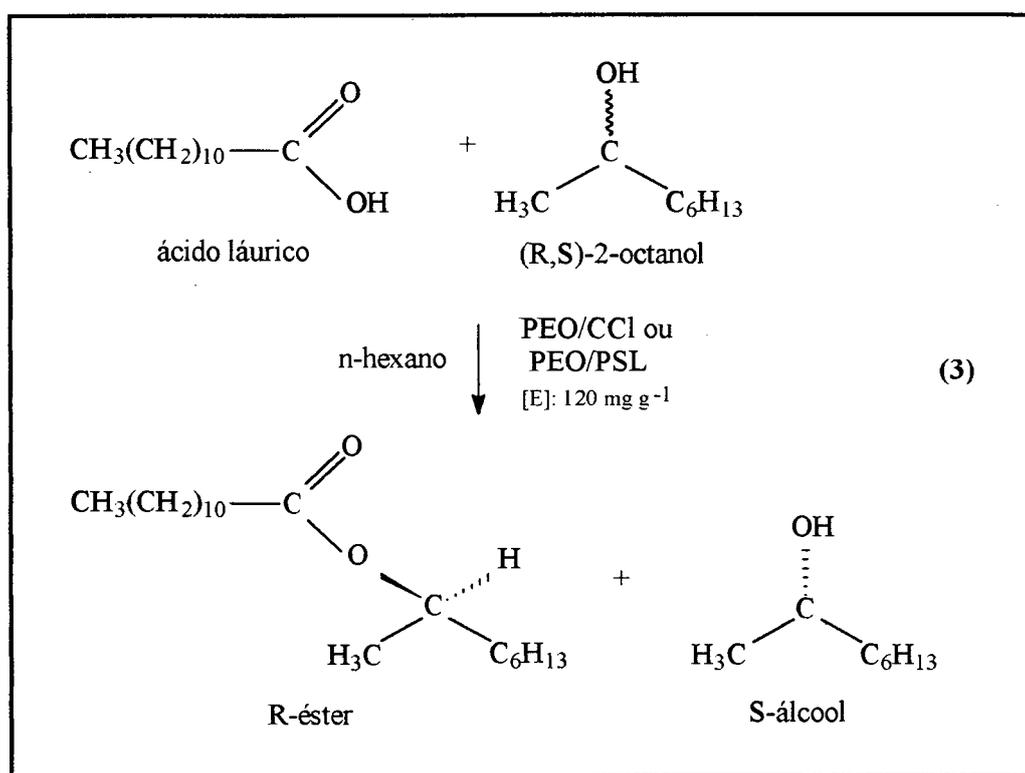
**Figura 32.** Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação padrão em função do número de reutilizações a (■) 25 °C e (○) 35 °C, utilizando-se os suportes: (A) PEO/CCL e (B) PEO/PSL; [enzima]: 120 mg g<sup>-1</sup>; solvente: n-hexano; tempo de reação: 8 horas.

Duri e col. estudaram a imobilização da lipase de *Pseudomonas sp.* em poli(estireno). Após oito reutilizações a enzima manteve sua atividade catalítica.<sup>8</sup> Isto indica que é possível a imobilização de enzimas em suportes poliméricos, com sua posterior reutilização. A lipase de *Candida Antarctica* imobilizada em resina XAD-7 (poli(éster acrílico)), manteve sua atividade catalítica após seis reutilizações.<sup>51</sup>

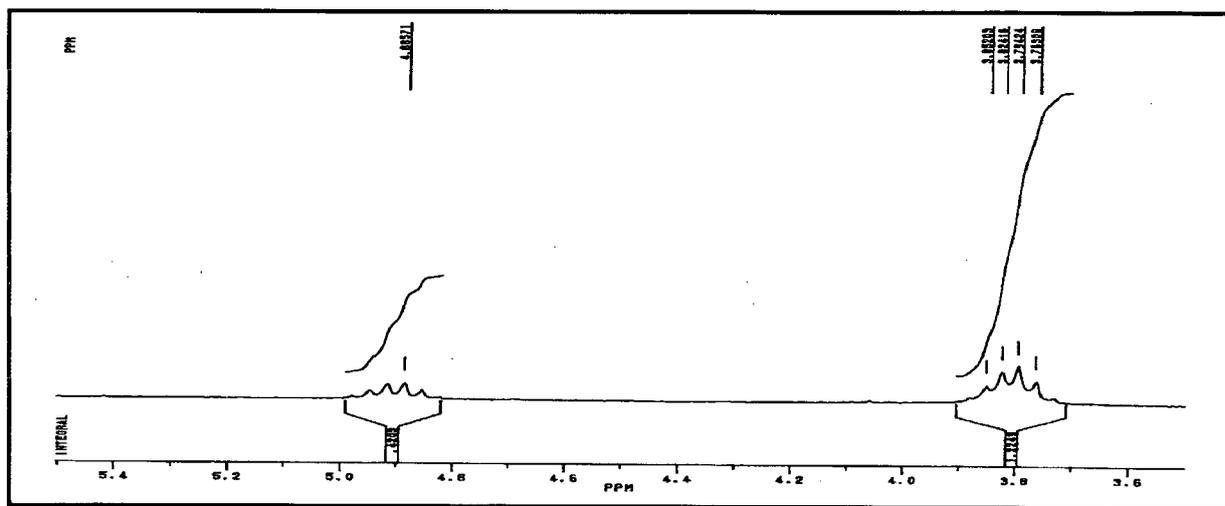
O produto obtido (laurato de n-pentila) neste, e em outros experimentos foi caracterizado por IV e RMN <sup>1</sup>H. Os espectros estão apresentados no item 3.5 (caracterização dos produtos). A pureza, em todos os experimentos, foi confirmada por ccd (Rf = 0,70, hexano:acetato de etila (15:1)).

### 3.3.4. Aplicação dos Suportes PEO/CCL e PEO/PSL para a Resolução Enantiosseletiva do (R, S)-2-octanol

A reação de esterificação enantiosseletiva do (R,S)-2-octanol com ácido láurico foi realizada em n-hexano, a 25 e 35 °C utilizando-se como catalisadores as enzimas CCL e PSL imobilizadas em PEO (**Equação 3**). O R-éster foi submetido a hidrólise alcalina para a obtenção do R-álcool (**Esquema III**, parte experimental).

