

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

**ESTUDOS DE REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO COM
LIPASES IMOBILIZADAS E DETERMINAÇÃO DE
COEFICIENTE DE DIFUSÃO DE ÉSTERES EM ORGANO-
GEL**

*TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SANTA CATARINA COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
QUÍMICA.*

JAIR JUAREZ JOÃO

ORIENTADORA: MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO

FLORIANÓPOLIS - BRASIL

ABRIL DE 1999

**“ESTUDOS DE REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO COM
LIPASES IMOBILIZADAS E DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTE
DE DIFUSÃO DE ÉSTERES EM ORGANO-GEL”**

JAIR JUAREZ JOÃO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do grau de Doutor em Química, e aprovada em sua forma final pela orientadora e demais membros da banca examinadora.

M. Graça Nascimento.
Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Nascimento
Orientadora

Valdir Soldi
Prof. Dr. Valdir Soldi
Coordenador

Banca Examinadora:

Aurea Echevarria Aznar
Prof.^a Dr.^a Aurea Echevarria Aznar
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

Valentim Emilio Uberti Costa
Prof. Dr. Valentim Emilio Uberti Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Miguel Soriano Balparda Caro
Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Maria Marta de Souza Sierra
Prof. Dr.^a Maria Marta de Souza Sierra
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Luiz Augusto J. Madureira
Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

“No reino da observação científica, a sorte só é concedida aos que estão preparados”.

Louis Pasteur

Ao meu filho
Axiel Júnio João

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Dr^a. Maria da Graça Nascimento pela dedicação e pela amizade durante a orientação deste trabalho.

Aos colegas e companheiros de laboratório Vanderlei, Milton, Donizete, Pedro, Giovani, Elisa, Neide, Sandra, Flávia, Chies, Tais, Janaina e Clodoaldo pela contribuição e amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

Um agradecimento especial ao Paulo César de Jesus, pela amizade adquirida ao longo desta jornada.

Agradeço ainda ao Renato, Arilson, Alex, Jacir, e demais amigos e colegas que de alguma forma contribuíram pela minha passagem na UFSC.

Ao professor Miguel B. Caro e a técnica Vanilde F. Geronimo pela ajuda nas análises de RMN¹H.

Aos demais funcionários do Departamento de Química pela contribuição no decorrer deste trabalho.

Agradeço aos demais professores e funcionários pela amizade e colaboração no decorrer deste trabalho.

Agradeço a professora Maria Carminati Lima, ao Técnico Vicente e a bolsista Cristina Santos de Sousa da UNISUL pela amizade e colaboração no decorrer deste trabalho.

Agradeço a Lucimar e ao meu filho Axiel pelo companheirismo e amizade durante estes quatro anos.

Aos meus pais.

A UFSC, CAPES, CNPq pelo apoio financeiro e facilidades concedidas.

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

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Justificativa do Trabalho.....	01
1.2 Enzimas e suas Aplicações	03
1.2.1 Definição de Enzimas.....	03
1.2.2 Especificidade das Enzimas.....	05
1.2.3 Algumas Considerações Mecanísticas das Enzimas.....	06
1.3.3.1 Mecanismo de Ação.....	06
1.2.4 Aplicações de Enzimas em Síntese Orgânica.....	12
1.2.5 Lipases em Síntese Orgânica.....	14
1.2.6 Sítio Ativo das Lipases.....	18
1.2.7 Imobilização de Enzimas.....	20
1.3 Quiralidade e Atividade Biológica.....	26
1.4 Determinação da Enantiosseletividade das Enzimas.....	28
1.5 Métodos Analíticos Aplicados na Determinação do Excesso Enantiomérico de Compostos Opticamente Ativos	30
1.6 Difusão.....	32
1.6.1 Definição de Difusão.....	32
1.6.2 Liberação de Drogas em Sistema Biológico Controlados por Difusão.....	32
1.6.3 Determinação do Coeficiente de Difusão.....	34
1.7 OBJETIVOS	35
1.7.1 Objetivo Geral	35
1.7.2 Objetivo Específico.....	35

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL	37
2.1 Materiais e Métodos	37
2.2 Caracterização dos Compostos	37
2.3 Enzimas Imobilizadas em Organo-Gel.....	38
2.3.1 Preparação do Organo-Gel	38
2.3.2 Preparação do Meio Reacional	49
2.4 Estudos Cinéticos.....	42
2.5 Medidas de Coeficiente de Difusão.....	43
2.5.1 Preparação da Coluna de Difusão.....	44
2.5.2 Medidas Experimentais de Coeficientes de Difusão em Organo-gel.....	45
2.6 Preparação dos Benzoatos de Alquilas.....	48

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
3.1 Estudo Cinético Via Reações de Transesterificação Utilizando Enzimas Imobilizadas em MBG.....	50
3.1.1 Reações de Transesterificação - Medidas Cinéticas.....	51
3.1.2 Efeito da Temperatura na Reação do Laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol e (±)-2-hexanol - Determinação de Parâmetros Termodinâmicos.....	56
3.2 Resolução de Álcoois Secundários Racêmicos Via Reações de Transesterificação.....	65

3.3 Atividade de Diferentes Lipases Imobilizadas em MBG em Reações de Transesterificação.....	79
3.4 Determinação do Coeficiente de Difusão.....	90
3.4.1 Identificação e Caracterização dos Benzoatos de Alquilas.....	90
3.4.2 Determinação do Coeficiente de Difusão de Benzoatos de Alquilas em Organo-gel.....	93
3.4.3 Efeito do Solvente na Composição do Organo-gel.....	97
3.4.4 Medidas de Coeficiente de Difusão dos Alcanoatos de p-nitrofenila em Organo-gel de Hexano.....	101
3.4.4.1 Efeito da Temperatura na Difusão do Laurato de p-nitrofenila.....	105

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÕES	110
----------------------------	------------

CAPÍTULO V

5. Referências Bibliográficas	113
--	------------

ANEXOS

Produção Acadêmica nos Anos 1995 - 1998

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional da <i>lisozima</i>	04
Figura 2 - Representação esquemática para a formação do complexo enzima-substrato.....	07
Figura 3 - Representação da formação de um complexo ES segundo a hipótese do modelo de Fischer.....	08
Figura 4 - Representação de encaixe induzido por uma alteração da proteína (segundo Koshland).....	09
Figura 5 - Diagrama de energia de reação catalisada vs não catalisada enzimaticamente.....	10
Figura 6 - Diagrama de energia para uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima.....	12
Figura 7 - Algumas possibilidades de transformações orgânicas utilizando catálise enzimática.....	14
Figura 8 - Estrutura do sítio ativo da lipase da <i>Mucor Miehei</i> na presença do N-hexilclorofosfonato de etila.....	19
Figura 9 - Técnicas de imobilização de enzimas.....	21

Figura 10 - Diagrama de fases para sistemas água/óleo/surfactante.....	23
Figura 11 - Modelo proposto para a estrutura do organo-gel.....	25
Figura 12 - Preparação do organo-gel.....	39
Figura 13 - Preparação do meio reacional do sistema organo-gel.....	40
Figura 14 - Sistema de organo-gel (MBG) utilizado para realizar as reações de transesterificação.....	41
Figura 15 - Dubnoff TE 093 da Tecnal termostatizado, utilizado nas reações de Transesterificação.....	42
Figura 16 - Tubo de vidro utilizado nas medidas experimentais do coeficiente de difusão dos alcenoatos de p-nitrofenila em organo-gel a 25 ⁰ C.....	44
Figura 17 - Procedimento experimental utilizado para as medidas dos coeficientes de difusão dos ésteres em organo-gel.....	47
Figura 18 - Variação de k_{obs} em função da temperatura para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol.....	58
Figura 19 - Variação de k_{obs} em função da temperatura para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-hexanol.....	59

- Figura 20** - Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ versus $1/T$ para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-octanol, solvente acetonitrila e temperaturas de 20 à 30°C.....61
- Figura 21** - Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ versus $1/T$ para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-hexanol, solvente a acetonitrila e temperaturas de 20 à 30°C.....61
- Figura 22** – Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz) do ácido láurico em CDCl_369
- Figura 23** – Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz) do p-nitrofenol em CDCl_370
- Figura 24** - Grau de conversão em função do tempo para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol catalisada pela C.V. lipase imobilizada em organo-gel utilizando como solvente externo hexano, a 25°C.....71
- Figura 25** - Grau de conversão em função do tempo para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol catalisada pela C.V. lipase imobilizada em organo-gel utilizando como solvente externo acetonitrila, a 25°C.....72
- Figura 26** – Espectro de infravermelho do (-) laurato de sec-octila em cela.....77

Figura 27 – Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) do (-) laurato de sec-octila em CDCl ₃	78
Figura 28 – Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) do laurato de pentila em CDCl ₃	84
Figura 29 – Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) do laurato de octila em CDCl ₃	85
Figura 30 – Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) do laurato de dodecila em CDCl ₃	86
Figura 31 – Espectro de infravermelho do laurato de pentila em cela.....	87
Figura 32 – Espectro de infravermelho do laurato de octila em cela.....	88
Figura 33 – Espectro de infravermelho do laurato de dodecila em cela.....	89
Figura 34 – Fração difundida em função do tempo à 25°C: a) benzoato de etila ; b) benzoato de butila ; (c) benzoato de cetila usando dodecano como solvente externo.....	94

- Figura 35** – Valores de D para os benzoatos de alquila em função do aumento da cadeia alquílica em organo-gel de hexano a 25°C: a) cicloexano; b) heptano; c) hexano; d) dodecano, como solvente externo.....96
- Figura 36** – Valores de D para os benzoatos de alquila em função do aumento da cadeia alquílica a 25°C. a) organo-gel de hexano com hexano como solvente externo; b) organo-gel de heptano com heptano como solvente externo; c) organo-gel de cicloexano com cicloexano como solvente externo99
- Figura 37** - Fração difundida do laurato de p-nitrofenila , em função da raiz quadrada do tempo, em organo-gel de hexano utilizando como solvente externo hexano, a 25°C.....102
- Figura 38** - Fração difundida do laurato de p-nitrofenila , em função da raiz quadrada do tempo, em organo-gel de hexano utilizando como solvente externo acetonitrila, a 25°C.....102
- Figura 39** - Variação de D em função da temperatura para a difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo.....106

Figura 40 - Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ versus $1/T$ para a difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo em temperaturas de 20 à 30°C.....107

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1** - Exemplos de atividades biológicas exercidas por formas enantioméricas puras de algumas drogas.....27
- Tabela 2** - Valores de constantes de velocidade observada (k_{obs}) para reação de transesterificação do laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila com diferentes álcoois secundários racêmicos e cicloexanol catalisadas pela *C.V.lipase* imobilizada em MBG de hexano a 25°C.....54
- Tabela 3** - Efeito da temperatura na constante de velocidade para a reação do laurato de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos, com *C.V. lipase* imobilizada em MBG.....57
- Tabela 4** - Valores da energia livre de ativação (ΔG^\ddagger) em diferentes temperaturas.....62
- Tabela 5** – Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com os álcoois secundários racêmicos (\pm)-2-hexanol e (\pm)-2-octanol.....65
- Tabela 6**- Comportamento dos álcoois (\pm)-2-octanol e o (\pm)-2-hexanol com relação aos sistemas utilizados nas reações de transesterificação enantiosseletivas com laurato de p-nitrofenila.....68

- Tabela 7-** Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos, com C.V.lipase imobilizada em organo-gel.....74
- Tabela 8 -** Rendimento para reação de transesterificação laurato de p-nitrofenila com diferentes lipases e álcoois primários e secundários racêmicos, a 25°C.....80
- Tabela 9 -** Rendimentos para as reações de transesterificação laurato de p-nitrofenila com diferentes lipases e álcoois primários e secundários racêmicos, a 25°C.....82
- Tabela 10 -** Dados de rendimento, R_f, IV e índice de refração para os benzoatos de alquila.....91
- Tabela 11 –** Valores de Coeficiente de difusão (D) para os benzoatos de alquila em organo-gel de hexano a 25⁰C em função da polaridade do solvente externo.....95
- Tabela 12 –** Valores do Coeficiente de Difusão (D) para os benzoatos de alquila em organo-gel de hexano, cicloexano e heptano, a 25°C.....98

- Tabela 13** - Valores de coeficiente de difusão do laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila em sistema de organo-gel à 25 °C.....103
- Tabela 14** - Valores do coeficiente de difusão para o laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano solvente externo em diferentes temperaturas.....105
- Tabela 15** – Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para a difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo.....108

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Asp = ácido aspártico

CVL = lipase de *Chromobacterium viscosum*

c = concentração em g/ mL (usada nas determinações polarimétricas)

Ea = energia de ativação

ee_s = excesso enantiomérico do substrato

ee_p = excesso enantiomérico do produto

Enz = enzima

E = razão enantiomérica

h = constante de Planck

His = histidina

k_B = constante de Boltzmann

k_{obs} = constante de velocidade observada de primeira ordem

MBG = microemulsion based gels (microemulsão gelificada em organo-gel)

n_D = índice de refração

Mt/M₀ = Fração de ésteres difundida

D = coeficiente de difusão

RMN = ressonância magnética nuclear

R = constante dos gases

Ser = serina

T = temperatura em Kelvin

α = rotação óptica observada

[α]^T_D = rotação óptica específica

ΔG[#] = energia livre de ativação

ΔΔG[#] = diferença de energia livre de ativação

ΔH[#] = entalpia de ativação

ΔS^\ddagger = entropia de ativação

$\lambda_{\text{máx}}$ = comprimento de onda máximo

RESUMO

Neste trabalho foram imobilizadas lipases de diferentes fontes em organo-gel e avaliados sua eficiência em reações de transesterificação.