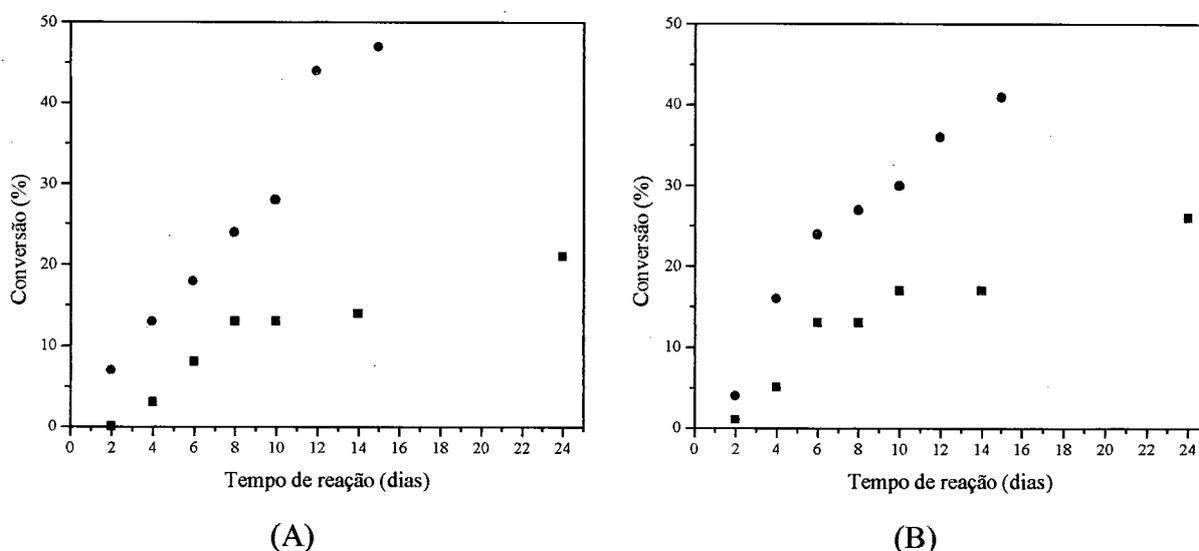


A percentagem de conversão em éster foi determinada quantitativamente, através da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ . O cálculo da percentagem de conversão foi estimado pela comparação dos deslocamentos químicos dos prótons do álcool e do éster. Para o 2-octanol e o laurato de 2-octila são observados multipletes em 3.80 (1H, CHOH) e 4.88 ppm (1H, HCO), respectivamente (**Figura 33**).



**Figura 33.** Região ampliada do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o 2-octanol e laurato de 2-octila, evidenciando os prótons utilizados para a determinação da percentagem de conversão em éster.

A **Figura 34** apresenta as percentagens de conversões em éster obtidas a 25 e 35 °C, em função do tempo de reação para os suportes PEO/CCL e PEO/PSL. Conforme previsto para os dois suportes observou-se uma maior percentagem de conversão com o aumento do tempo e temperatura de reação.



**Figura 34.** Percentagem de conversão em éster para a reação de esterificação enantiosseletiva em função do tempo de reação a (■) 25 °C e (●) 35 °C, utilizando-se os suportes: (A) PEO/CCL e (B) PEO/PSL; [enzima]: 120 mg g $^{-1}$ ; solvente: n-hexano.

A **Tabela 11**, apresenta as percentagens de conversão obtidas, bem como os valores de rotação óptica do R-éster, álcool reativo e álcool não reativo obtidos utilizando-se CCL e PSL imobilizadas em PEO.

**Tabela 11.** Medidas de rotação óptica do éster, álcoois reativo e não reativo para a reação de esterificação enantiosseletiva catalisada pela CCL e PSL, imobilizadas em PEO.

Suporte	Conversão <sup>a</sup> (%)		$[\alpha]_D^{17}$ R-éster		$[\alpha]_D^{17}$ R-álcool reativo		$[\alpha]_D^{17}$ S-álcool não reativo	
	25 °C <sup>b</sup>	35 °C <sup>c</sup>	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
PEO/CCL	21	47	-6,1	-2,5	-8,5	-3,7	+2,4	+2,0
PEO/PSL	26	41	-7,3	-6,3	-9,7	-8,6	+0,9	+4,9

a: obtida por RMN <sup>1</sup>H, [enzima]: 120 mg g<sup>-1</sup>, solvente: n-hexano, tempo de reação b: 24 dias e c: 15 dias

A CCL e a PSL imobilizadas em PEO mostraram preferência na reação de esterificação pelo enantiômero com rotação óptica negativa ou R.

A **Tabela 12** apresenta os valores de excessos enantioméricos do álcool reativo e álcool não reativo e a razão enantiomérica (Er) obtidos utilizando-se CCL e PSL imobilizadas em PEO, a 25 e 35 °C.

A razão enantiomérica (Er) fornece informações sobre a enantiosseletividade das enzimas para determinados substratos. Quanto maior o valor de Er mais enantiosseletiva é a enzima para o referido substrato.<sup>72</sup>

Para o suporte PEO/CCL os valores de excessos enantioméricos para os produtos foram 86 e 38 % á 25 e 35°C, respectivamente. Estes valores indicam que esta enzima possui uma enantiosseletividade melhor a 25 °C, embora a conversão em produto tenha sido menor do que a 35 °C.

**Tabela 12.** Valores de excesso enantiomérico dos álcoois reativo e não reativo e razão enantiomérica para a reação de esterificação enantiosseletiva catalisada pela CCL e PSL immobilizadas em PEO.

Suporte	$ee_s$ (%) <sup>a</sup>		$ee_p$ (%) <sup>b</sup>		Er <sup>c</sup>	
	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
PEO/CCL	24	20	86	38	16	3
PEO/PSL	9	50	98	88	180	28

a: excesso enantiomérico do álcool não reativo, b: excesso enantiomérico do álcool reativo, a e b: por comparação com dados da ref. 73,  $[\alpha]_D^{17}$  R-(-)-2-octanol = -9,9, c: calculada pela equação  $E = \ln[(1-c).(1-ee_s)]/\ln[(1-c).(1+ee_p)]$  onde  $c = ee_s/ee_s+ee_p$ , das ref. 72 e 74.

Os valores de  $ee_p$  obtidos foram bons comparando-se com os resultados de Shih e col. para a reação de esterificação do 2-butanol com N-Cbz-L-aminoácidos, catalisada pela lipase pancreática do porco (PPL) immobilizada em celite. O valor de ee para o R-éster foi de 28,8%.<sup>49</sup>

A reação de transesterificação do racemato do 2-metil-1-pentanol com acetato de vinila em hexano, foi estudada por Zarevúcka e col.. Utilizando-se a CCL e PPL em suspensão, os (S)-ésteres foram obtidos com ee de 10 e 60%, respectivamente.<sup>50</sup>

Para o suporte PEO/PSL, os  $ee_p$  foram 98 e 88 % à 25 e 35°C, respectivamente. Estes valores novamente indicam que esta enzima foi mais seletiva a 25 °C. Estes valores são semelhantes aos obtidos com a PSL immobilizada em organo-gel, onde o (-)-2-octanol foi obtido com ee de 95%.<sup>39</sup>

Os valores de ee do R-(-)-2-octanol e a razão enantiomérica, indicam que as enzimas CCL e PSL immobilizadas em PEO, foram mais seletivas quando a temperatura da reação foi de 25 °C. A PSL foi o biocatalisador mais seletivo para o substrato (R,S)-2-octanol, obtendo o R-álcool com  $ee_p$  de 98%.

Portanto, estes resultados indicam que os suportes PEO/CCL e PEO/PSL podem ser utilizados para a resolução de álcoois secundários racêmicos, via reação de esterificação direta, em meio orgânico.

Os espectros de IV e RMN  $^1\text{H}$  para os ésteres e álcoois obtidos nesta reação estão apresentados no item 3.5

### 3.5. Caracterização dos Produtos

Abaixo estão relacionados os dados espectroscópicos de IV de RMN  $^1\text{H}$  para os ésteres e álcool obtidos via enzimática.

- laurato de n-pentila: RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{ppm}}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ), 4,05 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{OOC}$ ), 2,29 (t, 2H,  $\text{OOCCH}_2$ ) 0,8-1,7 (m, 30H,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); IV ( $\text{cm}^{-1}$ , filme), 1738 (C=O), 1174 e 1114 (C-O) (**Figuras 35 e 36**).
- laurato de 2-octila: RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{ppm}}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ), 4,9 (q, 1H,  $\text{CHOOC}$ ), 2,4-1,0 (m, 39 H  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); IV ( $\text{cm}^{-1}$ , filme), 1740 (C=O), 1380 e 1200 (C-O) (**Figuras 37 e 38**).
- (-)-2-octanol: RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{ppm}}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ), 3,9 (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 2,2-1,0 (m, 16H,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); IV ( $\text{cm}^{-1}$ , filme), 3348 (OH), 1374 e 1114 (C-O) (**Figuras 39 e 40**).

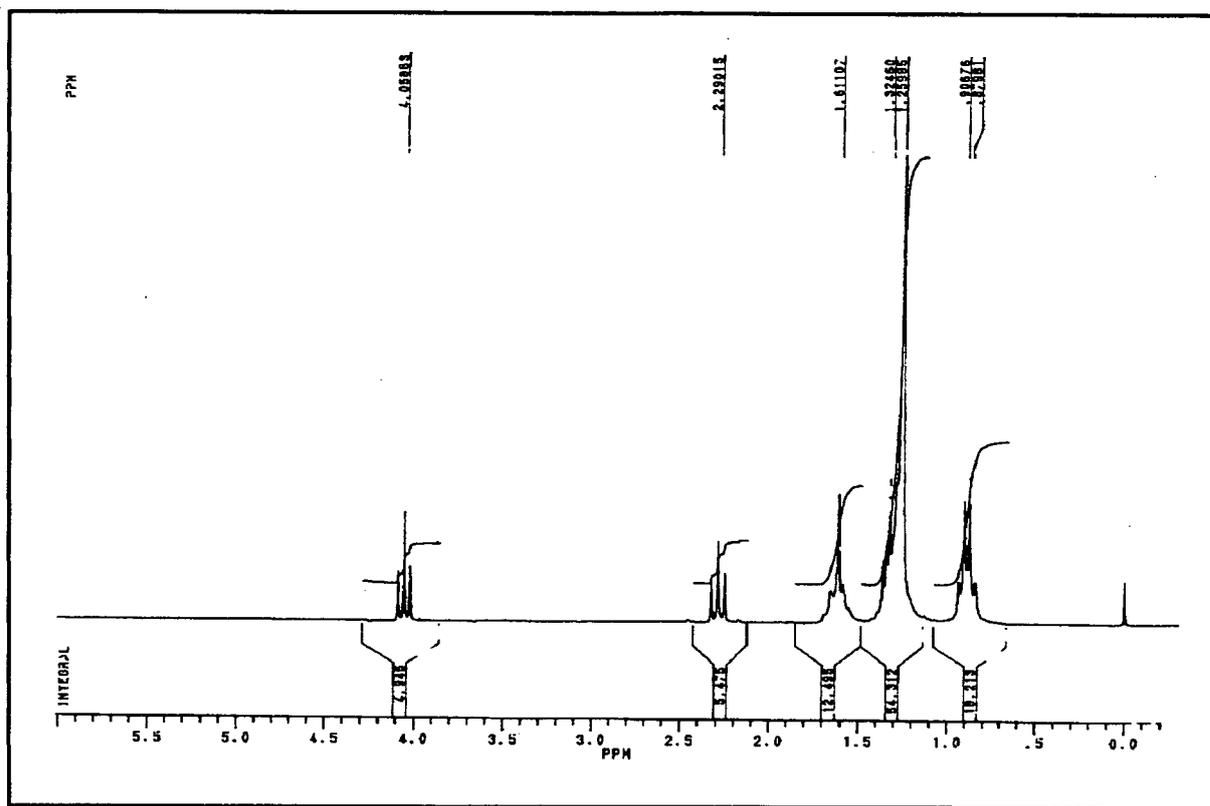


Figura 35. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do laurato de n-pentila, em  $\text{CDCl}_3$ .