Inicialmente foi estudado a cinética das reações de transesterificação dos alcenoatos de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos, utilizando hexano como solvente externo e C.V. lipase imobilizada em organo-gel a 25°C. Observou-se que com este solvente a reação ocorreu, porém o produto da reação p-nitrofenol não se difunde do organo-gel para o solvente externo. A partir destes resultados foram realizados alguns testes variando-se a polaridade do solvente com a finalidade de extrair o p-nitrofenol do interior do organo-gel. A acetonitrila mostrou-se a mais eficiente, e este foi o solvente utilizado para os estudos cinéticos nas reações de transesterificação dos alcenoatos de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos. Os valores das constantes de velocidades observadas obtidas para as reações de transesterificação do laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila com os álcoois secundários racêmicos, diminui a medida que são utilizados álcoois de cadeia carbônica menores, independente do éster utilizado.

Estudou-se também, o efeito da temperatura (20 - 30°C) para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com os (±)-2-octanol e (±)-2-hexanol, acetonitrila como solvente externo e C.V. lipase imobilizada em organo-gel. Para temperaturas superiores a 30°C pode ocorrer uma maior flexibilidade na estrutura polimérica da gelatina que forma o organo-gel, não sendo assim viável a realização do experimento em temperaturas superiores.

As lipases de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas sp*, *Microbial Lipolase*, imobilizadas em organo-gel de hexano foram usadas como biocatalisadores na reação de transesterificação enantiosseletiva do laurato de p-

nitrofenila com (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol. Os melhores sistemas para a resolução destes álcoois, foram com *C.V. lipase* imobilizada em MBG de hexano e hexano ou acetonitrila como solventes externos. Os valores de enantiosseletividade (E) foram baixos, sendo que obteve-se os melhores resultados de excessos enantioméricos para resolução do (\pm)-2-octanol utilizando hexano como solvente externo (ee_p 51%).

Foi avaliado o efeito da atividade de diferentes lipases imobilizadas em MBG via reações de transesterificação em dois solventes, acetonitrila e hexano. Uma série de ésteres foi sintetizada usando laurato de *p*-nitrofenila e álcoois alifáticos primários de cadeia linear e secundários racêmicos. Os melhores rendimentos (70-96%) foram obtidos com a *C.V. lipase* e hexano como solvente externo. Com esta mesma enzima utilizando acetonitrila como solvente externo os rendimentos ficaram em torno de 30%.

Foi também estudado o grau de impedimento imposto pelas barreiras difusionais de ésteres quando estes passam do meio reacional para o organo-gel e vice-versa, através de medidas de coeficiente de difusão (D) dos benzoatos e alcanatoatos de alquilas. Foram obtidos valores de coeficiente de difusão dos benzoatos de etila, butila, octila, cetila e sec-butila e do laurato, octanoato e acetato de *p*-nitrofenila, em organo-gel de hexano, cicloexano e heptano. Como solvente externo, utilizaram-se o hexano, cicloexano, heptano, dodecano, acetonitrila e 1,4-dioxano.

Também foi estudado o efeito da temperatura para a difusão do laurato de *p*-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo. A partir destes resultados foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos (E_a , ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger).

ABSTRACT

In this work lipases of different sources were immobilized in organo-gel (MBG) their and efficiency were avaliated in transesterification reactions.

Firstly it was studied the kinetics of transesterification reactions transesterification of p-nitrophenyl alcanoates with racemic secondary alcohols, using hexane as external solvent and C.V. lipase immobilized in organo-gel at 25°C. With this solvent the reaction ocured but the product, p-nitrophenol, did not spread out from the gel to the external solvent. From these results, it was realized some tests changing the solvent polarity in order to extract the p-nitrophenol from the organo-gel. Acetonitrile was the most effective, and so this was used for the kinetic studies in the transesterification reactions of p-nitrophenyl alcanoates with racemic secondary alcohols. The observed rate constants for the transesterification reactions of p-nitrophenyl laurate, octanoate and acetate with these alcohols, decreased as alcohols carbon chain decreases regardless the ester structure.

It was also studied, the temperature effect in the reaction of p-nitrophenyl laurate with (\pm)-2- octanol and (\pm)-2- hexanol with acetonitrile as external solvent and C. V. lipase immobilized in organo-gel. For temperatures superior than 30°C, probably occur a higher flexibility in the gelatin polimeric structure in the organo-gel, and so it is not possible to realize experiments above this value.

C. V.; *Pseudomonas sp*, *Microbial and Lipolase* lipases immobilized in organo-gel of hexane were used as biocatalyts in the enantioselective transesterification reactions of p-nitrophenyl laurate with (\pm)-2- octanol and (\pm)-2- hexanol. The best systems for the resolution of these alcohols, were with C.V. lipase immobihzed in MBG of hexane and hexane or acetonitrile as external

solvent. The enantioselective values (E) were low, and the best enantiomeric excess values were obtained for the resolution (\pm)-2-octanol using hexane as external solvent ($ee_p=51\%$).

It was also evaluated the activity effect of different lipases immobilized in MBG via transesterification reactions in two solvents, acetonitrile and hexane. A series of esters was synthesized using p-nitrophenyl laurate and unbranched aliphatic primary and secondary racemic alcohols. The best yields in esters were obtained with C.V. lipase and hexane as external solvent (70-96%). With this enzyme using acetonitrile as external solvent, the esters yields were in the range of 30%.

It was also studied the degree of esters diffusional barriers when they go from the organo-gel to the organic solvent through diffusion coefficient measurements (D) of alkyl benzoates and p-nitrophenyl alcanoates. It was obtained D values for ethyl, butyl, octyl, cetyl and sec-butyl benzoates and p-nitrophenyl laurate, octanoate and acetate in organo-gel of hexane, cyclohexane and heptane. As external solvent, it was used hexane, cyclohexane, heptane, dodecane, acetonitrile and 1,4-dioxane.

Finally, it was studied the temperature effect for p-nitrophenyl laurate diffusion in organo-gel of hexane, with hexane as external solvent. From these results, the thermodynamic parameters E_a , ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , were obtained.

INTRODUÇÃO:

1.1. Justificativa do trabalho

No momento, os processos tecnológicos e biotecnológicos vêm sendo universalmente considerados como alternativas consistentes para geração de bens e prestação de serviços.¹ A sociedade humana, neste momento de virada de século, está consciente das necessidades da implementação de tecnologias baseadas em matérias primas renováveis e adequadas sob o ponto de vista energético e de preservação do meio ambiente.

A busca de uma metodologia mais eficiente para a utilização de enzimas em síntese orgânica levou a uma procura incessante de um sistema que melhor se adaptasse às condições sintéticas desejadas. A utilidade e a praticidade do uso de enzimas como catalisadores quirais em síntese orgânica estão bem documentadas. A sua aplicação na obtenção de “synthons” enantiomericamente puros em sínteses assimétricas de produtos naturais, de interesse acadêmico e farmacêutico, é particularmente importante. Esterases, lipases e oxidoredutases são enzimas de utilidade comprovada nesta área.² Portanto, enzimas como catalisadores têm notáveis propriedades, mas uma característica as faz especialmente valiosas para síntese orgânica, ou seja, elas são seletivas.³

Afim de utilizar enzimas em síntese orgânica, muitas técnicas vêm sendo empregadas apresentando vantagens e desvantagens em suas aplicações em meio orgânico.

A imobilização de enzimas é uma das mais importantes técnicas na aplicação da catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos. Por razões práticas e econômicas, é muitas vezes vantajoso usar enzimas suportadas.⁴

Entre vários suportes descritos na literatura, para imobilizar enzimas na aplicação em meio orgânico, deve-se mencionar que o organo-gel supera muitas das dificuldades previamente encontradas quando utilizam-se métodos mais tradicionais tais como: dispersão direta de enzimas em pó em solvente orgânico, modificações químicas das enzimas hidrofílicas tornando-as mais solúveis em solventes apolares, uso de sistema bifásico, e imobilização em suportes sólidos. O sistema de organo-gel oferece vantagens em termos do fato que seu uso facilita a recuperação do produto desejado da reação bem como a reutilização do mesmo.⁴

As enzimas imobilizadas em organo-gel, evitam o contato direto com o solvente orgânico que é desfavorável para a catálise enzimática e assim ficam protegidas contra a desnaturação.

Um outro ponto importante no uso da imobilização de enzimas em organo-gel, é que estudos anteriores demonstraram que a estrutura do organo-gel, é altamente dependente do solvente. Foi verificado que quando este sistema é utilizado para imobilizar enzimas e efetuar reações de esterificação e transesterificação, há um grande efeito do meio no rendimento de formação de ésteres. Portanto, também será quantificado o grau de impedimento imposto pelas barreiras difusionais encontradas pelos ésteres benzoatos de alquila e alcanos de p-nitrofenila, através de medidas de coeficiente de difusão (D), quando estes passam do organo-gel para o solvente externo. Pretende-se verificar se há ou não uma relação entre os rendimentos nas reações de esterificação e transesterificação com os valores de D, afim de adequar um melhor sistema para as condições sintéticas desejadas com enzimas imobilizadas em organo-gel (MBG).

Assim, como contribuição para o emprego de biocatalisadores em meio orgânico, serão avaliadas as atividades de diferentes lipases através de medidas cinéticas e termodinâmicas em reações de transesterificação enantiosseletivas,

afim de otimizar as condições para o emprego dos mesmos na síntese orgânica moderna.

1.2 ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES:

1.2.1 Definição de Enzimas

Enzimas podem ser definidas como catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos.⁵ São geralmente de natureza protéica, apresentam alta especificidade de reação e tem grande poder catalítico. As enzimas protéicas são proteínas de alto peso molecular formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. Possuem em suas estruturas grupos polares tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂, que atuam como catalisadores. Sua atividade e estrutura mais estável são mantidas em meio aquoso. As enzimas vêm sendo utilizadas por várias décadas, sendo que sua natureza estrutural tornou-se conhecida apenas recentemente. Possuem estruturas complexas de cadeias polipeptídicas, sendo que poucas têm sua estrutura tridimensional definida na literatura. Por exemplo, a **Figura 1** mostra a estrutura tridimensional da lisozima.^{5,6}

- São catalisadores altamente eficientes, sendo que as velocidades das reações catalisadas por enzimas podem ser até 10^{12} vezes mais rápidas do que as correspondentes não catalisadas.
- Podem também ser usadas no tratamento de resíduos e materiais biológicos, pois são biodegradáveis, o que as torna rapidamente absorvidas pela natureza.

Portanto, a indústria atual enfrenta um enorme desafio. Ela deve proteger o meio ambiente e ao mesmo tempo produzir bens, serviços e empregos de que a sociedade necessita. Sendo assim, a medida em que a conservação dos recursos naturais e a proteção do meio ambiente vão se tornando uma questão de crescente importância, abre-se o caminho para novas aplicações de enzimas em diferentes áreas industriais.⁷

1.2.2 Especificidade das Enzimas

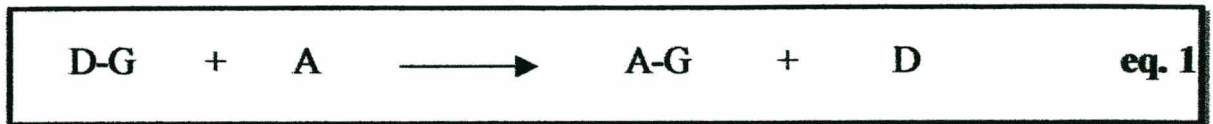
A especificidade das enzimas é a característica mais importante para a exploração e uso em síntese orgânica. A capacidade com que discriminam entre as características estruturais e estereoquímicas de seus substratos determina sua atividade sintética.⁸

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

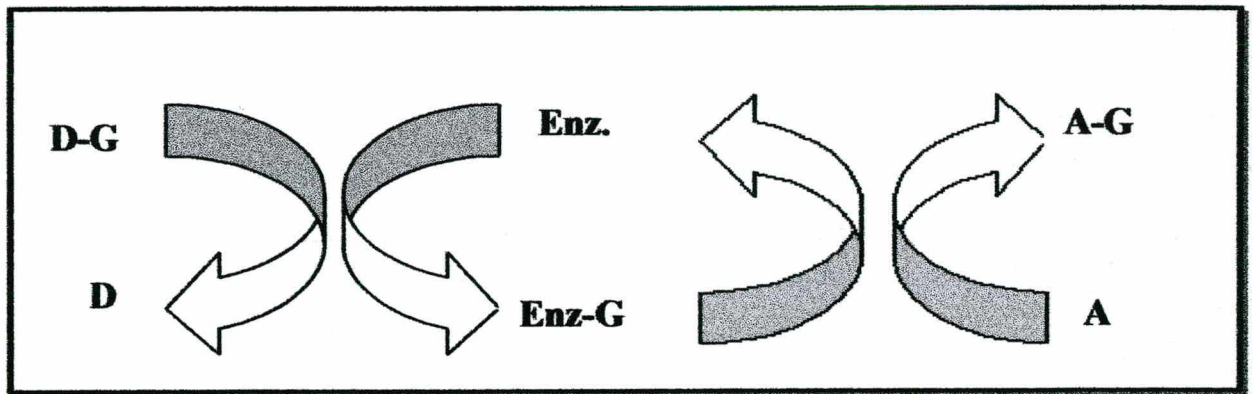
1.2.3 Algumas Considerações Mecanísticas das Enzimas

1.2.3.1 - Mecanismo de Ação

Grande parte das reações catalisadas por enzimas envolvem a quebra ou formação de ligações covalentes. Por exemplo, na equação 1 o grupamento G é transferido de um grupo doador D-G para um grupo receptor A.