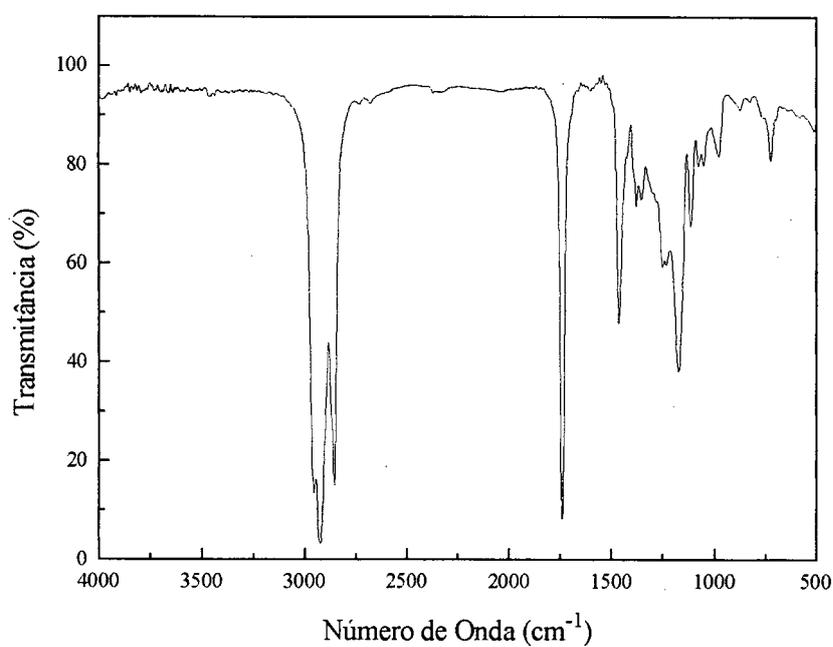


Figura 36. Espectro de IV do laurato de n-pentila (filme).

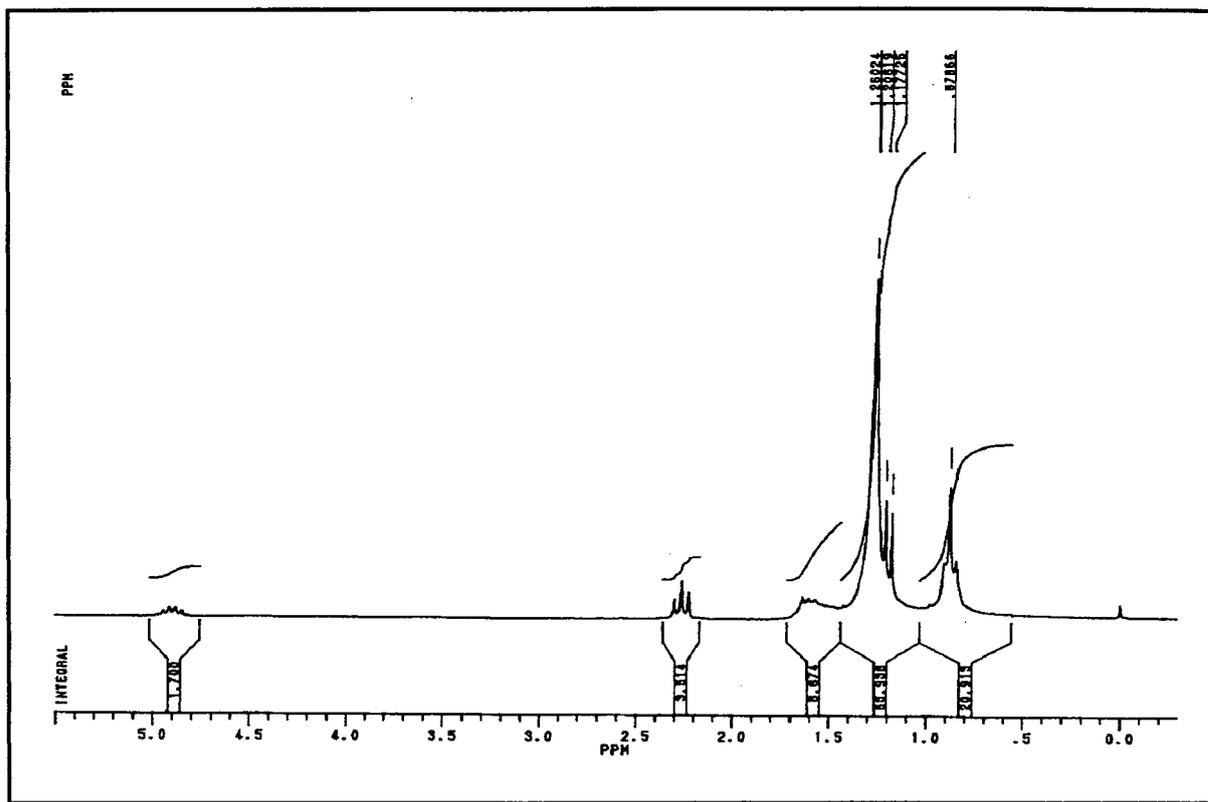


Figura 37. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do laurato de 2-octila, em  $\text{CDCl}_3$ .

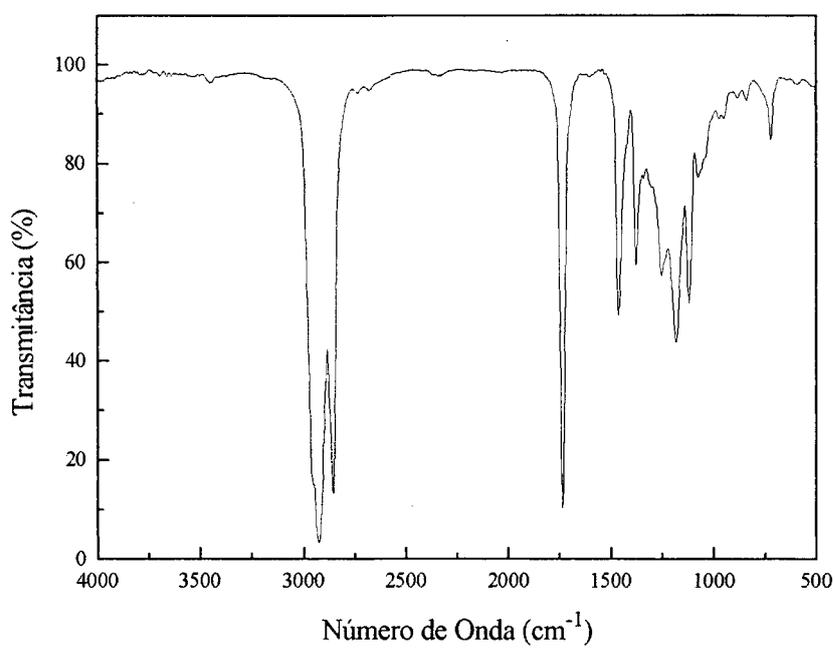


Figura 38. Espectro de IV do laurato de 2-octila (filme).

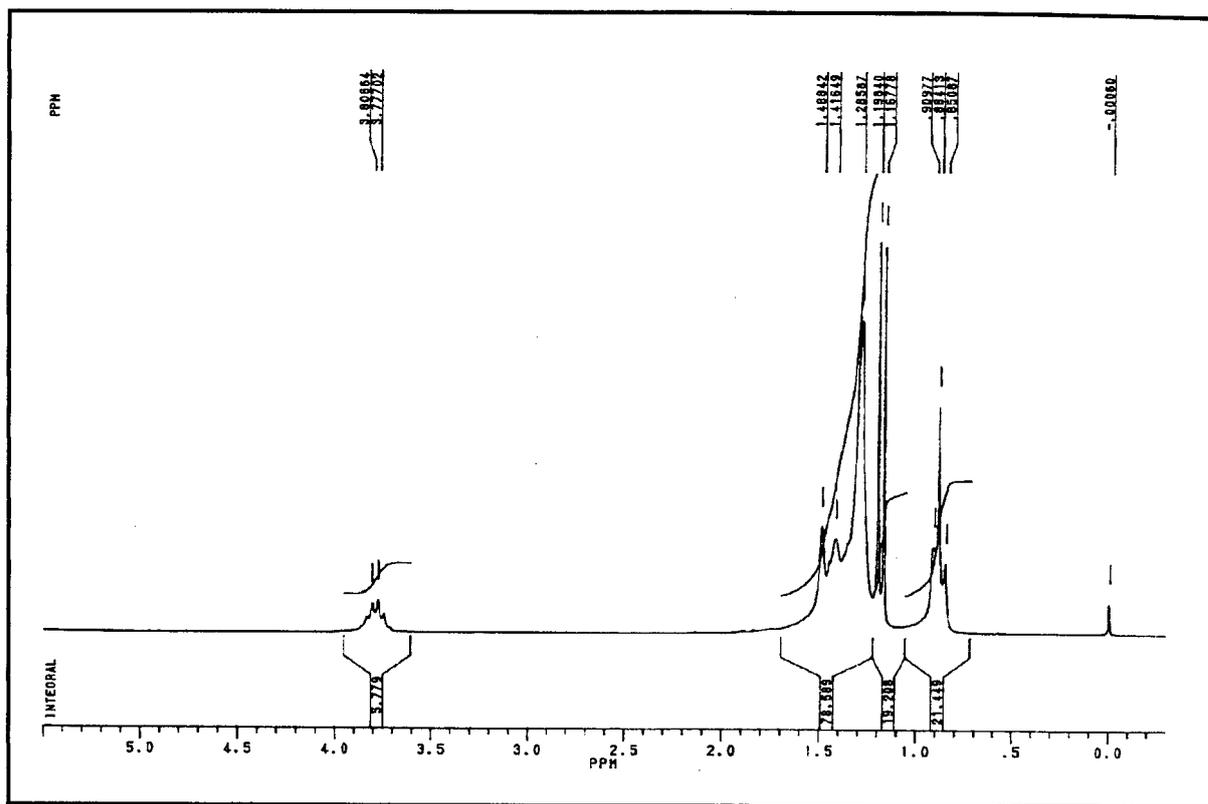


Figura 39. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 2-octanol, em  $\text{CDCl}_3$ .

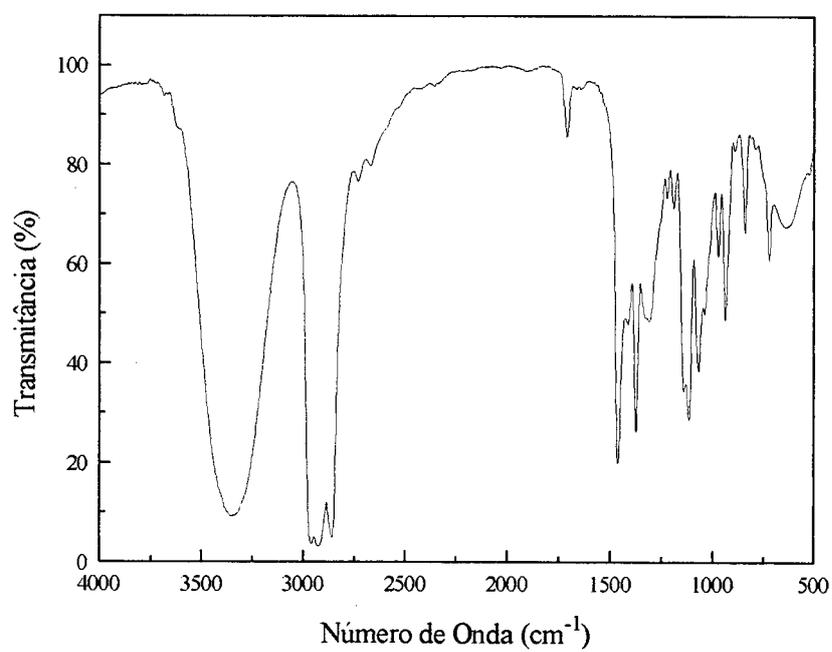


Figura 40. Espectro de IV do 2-octanol (filme).