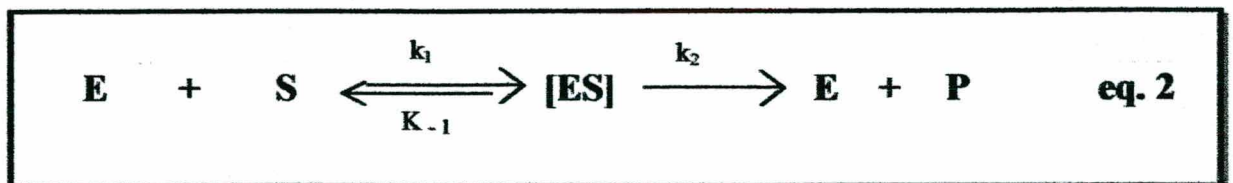


A reação global envolve a quebra da ligação D-G e a formação de uma nova ligação A-G, sendo melhor representado pelo Esquema 1.



Esquema I

Portanto, as enzimas reagem via a formação de um complexo enzima-substrato para posteriormente formar produtos (Equação 2 e Figura 2).



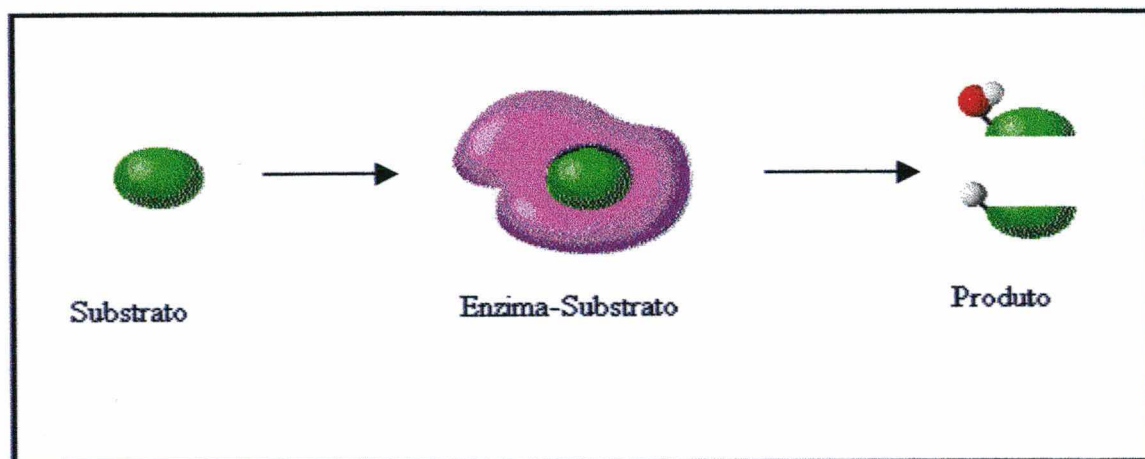


Figura 2 - Representação esquemática para a formação do complexo enzima-substrato.⁹

Entre as teorias e racionalizações que tem sido desenvolvidas para entender catálise enzimática, o modelo mais ilustrativo é o mecanismo desenvolvido por Emil Fischer em 1894, que mostra a interação entre o substrato e a enzima por analogia com um conjunto "chave e fechadura".¹⁰⁻¹²

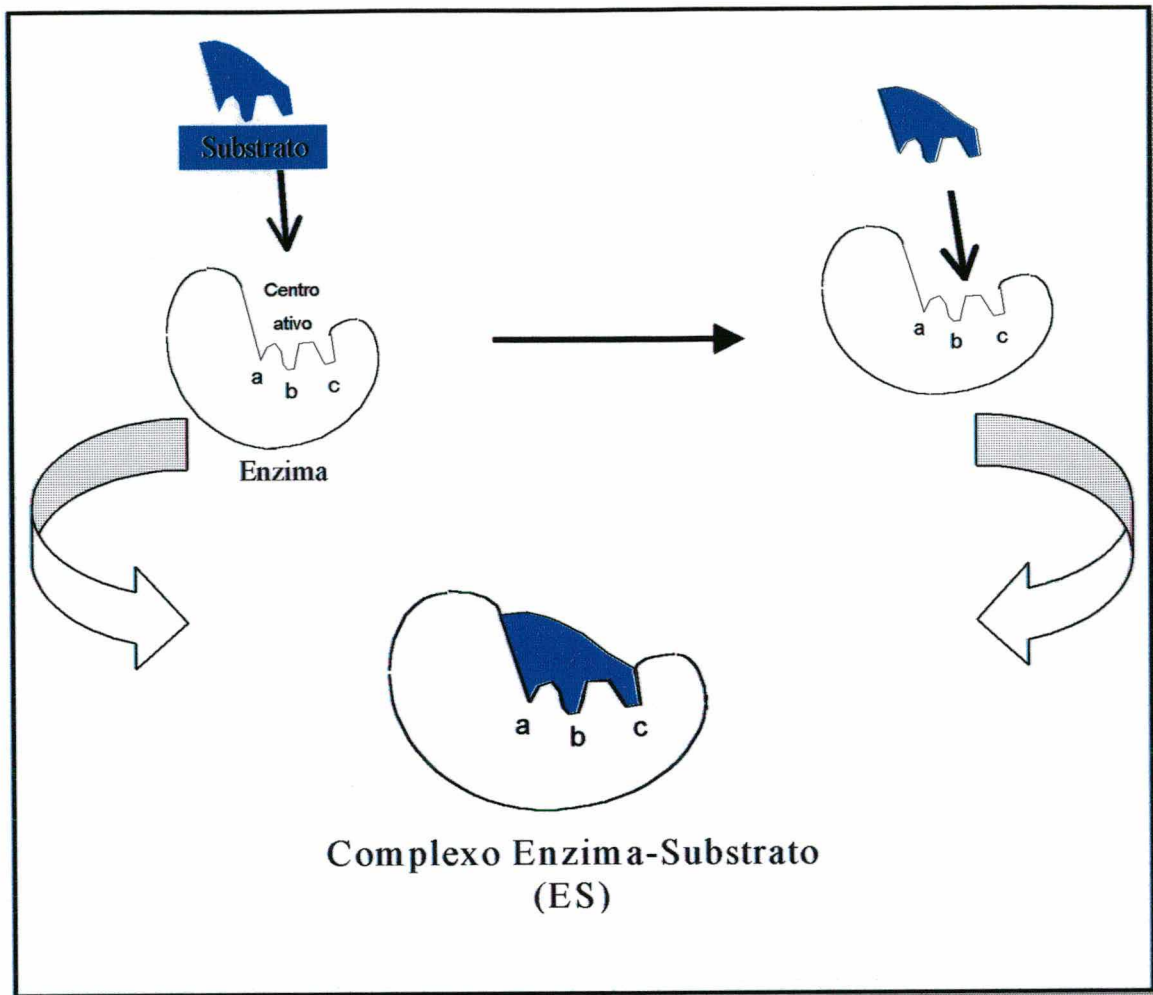


Figura 3 - Representação da formação de um complexo ES segundo a hipótese do modelo de Fischer.¹¹

O mecanismo do encaixe induzido de Koshland Jr. desenvolvido no final da década de sessenta, recebeu considerável apoio experimental e tem como característica essencial a flexibilidade da região do centro ativo.¹⁰⁻¹²

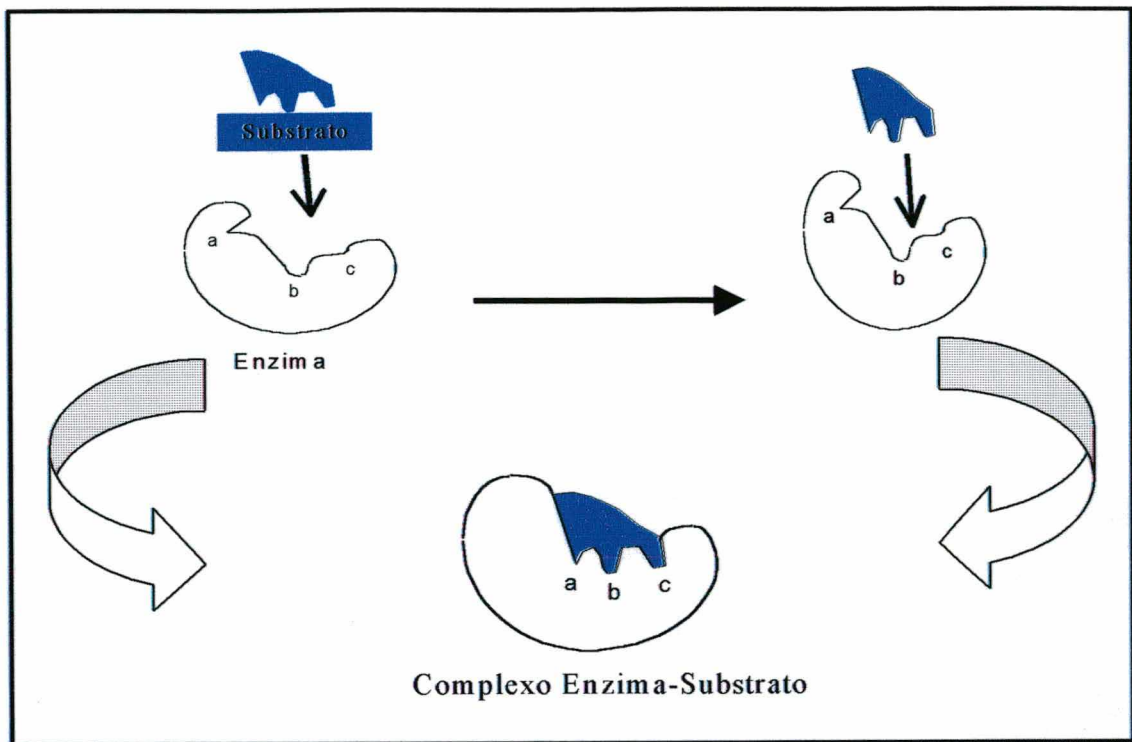


Figura 4 - Representação de encaixe induzido por uma alteração da proteína (segundo Koshland).¹¹

O modelo de Fischer (**Figura 3**), presume que o centro ativo é pré-formado para encaixar o substrato, e no modelo do encaixe induzido, o substrato induz uma mudança conformacional no sítio ativo da enzima (**Figura 4**).

A regra de três pontos foi outra teoria criada por A. G. Ogston para explicar a enantiosseletividade das enzimas.¹¹

Enzimas são catalisadores e, conseqüentemente, não podem alterar o equilíbrio de uma reação química. Isso significa que elas aceleram a reação direta e sua reversa, multiplicando as velocidades pelo mesmo fator.

As enzimas aceleram as reações pelo decréscimo do ΔG^\ddagger , a barreira de ativação. A combinação do substrato com a enzima cria uma nova via de reação

cuja energia do estado de transição é menor do que a da reação na ausência de enzima (Figura 5).

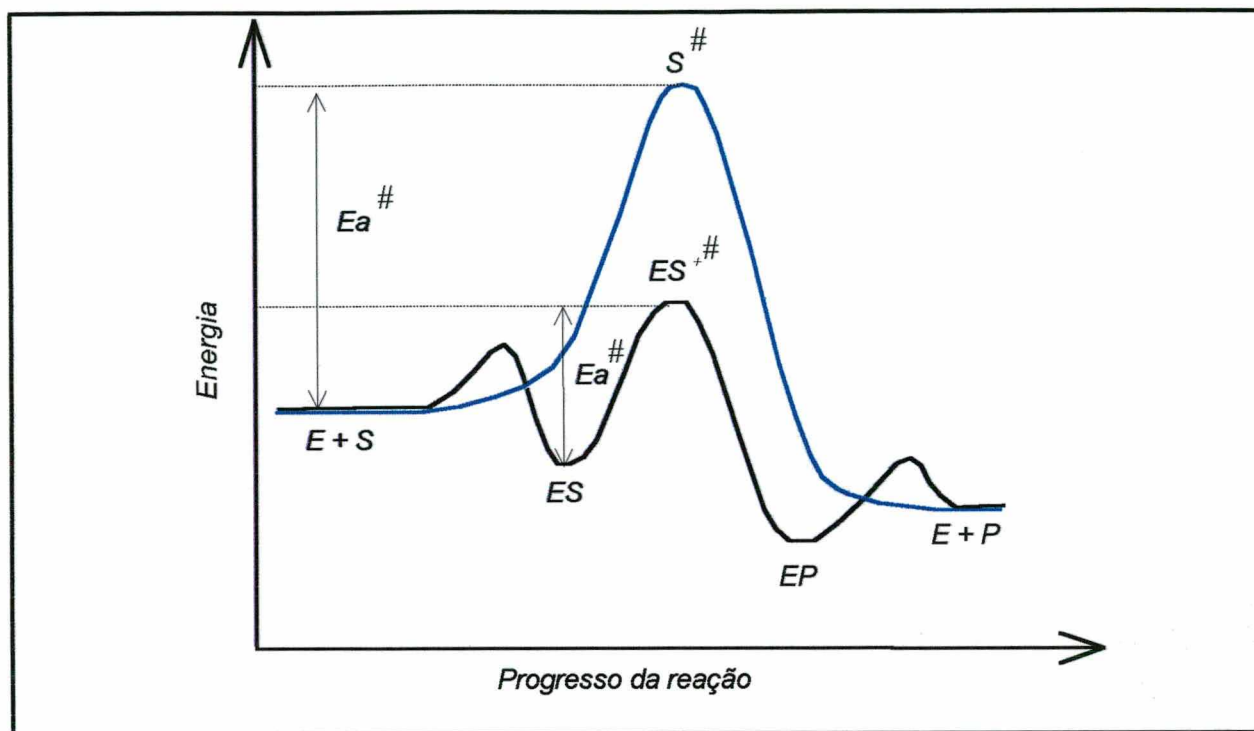


Figura 5 - Diagrama de energia de reação catalisada (preto) vs não catalisada (azul) enzimaticamente. S = substrato, P = produto, E = enzima, ES = complexo enzima-substrato, # denota estado de transição, E_a = energia de ativação.