#### 4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho as principais conclusões são:

- Dados iniciais indicaram que o PEO é o suporte mais favorável para a imobilização de lipases, enquanto que o Carbopol e a blenda PEO/Carbopol necessitam de ajustes no pH na solução polimérica, durante o processo de imobilização;
- O aumento do grau de conversão em éster, após imobilização das enzimas em PEO, indicam que este suporte estabiliza as enzimas CCL e PSL para serem utilizadas em meio orgânico;
- As micrografias dos suportes PEO/CCL e PEO/PSL, mostraram uma completa homogeneidade destes sistema. As enzimas estão localizadas preferencialmente na superfície dos suportes, indicando que nestes sistemas a imobilização foi através de adsorção sobre o suporte polimérico;
- As análises de TG e DSC indicam que ocorreu uma perturbação no equilíbrio térmico das enzimas CCL e PSL, após imobilização em PEO, provavelmente devido a interações entre suporte e enzima. O suporte PEO/PSL adquiriu uma estabilidade térmica maior do que o suporte PEO/CCL;
- O estudo do tempo, temperatura de reação e concentração de enzima para os dois suportes indicam a dependência destes parâmetros na percentagem de conversão em laurato de n-pentila;
- As reações estudadas mostraram-se dependentes do solvente orgânico externo. As melhores percentagens de conversão em éster foram obtidas utilizando-se n-hexano, n-heptano e ciclohexano para os suportes PEO/CCL e PEO/PSL, respectivamente;

- Sucessivas reutilizações dos suportes PEO/CCL e PEO/PSL, indicam que os mesmos podem ser utilizados sem perda considerável da atividade catalítica da CCL e PSL, em até dez experimentos;
- Na reação de esterificação enantiosseletiva do ácido láurico com (R,S)-2-octanol, os melhores resultados foram obtidos utilizando os sistemas PEO/CCL e PEO/PSL a 25 °C, sendo que o R-(-)-2-octanol foi obtido com ee > 86%.

**5. REFERÊNCIAS**

1. MANO, E. B. **Introdução a polímeros**. São Paulo : Edgard Blücher, 1985.
2. MANO, E. B. **Polímeros como materiais de engenharia**. São Paulo : Edgard Blücher, 1991.
3. BASRI, M., YUNUS, W. M. Z. W., YOONG, W. S., AMPON, K., RAZAK, C. N. A., SALLEH, A. B. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 66, p. 169-173, 1996.
4. GRIFFITHS, M. S., BOSLEY, J. A. Assessment of macroporous polystyrene-based polymers for the immobilization of *Citrobacter freundii*. **Enzyme and Microbiol Technol.**, v. 15, p. 109-113, 1993.
5. FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry**. 3. ed. New York : Spring Verlag, 1997.
6. RUCKA, M., TURKIEWICZ, B., ZUK, J. S., Polymeric membranes for lipase immobilization. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 67, n. 12, p. 887-889, 1990.
7. MONTERO, S., BLANCO, A., VIRTO, M. D., LANDETA, L. C., AGUD, I., SOLOZABAL, R., LASCARAY, J. M., DE RENOBALLES, M., LLAMA, M. J., SERRA, J. L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. **Enzyme and Microbiol Technol.**, v. 15, p. 239-247, 1993.
8. AL-DURI, B., YOUNG, Y. P. Characterisation of the equilibrium behavior of lipase PS (from *Pseudomonas*) and Lipolase 100L (from *Humicola*) onto accurel EP100. **J. Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 3, p. 177-188, 1997.

9. BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L., MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbiol Technol.**, v. 18, p. 392-416, 1996.
10. BAGI, K., SIMOM, L. M., SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbiol Technol.**, v. 20, p. 531-535, 1997.
11. BRADY, C., METCALFE, L., SLABOSZEWSKI, D., FRANK, D. Lipase immobilized on a hydrofobic, microporous support for the hydrolysis of fats. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 65, p. 917-921, 1988.
12. ISON, A. P., MACRAE, A. R., SMITH, C. G., BOSLEY, J. Mass transfer effects in solvent-free fat interesterification reactions: influences and catalyst design. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, p. 122-130, 1994.
13. YANG, C. P., SU, C. S., Synthesis of aspartame precursor:  $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in ethyl acetato using thermolisin entrapped in polyurethane. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 32, p. 595-603, 1988.
14. MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A. **Harper-Bioquímica**. 6. ed. São Paulo : Atheneus, 1990.
15. LEHNINGER, A. **Bioquímica**. 2. ed. Rio de Janeiro : Edgard Blücher, 1976.
16. CAMPBELL, M. K. **Biochemistry**. 2. ed. USA : Saunders Publishing College, 1995.
17. LEHNINGER, A., NELSON, D. L., COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 2. ed. New York : Worth Publishers, 1993.
18. Catálogo da Novo Nordisk, A Ação das Enzimas, 1995.

19. JONES, J. B. Enzymes in organic chemistry. **Tetrahedron**, v. 42, p. 3351-3354, 1986.
20. CASTRO, H. F., ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.
21. PALMER, T. **Understanding enzymes**. 4. ed. London : Prentice Hall-Ellis Horwood, 1995.
22. INTERNET: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac>
23. LEHNINGER, A. Bioquímica: componentes moleculares das células. São Paulo : Edgard Blücher, 1976.
24. WONG, C. H., WHITESIDES, G. M. **Enzymes in synthetic organic chemistry**. [s.l.] : Pergamom, 1995. v. 12.
25. LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K., VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 30, p. 81-87, 1987.
26. CARREA, G., OTTOLINA, G., RIVA, S. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. **Tibtechnol.**, v. 13, p. 63-70, 1995.
27. CATONI, E., CERNIA, E., PALOCCI, C. Different aspects of solvent engineering in lipase biocatalysed esterifications. **J. Molecular Catalysis A: chem.**, v. 105, p. 79-86, 1996
28. BRYJAK, J., BACHMANN, K., PAWLÓW, B., MALISZEWSKA, I., TROCHIMCZUK, A., KOLARZ, B. N. Immobilization of lipase on various acrylic copolymers. **Chem. Eng. J.**, v. 65, p. 249-256, 1997.

29. WOOLLEY, P., PETERSEN, S. B. **Lipases their structure, biochemistry and application**. New York : Cambridge University Press, 1994.
30. INTERNET: <http://www.novo.dk>
31. GANDHI, N. N. Applications of lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.
32. BERGLUND, P., HOLMQUIST, M., HULT, K. Reversed enantiopreference of *Candida rugosa* lipase supports different modes of binding enantiomers of a chiral acyl donor. **J. Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 5, n. 1-4, p. 283-287, 1998.
33. CELIA, E. C., CERNIA, E., D'ACQUARICA, I., PALOCCI, C., SORO, S. High yield and optical purity in biocatalysed acylation of trans-2-phenyl-1-cyclohexanol with *Candida rugosa* lipase in non-conventional media. **J. Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 6, n. 5, p. 495-503, 1999.
34. MORENO, J. M., SINISTERRA, J. V. A systematic analysis of the variables that control a highly stereoselective resolution of racemic non-steroidal antiinflammatory drugs using immobilized lipase from *Candida cylindracea*. **J. Molecular Catalysis A: chem.**, v. 98, p. 171-184, 1995.
35. CUI, Y. M., WEI, D. Z., YU, J. T. Lipase-catalyzed esterification in organic solvent to resolve racemic naproxen. **Biotechnol. Letters**, v. 19, n. 9, p. 865-868, 1997.
36. XU, H., LI, M., HE, B. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on methyl acrylate-divinyl benzene copolymer and its derivatives. **Enzyme and Microbiol Technol.**, v. 17, p. 194-199, 1995.

37. AKOH, C. C., YEE, L. N. Lipase-catalysed transesterification of primary alcohols with vinyl esters in organic media. **J. Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 4, n. 3, p. 149-153, 1998.
38. STAMATIS, H., XENAKIS, A. Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase. **J. Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 6, n. 4, p. 399-406, 1999.
39. JESUS, P. C., REZENDE, M. C., NASCIMENTO, M. G. Enzymatic resolution of alcohols via lipases immobilized in microemulsion-based gels. **Tetrahedron Assimetry**, v. 6, n. 1, p. 63-66, 1995.
40. IVANOV, A. E., SCHNEIDER, M. P. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. **J. Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 3, p. 303-309, 1997.
41. EMI, S., MURASE, Y., HAYASHI, T. Lipoprotein lipase immobilization onto copoly (ethylene/acrylic acid) fiber. **Eur. Polym. J.**, v. 30, n. 5, p. 589-595, 1994.
42. YANG, F., WEBER, T. W., GAINER, J. L., CARTA, G. Synthesis of lovastatin with immobilized *Candida rugosa* lipase in organic solvents: effects of reaction conditions on initial rates. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 56, n. 6, p. 671-680, 1997.
43. 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, thiirane, aziridine, and glyceraldehyde 3-phosphate. **J. Org. Chem.**, v. 55, p. 4897-4901, 1990.
44. HSU, S. H., WU, S. S., WANG, Y. F., WONG, C. H. Lipase-catalysed irreversible transesterification using enol ester: XAD-8 immobilized lipoprotein lipase-catalysed resolution of secondary alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 44, p. 6403-6406, 1990.

45. BIANGHI, D., CESTI, P., BATTISTEL, E. Anhydrides as acylating agents in lipase-catalysed stereoselective esterification of racemic alcohols. **J. Org. Chem.**, v. 53, p. 5531-5534, 1988.
46. NASCIMENTO, M. G., REZENDE, M. C., VECCHIA, R. D., JESUS, P. C., AGUIAR, L. M. Z. Enzyme-catalysed esterification in microemulsion-based organo gels. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 5891-5894, 1992.
47. KLIBANOV, A. M. Assymetric transformation catalysed by enzymes in organic solvents. **Acc. Chem. Res.**, v. 23, p. 114-120, 1990.
48. PARKER, D. NMR Determination of enantiomeric purity. **Chem. Rev.**, v. 91, p. 1441-1457, 1991.
49. SHIH, I. L., CHIU, L. C., LAI, C. T., LIAW, W. C., TAI, D. F. Enzymes catalysed esterification of N-protected amino acids with secondary alcohols. **Biotechnol. Letters**, v. 19, n. 9, p. 857-859, 1997.
50. ZAREVUCKA, M., REJZEK, M., HOSKOVEC, M., SVATOS, A., WIMMER, Z., KOUTEK, B., LEGOY, M. D. Initial rate content and lipase-mediated ester formation in hexane. **Biotechnol. Letters**, v. 19, n. 8, p. 745-750, 1997.
51. CAO, L., BORNSCHEUER, U. T., SCHMID, R. D. Lipase-catalysed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. **J. Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, n. 3-4, p. 279-285, 1999.
52. QUEIROZ, N. Aplicações Sintéticas de Enzimas Imobilizadas em Organo-Gel e Gel de Ágar. Florianópolis, 1997. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

53. MURRAY, M., ROONEY, M., NEIKERK, M. V., MONTENEGRO, A., WEATHERLEY, L. R. Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. **Process Biochem.**, v. 32, n. 6, p. 479-486, 1997.
54. YUNUS, W. M. Z. W., SALLEH, A. B., BASRI, M., AMPON, K., RAZAK, C. N. A. Preparation and immobilization of lipase on to poly(methyl acrylate-methyl methacrylate-divinylbenzene) beads for lipid hydrolysis. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 24, p. 19-23, 1996.
55. BASRI, M., AMPON, K., YUNUS, W. M. Z. W., RAZAK, C. N. A., SALLEH, A. B. Immobilization of hydrofobic lipase derivatives on to organic polymer beads. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 59, p. 37-44, 1994.
56. TALON, R., MONTEN, M. C., BERDAGUE, J. L. Production of flavors esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. **Enzyme and Microbiol Technol.**, v.19, p. 620-622, 1996.
57. JOÃO, J. J. Determinação do Coeficiente de Difusão de Ésteres e Reações de Transesterificação Catalisadas por Enzimas Imobilizadas em Organo-gel. Florianópolis, 1994. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
58. JESUS, P. C. Resolução de Álcoois Secundários Quirais Através da Esterificação Catalisada por Enzima Imobilizada em Organo-Gel. Florianópolis, 1994. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