A utilização das enzimas como catalisadores em síntese orgânica é bem conhecida. A alta estereosseletividade e regioseletividade frente a substratos são as principais características. Contudo, ainda tem -se encontrado algumas dificuldades em incluí-las em resolução enantiosseletiva em síntese orgânica, pois frequentemente as enzimas catalisam as reações em meio aquoso, mas a água não é um meio ideal para muitos processos orgânicos.¹⁰⁻¹³

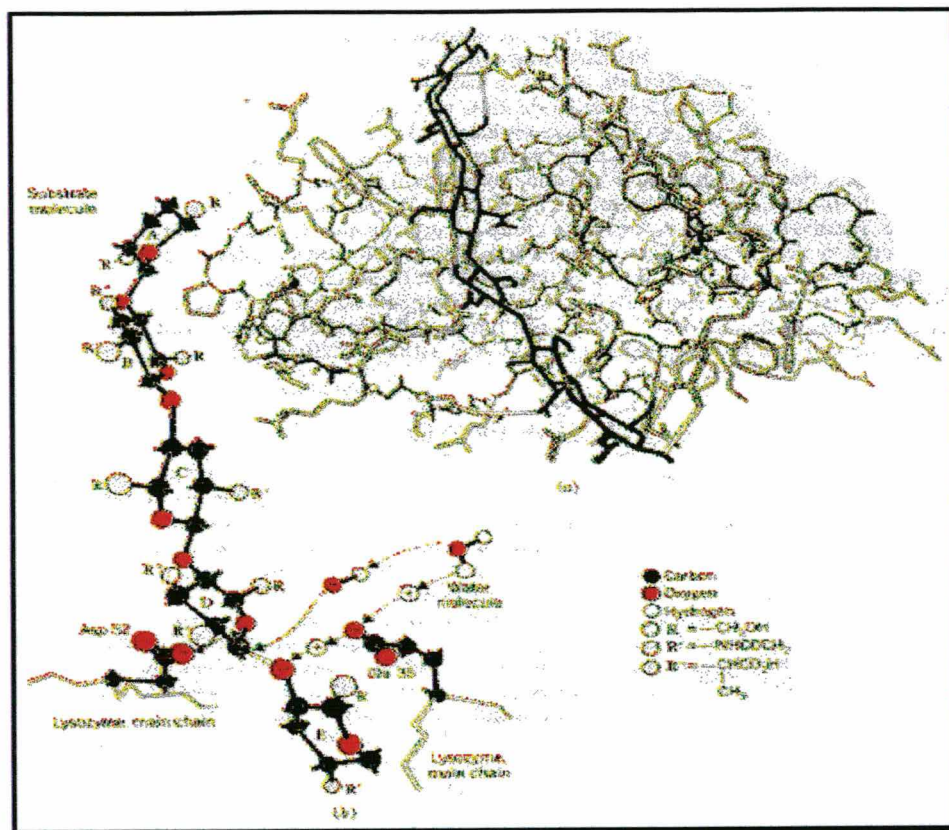
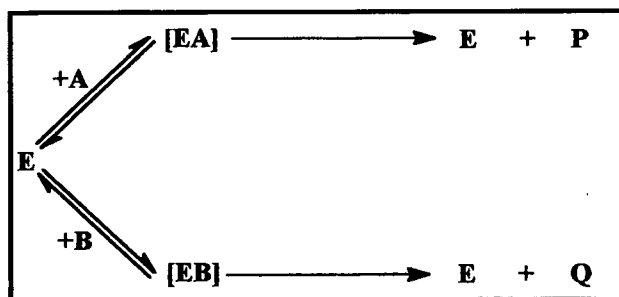


Figura 1 - Estrutura tridimensional da *lisozima*.

Os principais benefícios de utilizar enzimas serão descritos a seguir:

- São catalisadores extremamente versáteis, existindo um processo enzimático equivalente com vários tipos de reações orgânicas.
- Atuam melhor a temperaturas e condições moderadas, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo à neutralidade. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização, rearranjos, etc..., que freqüentemente permeiam a metodologia tradicional.
- São altamente específicas, o que significa poucos efeitos e sub-produtos indesejáveis no processo de formação de produtos.

Toda estereosseletividade das enzimas origina-se da diferença de energia entre os complexos enzima-substrato no estado de transição $[ES]^\ddagger$. Supondo uma reação enantiosseletiva com ambos substratos enantioméricos A e B (eq. 3). Devido ao envolvimento quiral do sítio ativo da enzima, os complexos enzima-substrato diastereoméricos formados, $[EA]$ e $[EB]$, os quais possuem diferentes valores de energia livre (ΔG) para seus respectivos estados de transição $[EA]^\ddagger$ e $[EB]^\ddagger$. O resultado é a diferença na energia de ativação para ambos substratos enantioméricos, e como consequência, um enantiômero reage mais rapidamente que o outro (Figura 6). O valor da diferença em energia livre, expressa como $\Delta\Delta G^\ddagger$, fornece uma medida direta da seletividade da reação.¹⁰⁻¹³



eq. 3

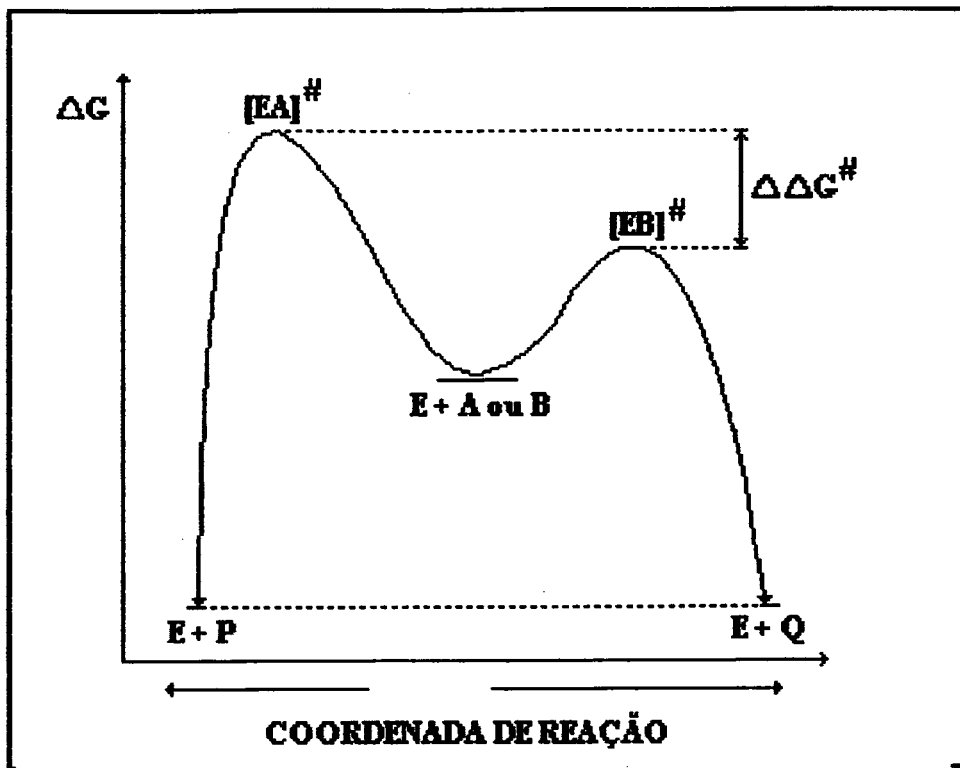


Figura 6 - Diagrama de energia para uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima. E = enzima, A e B = substratos enantioméricos, P e Q = produtos enantioméricos, [#] denota estado de transição, $\Delta\Delta G^{\#}$ = diferença em energia livre.

1.2.4. Aplicações de Enzimas em Síntese Orgânica

Na última década, as reações catalisadas por enzimas aumentaram dentro da química orgânica sintética. Estima-se que das 25.000 enzimas presentes na natureza, cerca de 2.800 foram classificadas e perto de 400 são comercializadas de uma forma pura.¹⁴

Nos últimos anos o interesse em utilizar enzimas como catalisadores tem aumentado devido a sua alta versatilidade e as condições suaves de temperaturas e pH em que se realizam as reações.¹⁵

A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensivamente usada em processos catalíticos, tanto na área tecnológica como científica, por vários anos.

Porém, seu uso tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos serem pouco solúveis em água, o que necessitava de grande volume reacional e procedimentos de separação muito mais complicados. O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou este problema, e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização permitiu que várias reações pudessem se tornar viáveis.^{16,17} A adição de uma quantidade moderada de solvente orgânico, é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível.

A característica de instabilidade em meio orgânico, a faixa limitada de substrato específico e o alto custo, têm sido considerados como os problemas mais sérios para o uso de enzimas como catalisadores sintéticos. A percepção, portanto, que elas são intrinsicamente limitadas como catalisadores mudou nos últimos anos devido aos novos desenvolvimentos em química e biologia e às novas exigências industriais. Atualmente, um grande número de reações orgânicas podem ser realizadas com o uso de enzimas.

Entre todos os tipos de reações catalisadas por enzimas, as transformações hidrolíticas, envolvendo a formação de ligações imídicas e éster podem ocorrer facilmente usando proteases, esterases ou lipases. Quando a enzima está operando em um ambiente que tem baixa concentração de água, qualquer outro nucleófilo pode competir com a água e formar o produto a partir de um intermediário acil-enzima, levando assim a várias transformações sinteticamente úteis. Durante o curso da reação catalisada enzimaticamente, qualquer tipo de quiralidade do substrato é reconhecida pela enzima, e isto causa uma preferência para as duas direções possíveis com relação a estereoquímica da reação. Para a indústria farmacêutica a utilização de enzimas como reagentes quirais em meio orgânico é de grande importância, visto que muitas drogas (fármacos) são comercializadas em sua forma racêmica, ou seja impura.^{18,19}

As enzimas em muitos casos são utilizadas como a única maneira possível de se detectar dois enantiômeros de um composto quiral e, obter uma forma pura. Portanto, as enzimas representam uma classe de catalisadores quirais potencialmente ativos e úteis para uma ampla faixa de transformações (Figura 7).¹¹

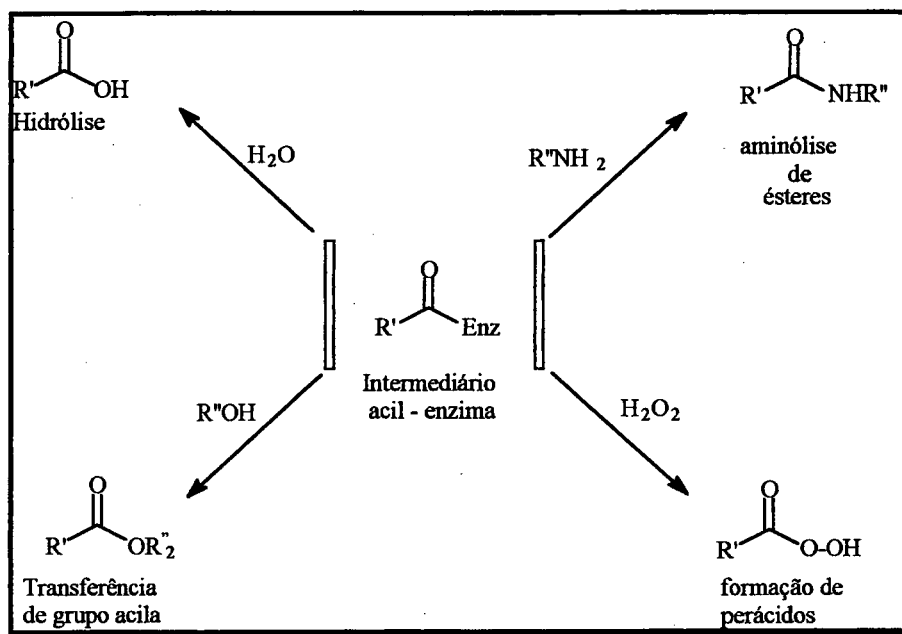


Figura 7 - Algumas possibilidades de transformações orgânicas utilizando catálise enzimática.

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. Nesta classe estão incluídas as amidases, proteases, esterases, nitrilases, fosfatases e epoxidases, sendo de particular e grande interesse para o nosso trabalho as lipases.¹¹

1.2.5. Lipases em síntese orgânica

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos para formar ácidos graxos livres e glicerol. Estas enzimas são classificadas como hidrolases e apresentam peso molecular entre 40-50 kda com cerca de 300

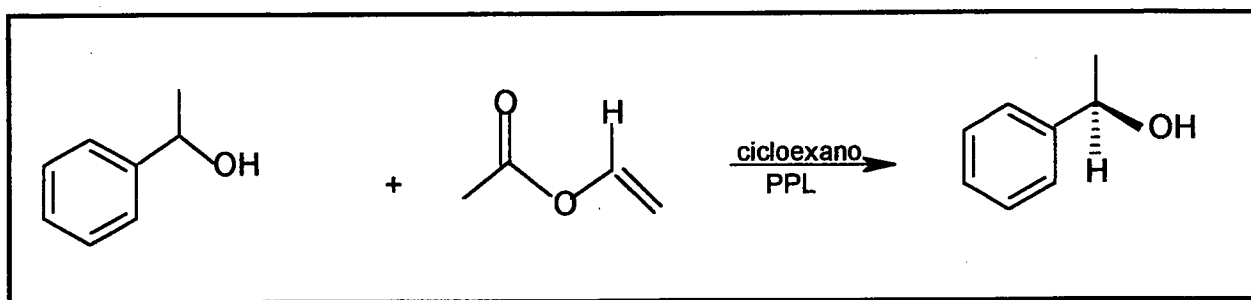
resíduos de aminoácidos.²⁰ As lipases são glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. Elas têm sido isoladas de uma variedade de tecidos de animais e plantas, podendo ser também produzidas por processos de fermentação usando várias espécies de microrganismos (fungos e bactérias).²¹

As vantagens de se utilizar lipases em meio orgânico, deve-se principalmente ao fato do baixo custo, disponibilidade comercial, a versatilidade catalítica, não requerem cofatores, são regioespecíficas para a posição 1,3 de triglicerídeos, são estereosseletivas e atuam em uma faixa de pH e temperatura bastante grande.^{21,22} As reações catalisadas por lipases incluem esterificações, transesterificações, amidação, síntese de peptídeos e a formação de lactonas macrocíclicas. A síntese de compostos orgânicos quirais via reações de transesterificação enantiosseletiva de ésteres, são de interesse porque fornecem um método fácil para a preparação de álcoois e ácidos opticamente ativos. Mecanicamente, a síntese enzimática de ésteres ou reação enzimática de transesterificação tem algumas características em comum com as reações da química clássica correspondente, mas os princípios que governam a especificidade estereoquímica são diferentes e assim justificam a sua utilização.^{23,24}

Vários estudos para a utilização de lipases em síntese orgânica tem sido direcionados para síntese (conversão) assimétrica, um dos temas mais importantes da síntese orgânica moderna e, de grande interesse para a indústria farmacêutica, visto que a atividade biológica de muitas fármacos (drogas) racêmicos muitas vezes reside em um único enantiômero.^{18,19,25,26} Drogas como Naproxen²⁷ (agente antiinflamatório), Dropropizina²⁸ (agente antitussígeno), Cloranfenicol²⁹ (agente antimicrobial), Atenolol³⁰ (usado no tratamento da hipertensão) e Taxol²⁶ (usado no combate ao câncer) têm sido resolvidos por catálise enzimática.

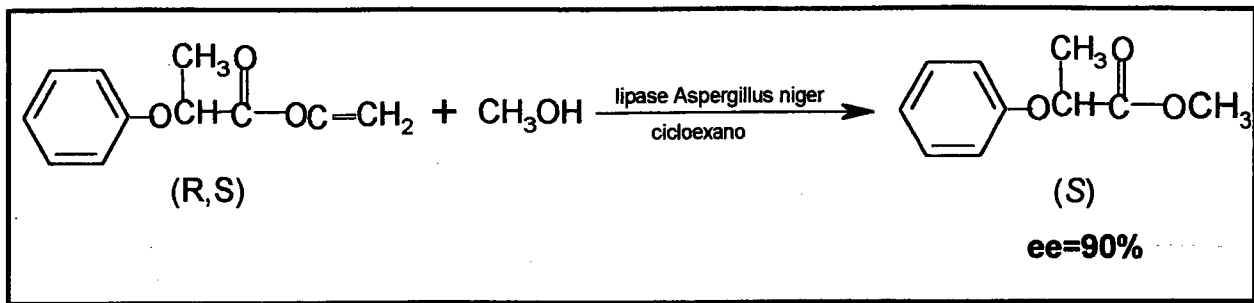
A resolução de álcoois racêmicos tem sido feita explorando as propriedades enantiosseletivas de enzimas hidrolíticas.^{31,32} Os álcoois opticamente ativos podem ser obtidos em soluções aquosas por hidrólises estereosseletivas dos correspondentes ésteres racêmicos,³³⁻³⁷ por esterificações em solvente orgânico^{13, 38-41} e por transesterificações dos correspondentes álcoois racêmicos.⁴²⁻⁵⁰ A escolha do método depende de muitos fatores tais como seleção de um biocatalisador disponível, rendimento, pureza, velocidade da reação, separação dos produtos e estabilidade das enzimas. Em outras palavras, a otimização das condições reacionais. Com a exceção de certos álcoois estericamente impedidos, as lipases catalisam a acilação assimétrica de uma ampla faixa de substratos cíclicos e acíclicos entre moderada e alta enantiosseletividade.⁵¹⁻⁵⁵

O **Esquema II** ilustra o fato de que álcoois quirais podem ser resolvidos via reação de transesterificação catalisadas por lipases (PPL) em cicloexano e o produto (1-fenil-propanol-2) foi obtido com uma pureza óptica de 100%.⁵⁶



Esquema II

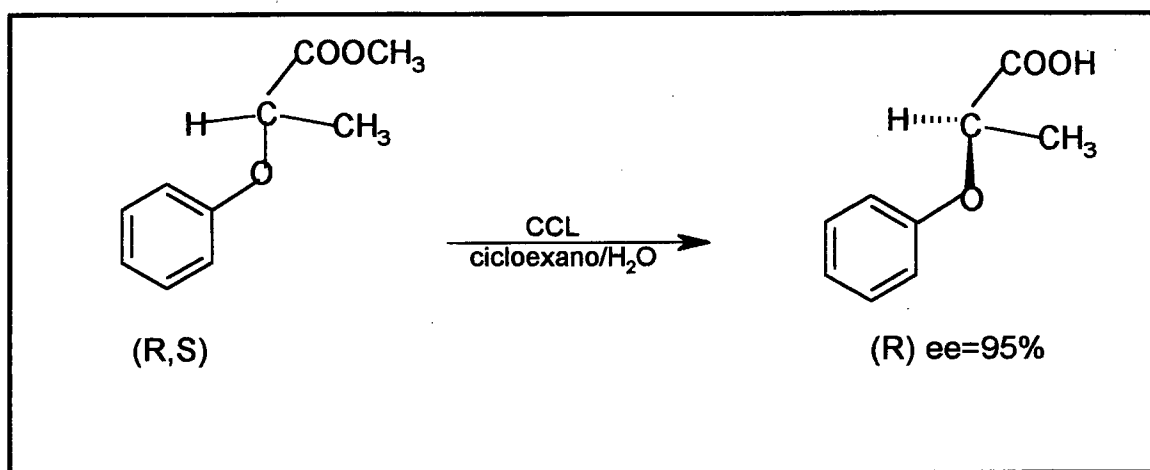
O **Esquema III**, mostra que o éster vinil-2-fenóxiopropanóico pode ser resolvido através da reação de transesterificação catalisada por lipase de *Aspergillus niger* em cicloexano, sendo que o produto foi obtido com uma pureza óptica de 90%.⁵⁷



Esquema III

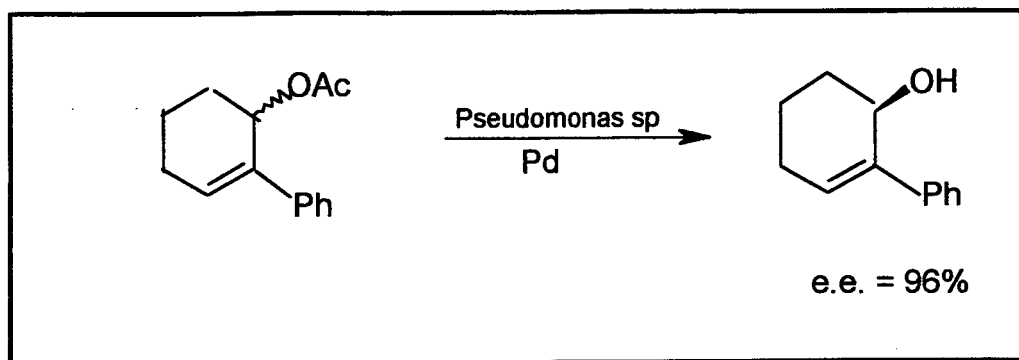
Outras aplicações relevantes das lipases estão na indústria agroquímica e na química fina na produção de compostos enantioméricamente puros ou na síntese produtos intermediários.⁵⁸

O Esquema IV, mostra que o ácido (R,S)- α -fenóxiacético foi resolvido utilizando lipase de *Cândida Cilíndrica*, sendo que o produto foi obtido com uma pureza óptica de 95%.⁵⁸



Esquema IV

O Esquema V, mostra a resolução enantiosseletiva de álcool alílico utilizando a reação de hidrólise do éster correspondente catalisada pela lipase de *Pseudomonas sp* imobilizada em paládio. O produto de hidrólise (álcool alílico) foi obtido com uma pureza óptica de 96%.⁵⁸



Esquema V

Portanto, a utilização de enzimas, e em especial as lipases, vem oferecendo excelentes possibilidades para obtenção de compostos enantiomericamente puros. O uso destes biocatalisadores em meio orgânico vem superando muitas das dificuldades encontradas quando utilizam-se métodos químicos tradicionais. Além disto, a biotecnologia quiral produz compostos de uma forma mais pura.

1.2.6 Sítio Ativo da Lipase

Brady,⁵⁹ através de cristalografia de raios-x, determinou a estrutura da lipase proveniente do fungo *Mucor miehei*. Esta lipase apresenta um centro catalítico composto de três aminoácidos (Ser 144, His 257 e Asp 203) que está localizado perto da superfície da molécula da proteína, mas não está completamente exposto. O centro ativo está coberto por um segmento espiral curto da molécula como se fosse uma tampa (**Figura 8**).

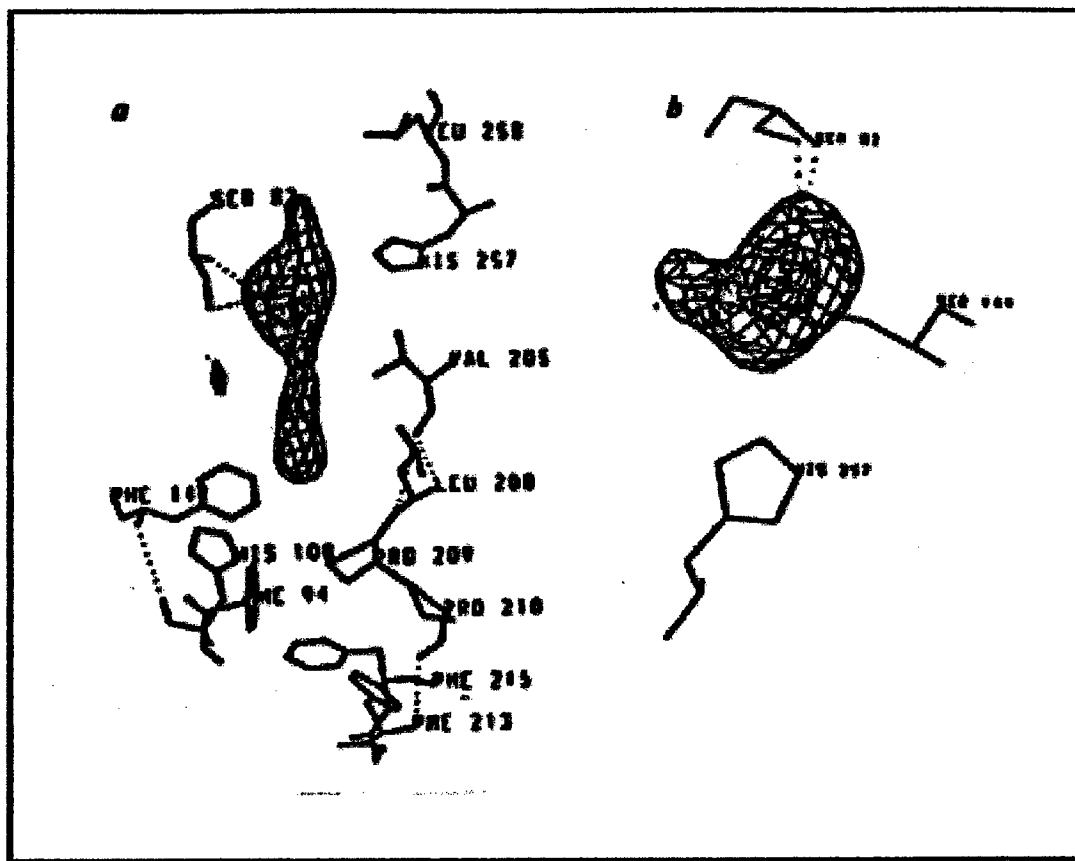


Figura 8 - Estrutura do sítio ativo da lipase da *Mucor Miehei* na presença do N-hexilclorofosfonato de etila. (a) Sítio ativo completo e inibidor; (b) secção transversal mostrando apenas a alteração do inibidor com Ser 82, Ser 144 e His 257.