59. WENDHAUSEN, R. Jr., MORAN, P. J. S., JOEKES, I., RODRIGUES, J. A. R. Continues process for large-scale preparation of chiral alcohols with baker's yeast immobilized on crysotile fibers. **J. Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n.1-4, p. 69-73, 1998.
60. JESUS, P. C. Enzimas Imobilizadas em Crisotila e Organo-Gel: Aplicação na Resolução de Ácidos Racêmicos. Florianópolis, 1998. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
61. FREGONESI, A. A. Adesão de Células de *Saccharomyces sp.* em Materiais Inorgânicos para a Produção de Etanol. Campinas, 1998. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós- Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas.
62. MORRISON, J. D. **Assymetric synthesis : analytical methods**. Academic Press : Florida, 1983.
63. GENTILI, A., CURINI, R., CERNIA, E., ASCENZO, G. D. Thermal stability and activity of *Candida cylindracea* lipase. **J. Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, p. 43-49, 1997.
64. ZOUNGRANA, T., NORDE, W. Thermal stability and enzymatic activity of  $\alpha$ -chymotrypsin adsorbed on polystyrene surfaces. **Colloides and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 9, p. 157-167, 1997.
65. JOEKES, I., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., WENDHAUSEN, R., TONELLA, E., CASSIOLA, F. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized onto crysotile for ethanol production. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 73, p. 54-58, 1998.

66. MIGUEZ, M. J. B. Sistema de Microencapsulação de Urease em Quitosana e PVA: Reatividade e Aplicações. Florianópolis, 1997. Tese (Doutorado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
67. INTERNET: <http://www.sigma.sial.com>.
68. Ficha técnica da palatase M, lipolase e lipozyme, fornecida pela Novo Nordisk.
69. Ficha técnica das lipases A, F, AY, M e PS, fornecida pela Amano S/A.
70. VECHHIA, R. D. Síntese de Ésteres Alifáticos Catalisada pela CV Lipase Imobilizada em Microemulsão Água-Óleo em Sistema Organo-Gel. Florianópolis, 1994. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
71. LIMA, C., SILVA, P. L. F., NASCIMENTO, M. G., REZENDE, M. C. The use of immobilized lipases on chrysotile for esterification reactions. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 7, n. 3, p. 173-175, 1996.
72. CHEN, C. S., FUJIMOTO, Y., GIRDAUKAS, G., SIH, C. J. Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 104, p. 7294-7296, 1982.
73. **DICTIONARY of Organic Compounds**. 5. ed. Chapman and Hall : New York, 1982. p. 4381-4382.
74. CHEN, C. S., WU, S. H., GIRDAUKAS, G., SIH, C. J. Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. 2-enzymes-catalyzed esterifications in water-organic solvents biphasic systems. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 109, p. 2812-2816, 1987.

**6. Anexos-Produção Acadêmica 1998-1999****6.1. Cursos Realizados****1999**

- Princípios Básicos de Filtração e suas Aplicações, Florianópolis, 15 jul.
- Purificação de Água para Laboratório, Florianópolis, 15 jul.
- Mini-Curso de Biologia Molecular Estrutural, Campinas, 27-30 jul.

**6.2. Participação em Eventos****1998**

- 21<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 25-28 mai.
- 14<sup>th</sup> International Conference on Physical Organic Chemistry and 4<sup>th</sup> Latin American Conference on Physical Organic Chemistry, Florianópolis, 16-21 ago.
- VIII International Macromolecular Colloquium, Canela, 07-10 set.
- VI Encontro de Química da Região Sul, Maringá, 04-06 nov.
- VIII Seminário Catarinense de Iniciação Científica, Florianópolis, 12-13 nov.

### 6.3. Trabalhos Apresentados em Colóquios, Conferências, Congressos, Encontros e Seminários

1998

- Crespo, J. S.; Nascimento, M. G.; Queiroz, N.; Soldi, V.; Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros e Blendas Poliméricas. 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 25-28 mai. (QO-026)
- Crespo, J. S.; Soldi, V.; Kanis, L. A.; Viel, F. C.; Pires, A. T. N.; Nascimento, M. G.; Poly(ethyleneoxide)/Carbopol Blends: Crystallization, Morphology and Enzyme Immobilization. VIII International Macromolecular Colloquium, Canela, 07-10 set.
- Crespo, J. S.; Bortolanza, T. R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; Imobilização de Lipases em Poli(oxietileno). VI Encontro de Química da Região Sul, Maringá, 04-06 nov. (FQ-015)
- Crespo, J. S.; Bortolanza, T. R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; Imobilização de Lipases em Poli(oxietileno). VIII Seminário Catarinense de Iniciação Científica, Florianópolis, 12-13 nov.

1999

- Crespo, J. S.; Nascimento, M. G.; Bortolanza, T. R.; Soldi, V.; Atividade de Lipases Imobilizadas em Materiais Poliméricos e Análises Morfológicas. 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 25-28 mai. (QO-017)

#### 6.4. Trabalhos Submetidos e Aceitos em Congressos

1999

- Crespo, J. S.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; Synthetic Applications of Immobilized Lipases on Poly (ethylene oxide). Biotrans 99-4<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, Itália, 26 set-1 out.
- Crespo, J. S.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; Utilização de poli(óxido de etileno) para a Imobilização de Lipases, ABPOL 99, Águas de Lindóia, 17-20 out.

#### 6.5. Publicações

- BARRA, G. M. O., CRESPO, J. S., BERTOLINO, J. R., SOLDI, V., PIRES, A. T. N. Maleic Anhydride Grafting on EPDM : Qualitative and Quantitative Determination. **J. Braz. Chem. Soc.**, p. 10, n. 1, p. 31-34, 1999.
- KANIS, L. A., VIEL, F. C., CRESPO, J. S., BERTOLINO, J. R., PIRES, A. T. N. SOLDI, V. Study of Poly (ethylene oxide)/Carbopol Blends Through Thermal Analysis and Infrared Spectroscopy. **Polymer**, (in press).