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

A atividade das lipases é aumentada na interface lipídio-água e este fenômeno é conhecido como ativação interfacial. Esta característica única de catálise interfacial faz com que as lipases mostrem um envolvimento hidrofóbico e as distingue de outras enzimas hidrolíticas.⁶⁰

1.2.7. Imobilização de Enzimas

A habilidade das enzimas para atuarem como catalisadores já tem sido considerada por muitos anos, particularmente pela indústria farmacêutica.⁶¹ A imobilização de enzimas é uma das técnicas mais importantes na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos.⁶¹⁻⁶³ Por razões práticas e econômicas, é muitas vezes vantajoso usar enzimas imobilizadas visto que, com poucas exceções, elas são insolúveis em solventes orgânicos. Uma das grandes vantagens da imobilização é poder utilizar o catalisador repetidamente sem considerável perda da atividade catalítica.⁶⁴ Considerando a compatibilidade com a enzima, géis hidrofílicos têm sido freqüentemente empregados como suportes enzimáticos. Às vezes, a enantiosseletividade é aumentada.⁶⁵ Alguns sistemas que já foram usados para imobilizar enzimas são crisotila,¹³ Eupergit C,⁶⁶ celite,⁶⁷ quitosana e quitina,⁶⁸ agarose, Chromosorb e Sepharose.⁶⁹⁻⁷¹ A modificação de enzimas com polietilenoglicol que resulta em um pó solúvel em benzeno ou em hidrocarbonetos clorados, também tem sido empregada.⁷²⁻⁷⁶ Outras técnicas que superam os problemas da baixa solubilidade dos substratos, é o uso de surfactantes e micelas reversas.⁷⁷⁻⁸²

A **Figura 9** mostra alguns procedimentos que vêm sendo utilizados nos últimos anos para imobilizar enzimas.

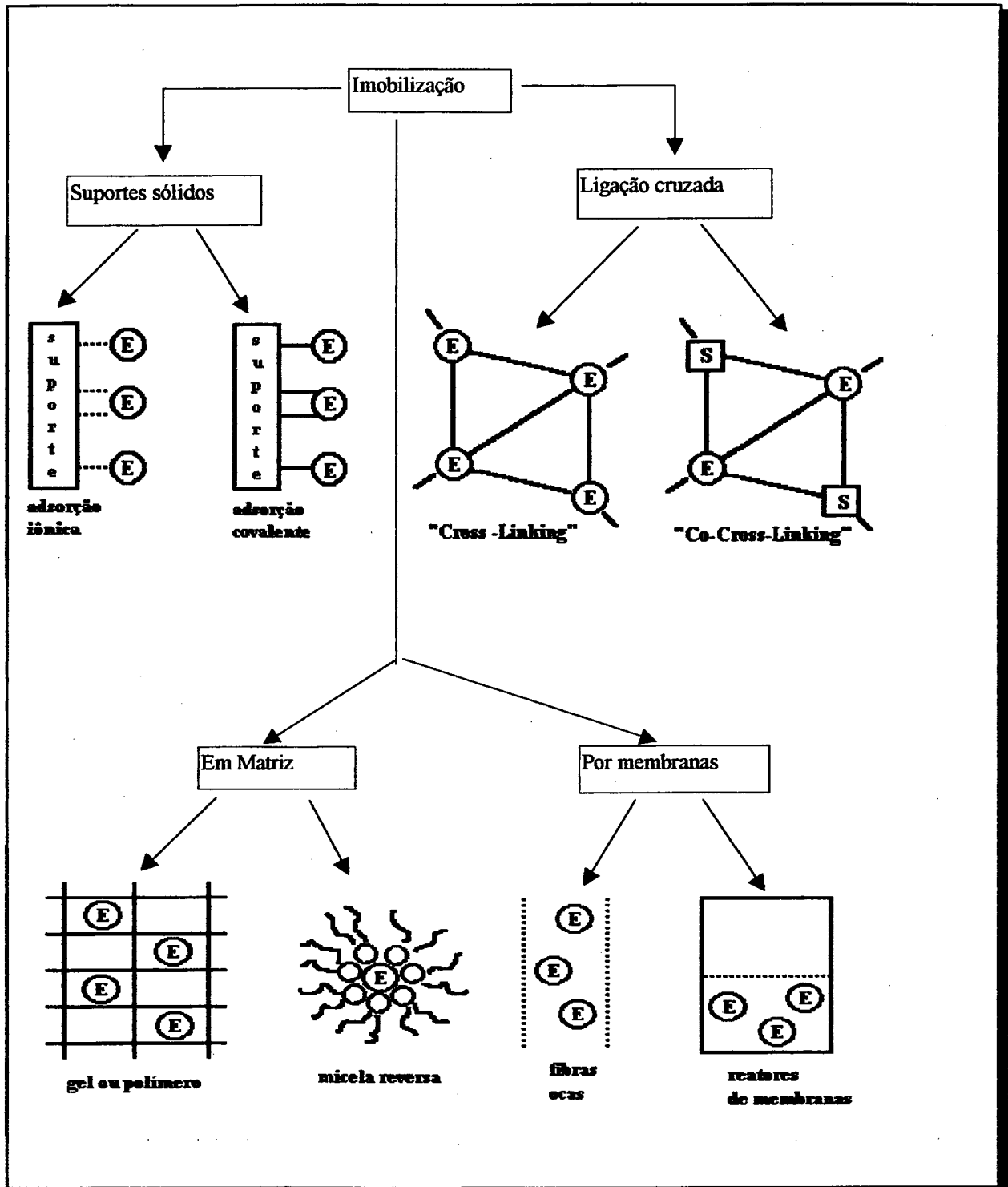


Figura 9 - Técnicas de imobilização de enzimas. E = enzima, S = suporte.

Nos últimos anos, muitos estudos têm se voltado para a utilização de microemulsões para imobilização de enzimas.⁸³⁻⁹¹ As microemulsões são misturas microscopicamente homogêneas, isotrópicas e opticamente transparente de água, óleo (hexano, heptano) e surfactante. As microemulsões podem ser divididas em dois tipos: microemulsão do tipo óleo em água (o/w) e microemulsão do tipo água em óleo (w/o) (**Figura 10**). O nome “microemulsão” deriva do fato de que gotas de óleo no sistema (o/w), ou gotas de água no sistema (w/o), possuem um diâmetro que varia de 50 a 500 Å. Esta definição não é aceita universalmente, e o termo microemulsão é considerado por muitos cientistas como gotículas muito pequenas em um meio orgânico, e que o tamanho das gotículas sejam da ordem de nanômetros (nm).⁹²⁻⁹⁴

As microemulsões são sistemas organizados, elas são fáceis de serem preparadas, são termodinamicamente estáveis e podem ser formadas apenas com a mistura de seus componentes. Para as microemulsões água/óleo, o parâmetro W_0 e a concentração do surfactante é que definem sua composição. O parâmetro que define a estabilidade das microemulsões é representado por W_0 , onde:

$$W_0 = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{surfactante}]$$

A gota de microemulsão pode ser efetivamente considerada como um microreator. Robinson e col., estudando as propriedades das microemulsões, concluíram que a sua estabilidade depende da concentração de óleo, água e surfactante presentes no meio.⁸⁹

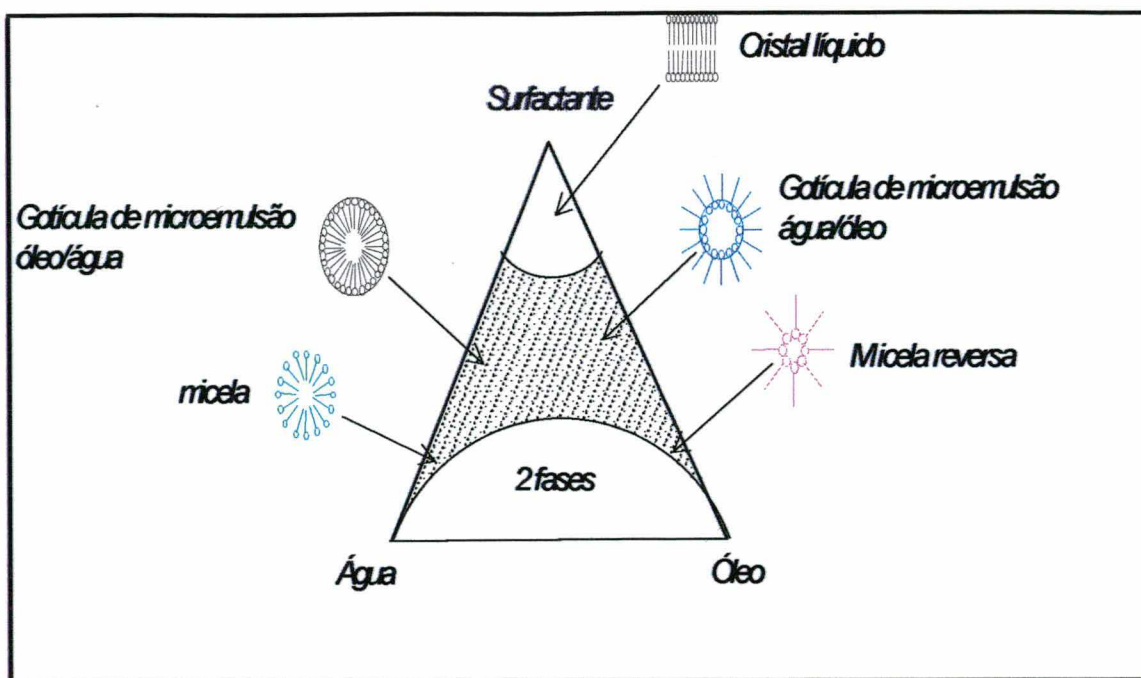


Figura 10 - Diagrama de fases para sistemas água/óleo/surfactante. A região escura representa o domínio da microemulsão.⁹⁵

Haering e Luise⁹⁶ descreveram o efeito da solubilização de gelatina em uma microemulsão água / óleo (W/O) na formação do organo-gel. O fenômeno de gelificação da solução, consiste em mais de 80% de solvente orgânico. Como a concentração de surfactante (AOT) é relativamente alta, a distância entre as micelas da microemulsão é pequena. Eles, então, propuseram que existia um contato intermicelar e a percolação da gelatina, já que esta se encontra em excesso na solução. As moléculas de gelatina ligariam uma micela a outra. Inicialmente, isto ocorre de maneira dinâmica e após a gelificação da gelatina na microfase aquosa todo o sistema ficaria rígido. A transição parece ser muito complexa, por necessitar de agitação constante para a formação do gel.

Quellet e col.⁹⁷⁻¹⁰⁰ estudando o mesmo sistema, descreveram o processo de gelificação em três etapas. Primeiramente, a gelatina se dissolveria no interior aquoso da micela e formaria o que denominaram de "nanogel". Num passo intermediário, haveria a percolação das nanofases e uma enorme

aglomeração de nanofases seria formada . Finalmente ocorreria a transição sol-gel, envolvendo as nanofases interconectadas por pontes de hélices tipo colágeno.

O organo-gel, é obtido pelo resfriamento de uma solução previamente aquecida a 55°C de Aerosol-OT (sulfosuccinato sódico de bis-2-etilexila) em solvente orgânico (hexano, heptano) e uma solução aquosa de gelatina. O sistema final é um gel homogêneo, cuja consistência e propriedades físicas dependem da concentração relativa de gelatina e água. Vários estudos foram realizados na tentativa de se compreender este novo sistema.

Atkinson e col. propuseram uma estrutura para o sistema organo-gel ou MBG (do inglês “microemulsion-based gels”). A estrutura proposta por Atkinson se forma através de uma mudança na microestrutura da microemulsão quando a mesma é gelificada. Isto é, ocorre a formação de uma extensa rede de canais de gelatina e água rodeadas por uma camada de surfactante e, esta estrutura deverá estar em equilíbrio com as gotas da solução micelar **(Figura 11)**.^{101,102}

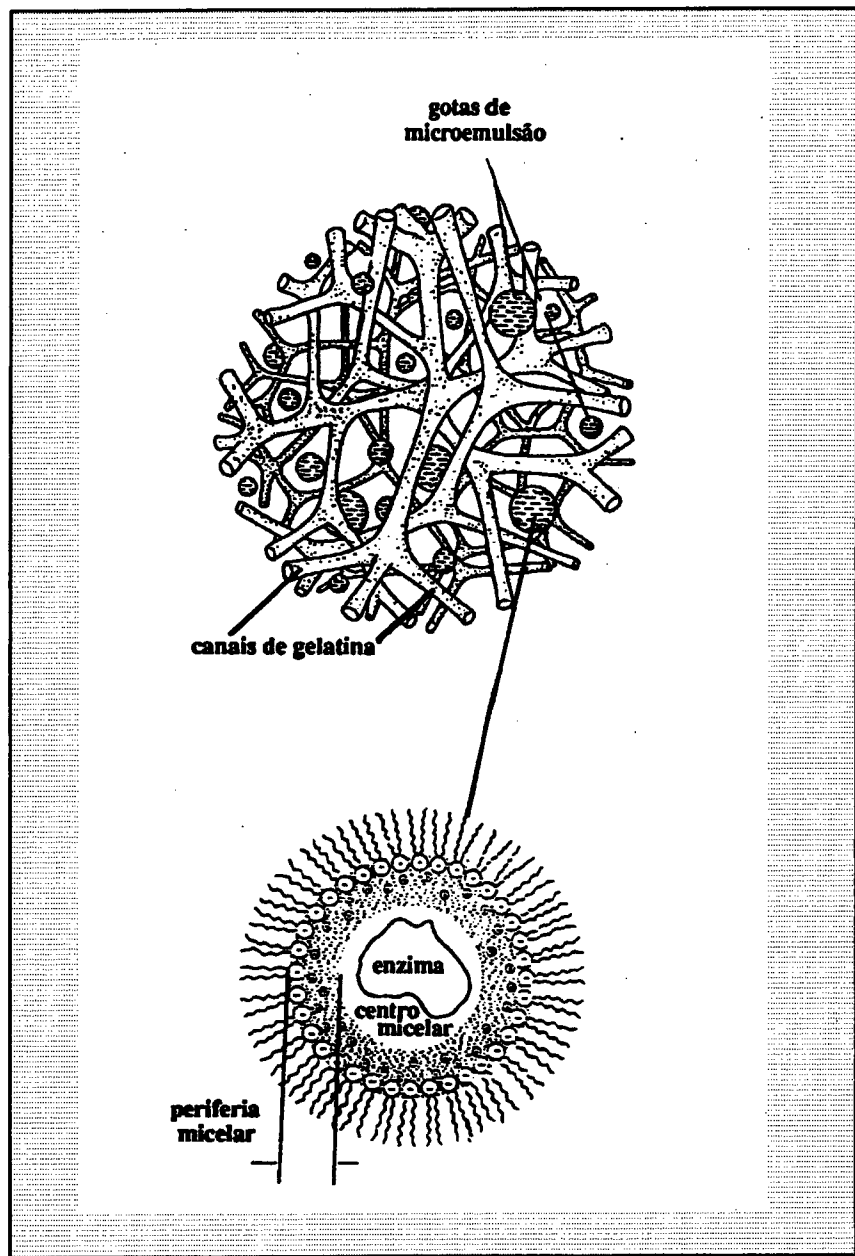


Figura 11- Modelo proposto para a estrutura do organo-gel

Na última década, foi demonstrado que enzimas podem ser imobilizadas no organo-gel, e utilizadas para catálise enzimática em meio orgânico.¹⁰³⁻¹⁰⁹

O uso do sistema de organo-gel consiste portanto em uma alternativa para a imobilização de enzimas, bem como sua utilização na catálise enzimática em meio orgânico.

1.3. - Quiralidade e Atividade Biológica

A existência de enzimas e receptores estereoespecíficos no organismo conduz às características biológicas diferentes para as estruturas quirais. O resultado desta ação estereosseletiva pelos receptores protéicos é devido a ocupação preferencial de um sítio receptor por um dos enantiômeros. Como consequência direta tem-se as mais diversas respostas biológicas para os estereoisômeros. A **Tabela 1** mostra alguns exemplos de atividades biológicas exercidas por algumas drogas enantioméricamente puras e seus respectivos efeitos biológicos.¹⁹

Tabela 1 - Exemplos de atividades biológicas exercidas por formas enantioméricas puras de algumas drogas.¹⁹

Fármacos	Efeitos
Etambutol	Forma <i>SS</i> : tuberculostático forma <i>RR</i> : pode provocar cegueira
Penicilamina	Forma <i>S</i> : anti-artrítico forma <i>R</i> : extremamente tóxico
Estrona	Forma (+) : hormônio estrogênico forma (-) : inativo
adrenalina	a forma levógira é 20 vezes mais ativa e igualmente mais tóxica
talidomida	Forma <i>R</i> : sedativo forma <i>S</i> : teratogênico
salbutamol	Forma <i>R</i> (-) é 80 vezes mais ativo que a forma <i>S</i> (+)
bupivacaína	Forma (\pm) : ambos os isômeros possuem atividade anestésica local, mas apenas os isômeros (-) apresenta ação vasoconstritora, prolongando assim a ação anestésica local.
anfetamina	a forma dextrógira é 2 vezes mais ativa que o enantiômetro (-)
indacrinosa	Forma (+) : ação diurética e retenção do ácido úrico Forma (-) : efeito uricosúrico
clorfeniramina	A atividade anti-histamínica é devida essencialmente à configuração <i>S</i> (+).

Atualmente a “Food and Drug Administration” (FDA)-USA e outros órgãos semelhantes da comunidade Européia e do Japão estabeleceram novos protocolos que devem ser seguidos para a liberação de uma nova droga, em especial se sua estrutura é quiral. O uso de uma mistura racêmica para novos medicamentos só é permitida se todos os ensaios clínicos e toxicológicos forem realizados com cada enantiômero isoladamente e comparados com aqueles envolvendo a mistura racêmica.¹⁸ Portanto a aplicação da resolução enzimática na indústria farmacêutica é promissora e extensa.

1.4 - Determinação da Enantiosseletividade das Enzimas

Quando uma reação que leva a formação de enantiômeros provoca a preponderância de um sobre a sua imagem especular, a reação se diz enantiosseletiva. A fim de que a reação seja enantiosseletiva, é preciso que haja a influência de um reagente ou de um solvente ou ainda de catalisadores que sejam quirais.

Na natureza, onde a maioria das reações são enantiosseletivas, as influências quirais provém de moléculas de proteínas denominadas enzimas. As enzimas não só tem a capacidade de acelerar enormemente as reações, que seriam muito lentas na sua ausência, mas tem também a capacidade de exercer espetacular influência quiral sobre a reação. As enzimas tem esta propriedade por serem, elas próprias, quirais e possuem sítios ativos onde as moléculas do reagente ligam-se, momentaneamente, durante a reação. Estes sítios ativos são quirais e somente um dos enantiômeros ajusta-se ao mesmo e pode sofrer a reação. A formulação de expressões efetivas para determinação dos três parâmetros chaves são descritos na literatura.¹¹⁰ a) a extensão de conversão de substratos racêmicos; b) a pureza óptica, expressa como excesso enantiomérico

(ee) do produto ou do substrato que permanece sem reagir e; c) a razão enantiomérica (**E**).

O rendimento químico máximo de uma resolução cinética biocatalítica é 50% para cada enantiômero, isto é, quando apenas um dos enantiômeros tem reagido completamente. O resultado do processo é descrito pelo excesso enantiomérico do produto (ee_p) e do substrato que não reagiu (ee_s), sendo o rendimento fornecido pelo grau de conversão da reação (c).

A razão enantiomérica (**E**) é um parâmetro que está relacionado com o excesso enantiomérico e o grau de conversão. Em resolução biocatalítica ela é definida como a razão de k_{cat}/K_M para dois enantiômeros. Enquanto o excesso enantiomérico é uma propriedade do produto, a razão enantiomérica é característica do processo. A razão enantiomérica descreve a enantiosseletividade ou melhor a enantioespecificidade de um certo substrato e uma enzima específica, sob condições físicas particulares (solvente, temperatura, pH, etc.). Para um processo irreversível, tal como hidrólise biocatalítica, pode-se determinar **E** quando ee_s, ee_p e c são medidos, utilizando as Equações 4,5 e 6.¹¹¹

$$C = \frac{ee}{ee_s + ee_p} \quad \text{eq.4}$$

$$E = \frac{\ln [(1 - c) (1 - ee_s)]}{\ln [(1 - c) (1 + ee_s)]} \quad \text{eq. 5}$$

$$E = \frac{\ln [(1 - c) (1 + ee_p)]}{\ln [(1 - c) (1 - ee_p)]} \quad \text{eq. 6}$$

Reações de transesterificação ou esterificação catalisada por lipases em sistema bifásico (água/ solvente orgânico) ou meio orgânico anidro também obedecem a equação homocompetitiva convencional quando esta é irreversível. No início do estágio da reação, pouco produto é formado, sendo que, normalmente a reversibilidade da reação torna-se um problema significativo somente quando a conversão está ao redor de 40%, ou maior.

As reações enzimáticas de esterificação ou transesterificação em meio aquoso ou em sistema bifásico (água/solvente orgânico) são reações de equilíbrio, visto que são utilizadas grandes quantidades de água. Quando são utilizadas lipases imobilizadas em organo-gel para efetuar estas conversões em solventes orgânicos, elas são mais seletivas, pois são utilizadas pequenas quantidades de água. Portanto, não existe o problema de competitividade de reação quando esta é irreversível.¹¹²

1.5 - Métodos Analíticos Aplicados na Determinação do Excesso Enantiomérico de Compostos Opticamente Ativos.

Como os enantiômeros não apresentam diferenças físicas e nem químicas, não podem ser analisadas pelos métodos comuns. Estes estereoisômeros necessitam ser analisados por técnicas analíticas especiais, tanto

do ponto de vista qualitativos como quantitativos. Alguns métodos empregados na análise de enantiômeros serão citados a seguir:¹⁹

- Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gás-Líquido (CGL);
- Birrefringência circular e dispersão óptica rotatória (ORD: Optical Rotatory Dispersion);
- Dicroísmo Circular (CD: Circular Dichroism).
- Rotação óptica (α)

A técnica utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi a polarimetria, um dos métodos clássicos espectrais para a determinação do excesso enantiomérico ou pureza óptica de uma amostra.

Ainda, é o mais simples e mais utilizado para se determinar a pureza óptica de um líquido, gás ou solução de um composto opticamente ativo. Mede-se empregando um polarímetro que consiste basicamente em dois prismas de Nicol, um atuando como polarizador e outro como analisador. Essa técnica possui o inconveniente de exigir uma quantidade relativamente grande de amostra (da ordem de mg), o que às vezes não é disponível, podendo ser usado também para a análise qualitativa de um dado composto.⁶

Assim, utilizando-se um polarímetro, determina-se o ângulo do desvio da luz polarizada provocada por uma amostra (rotação óptica). Uma vez determinada a rotação óptica experimental, esta é convertida para rotação óptica específica pela **Equação 7**.

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

eq. 7

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

α = rotação óptica observada

l = comprimento da cela polarimétrica, em decímetros

c = concentração da solução, em gramas de soluto por mililitro de solução (para um líquido puro, substituir a densidade em g/mL)

Através da rotação óptica específica da amostra, pode-se determinar a pureza ótica (e.e.) pela relação entre a calculada, determinada experimentalmente, e a do enantiômero puro encontrado na literatura.¹¹²

1.6 - DIFUSÃO

1.6.1 - Definição de Difusão

Difusão significa o movimento de uma partícula para, ao acaso, colidir com outras partículas sendo um fenômeno físico-químico de grande importância prática e teórica. A difusão pode ser responsável pelas alterações ocorridas nas velocidades de muitas reações químicas, constituindo um processo espontâneo de transporte de massa num sistema físico-químico, por efeito do gradiente de concentração.¹¹³

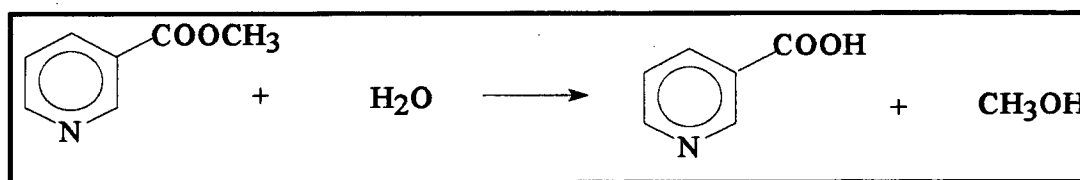
1.6.2 - Liberação de Drogas em Sistema Biológico Controlada por Difusão

Durante os últimos anos vários trabalhos foram concentrados no desenvolvimento de uma técnica para controlar o desprendimento de drogas nos organismos vivos em quantidades desejadas.^{114,115} Assim, tais drogas desprendidas fornecem um sistema em que a velocidade de liberação é

controlada e determinada de acordo com as quantidades desejadas, ficando insensível às variações biológicas.¹¹⁶

Uma das técnicas mais bem sucedidas e de grande importância no procedimento para uma forma correta de dosagem foi o uso do processo de difusão para o controle da velocidade de desprendimento da droga.¹¹⁷

Muitas reações químicas em sistemas biológicos ou de interesse industrial podem ser controladas por difusão, sendo que estas envolvem um transporte de massa de um determinado substrato por efeito de um gradiente de concentração.¹¹⁶ Por exemplo, a reação de hidrólise do nicotinato de metila foi estudada em sistema bifásico (água e tetracloreto de carbono) e a sua velocidade foi controlada pelo transporte do substrato até a interface, por difusão, obtendo-se assim o ácido nicotínico e o metanol (**Esquema VI**).



Esquema VI

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

Durante muitos anos a indústria vem utilizando para a encapsulação de drogas gel de gelatina (softgel). Alguns produtos farmacêuticos tais como a Nifedina, Ciclosporina e Termazepam já tiveram uma boa aceitação no mercado, quando encapsuladas em gel.¹¹⁸

Essencialmente um "softgel" fornece uma solução ou suspensão da droga dentro da cápsula do gel. Através da ruptura da cápsula no gastro-intestinal, o conteúdo interno se espalha livremente. Drogas solubilizadas em "softgel"

podem ter uma velocidade de adsorção superior e ser de grande biodisponibilidade se compararmos com a forma de distribuição tradicional.¹¹⁸

1.6.3 - Determinação do Coeficiente de Difusão

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

Em 1976, Moskovits e Darewlany¹¹⁹ descreveram um trabalho que relata um experimento no qual uma solução concentrada foi colocada no interior de uma bolsa de diálise. A bolsa foi suspensa em um grande volume de solvente, com agitação lenta. Com o passar do tempo eles observaram um aumento na concentração do soluto, no solvente ao qual a bolsa de diálise estava exposta. Com estes dados eles determinaram o coeficiente de difusão. A desvantagem deste experimento é que a quantidade medida não é o coeficiente de difusão simples, mas o coeficiente de permeabilidade da membrana de diálise. Assim não é possível comparar estes dados com os da literatura. Em 1980, Irina¹²⁰ relatou uma metodologia experimental, usando um espectrofotômetro e um calorímetro para a determinação do coeficiente de difusão de vários sais (KNO_3 , AgNO_3 , LiNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em água. A difusão dos cristais em água foi acompanhada através da absorção máxima dos sais. A maior desvantagem deste método é a demora na realização do experimento, que requer cerca de 40 horas, desde o início até o término do processo.

Mais tarde, Crooks¹²¹ desenvolveu uma metodologia para determinar o coeficiente de difusão do azul do bromofenol em gel de ágar, consistindo basicamente na leitura de absorbância de aliquotas de amostras do solvente a 590 nm, que é região de absorção máxima do azul do bromofenol. Esta técnica foi utilizada para o desenvolvimento deste trabalho.¹²¹

O coeficiente de difusão pode ainda ser medido utilizando outras técnicas diferentes. Entre os métodos mais comumente usados estão a cela de diafragma¹²², RMN¹²² e dispersão Taylor-Aris.¹²²⁻¹²⁴

1.7 - OBJETIVOS

1.7.1 - Objetivo Geral

Afim de poder contribuir para a aplicação de enzimas em síntese orgânica, tem-se como objetivo geral avaliar a estabilidade, atividade e estereosseletividade das enzimas imobilizadas em organo-gel nas reações de transesterificação em meio orgânico, bem como quantificar a velocidade de difusão de alcanoatos de p-nitrofenila e de benzoatos de alquila quando estes passam do organo-gel para o solvente externo.

1.7.2 - Objetivos Específicos

1.7.2.1 - Imobilizar lipase de *Chromobacterium viscosum* (C.V.lipase), Lipolase e lipase de *Pseudomonas sp* em organo-gel e aplicá-las na resolução enantiosseletiva em reações de transesterificação;

1.7.2.2 - Avaliar efeitos do comprimento da cadeia hidrocarbônica dos álcoois e dos ésteres nas reações de transesterificação catalisadas por lipases imobilizadas em organo-gel, bem como a utilização de diferentes solventes orgânicos nestas reações;

1.7.2.3 - Avaliar o efeito da temperatura nas reações de transesterificação dos alcanoatos de p-nitrofenila com álcoois racêmicos secundários;

- 1.7.2.4 - Quantificar o grau de impedimento imposto pelas barreiras difusionais encontrados pelos ésteres (alcanoatos de p-nitrofenila) quando estes passam do organo-gel para o solvente externo através de medidas de coeficiente de difusão (D);
- 1.7.2.5 - Avaliar o efeito da temperatura na determinação do coeficiente de difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano.

PARTE EXPERIMENTAL:**2.1 - Materiais e Métodos**

As enzimas utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram a lipase de *Chromobacterium viscosum* (*C.V. lipase*) (Genzyme Biochemical Ltd), com atividade específica de 3970 unidades/mg de sólido, Lipase de *Pseudomonas* sp (Genzyme Biochemical Ltd), com atividade específica de 1900 unidades/mg de sólido, Lipase Microbial (Genzyme Biochemical Ltd), com atividade específica de 1600 unidades/mg de sólido, *Lipolase* (Novo Nordisk Ltd), com atividade específica 100 KLU/G*. Os solventes hexano, heptano, cicloexano, 1,4-dioxano, dodecano e acetonitrila foram todos de pureza analítica. Foram também utilizados solventes e substratos comerciais, purificados quando necessário. Os benzoatos de alquila foram preparados de acordo com a literatura e caracterizados por IV e RMN¹H. Os ésteres laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila foram adquiridos comercialmente pela Sigma Chemical CO. O surfactante Aerosol O-T (sulfosuccinato sódico de bis-2-etilhexila) (D-0885 lote 120H0456) e a gelatina em pó (tipo A: Bloom 300) foram também adquiridos comercialmente pela Sigma. A sílica para cromatografia em coluna (70-230 mesh) e em placa de camada delgada, foi adquirido comercialmente pela Merck. As vidrarias foram de Pyrex, e os demais reagentes utilizados eram de pureza analítica. Para efetuar as reações foi utilizado um banho maria tipo Dubnoff TE 093 da Tecnal.

2.2 - Caracterização dos Compostos

Os ésteres (produtos) obtidos nas reações de transesterificação catalisadas

*Uma unidade de lipase (LU) é definida como a quantidade de enzima que libera 1micromol de ácido butírico por minuto sob as condições padrão, ou seja pH = 7,0; 30°C; 4,8% (w/v) tributirina e 0,095% (w/v) de goma arábica.

por enzimas (lipases) imobilizadas em MBG e os benzoatos de alquilas obtidos segundo método clássico da literatura, foram caracterizados por técnicas espectroscópicas. Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo FT-IR 16PC.

Os espectros de RMN¹H foram obtidos em um espectrômetro Bruker AC 200 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Estudos cinéticos foram realizados em um espectrofotômetro modelo Beckman DU-65. As medidas de rotação óptica foram determinadas em um polarímetro modelo Polartronic E da Schmidt e Haensch.

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

2.3 - Enzimas Imobilizadas em Organo-gel

2.3.1 - Preparação do Organo-gel^{125,126}

O organo-gel (MBG) foi preparado pela adição de uma solução de Aerosol-OT em hexano a 55°C a uma segunda solução de gelatina em água também a 55°C^{103,104}. A mistura foi então agitada vigorosa e manualmente, e deixada esfriar a temperatura ambiente para formar um gel rígido e estável. A composição do organo-gel utilizado foi a seguinte: 1,40g de gelatina, 2,15 mL de água destilada, 4,00 mL de solução de Aerosol-OT 0,5M, e 2,20 mL do solvente hexano ($W_0 = 59,72$). A microemulsão água-óleo contendo a enzima foi preparada injetando 0,25 mL de uma solução aquosa de enzima com concentração de 10 mg/mL, quando a enzima era sólida e 0,5 mL quando a enzima se apresentava em solução aquosa, na solução de Aerosol-OT. Após estabilização a temperatura ambiente, os géis foram armazenados em “freezer” por 24h no mínimo para serem utilizados posteriormente nas reações

(Figura 12). Géis controle, isto é, sem enzima imobilizada também foram preparados.

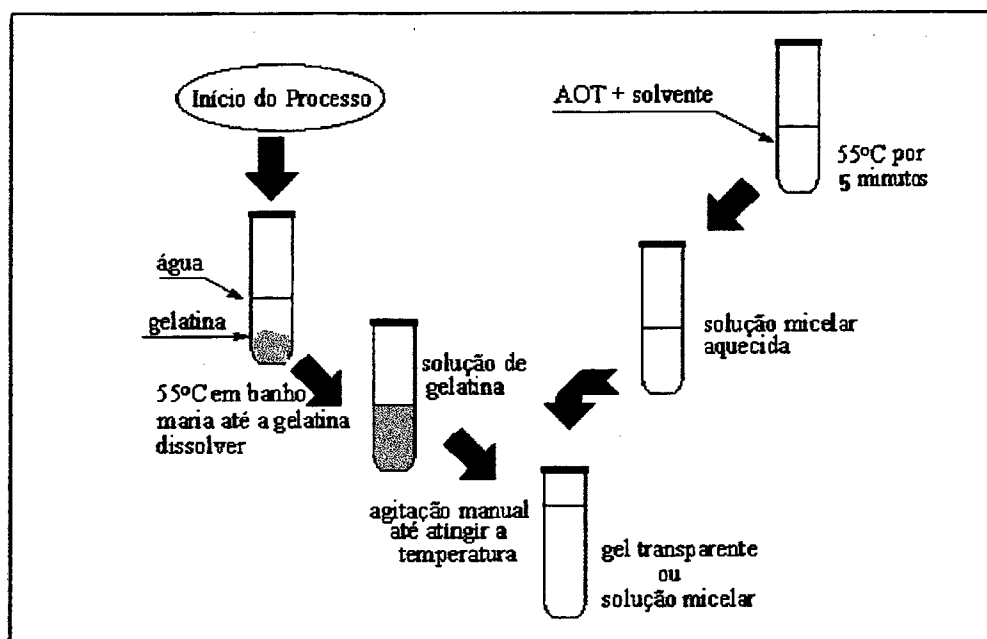


Figura 12 - Preparação do organo-gel

2.3.2 - Preparação do Meio Reacional

Os géis contendo enzima imobilizada foram retirados do “freezer”, rapidamente separados dos tubos de ensaio, e cortados em secções regulares de $\cong 125 \text{ mm}^3$, e então removidos para um Erlenmeyer contendo 30 mL de hexano, estando assim prontos para serem utilizados nas reações de transesterificação em meio orgânico (Figura 13).

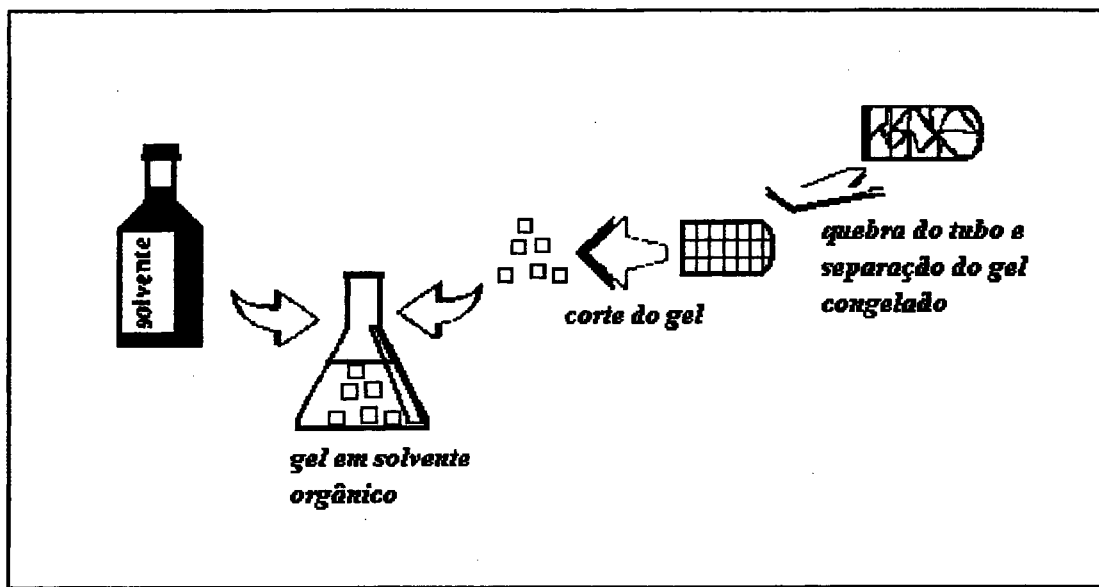


Figura 13 - Preparação do meio reacional do sistema organo-gel.

As reações de transesterificação foram realizadas adicionando em um Erlenmeyer de 125 mL, 30 mL de hexano ou acetonitrila, quantidades equimolares dos reagentes (geralmente 0,02 mol de cada) e 10g do organo-gel contendo 10 mg de lipase de *Chromobacterium viscosum*, *Lipolase, Microbial, Pseudomonas sp*, imobilizada em organo-gel (**Figura 14**).

As reações de transesterificação dos alcanatos de p-nitrofenila com os álcoois alifáticos primários e secundários racêmicos foram efetuadas sob agitação em um banho-maria tipo Dubnoff termostatizado a 25°C (**Figura 15**), acompanhadas por ccd (cromatografia de camada delgada) e RMN¹H, por aliquotas que foram periodicamente retiradas da mistura reacional. As mesmas foram geralmente interrompidas quando o grau de conversão se aproximou de 50%, ou quando já estavam reagindo por um período de 7 dias quando o solvente externo foi o hexano, e um período de 15 dias quando o solvente externo foi acetonitrila. Os ésteres, formados pela reação de transesterificação

dos alcenoatos de p-nitrofenila com os álcoois alifáticos primários e secundários racêmicos, foram isolados por cromatografia em coluna com sílica gel 60 (70-230 mesh) utilizando como eluente hexano:acetato de etila (15:1). Os excessos enantioméricos foram determinados por comparação das rotações ópticas específicas dos ésteres determinados experimentalmente com os valores reportados na literatura.

Todas as reações realizadas neste trabalho foram também efetuadas nas mesmas condições experimentais utilizando géis controle, isto é, sem enzima imobilizada, não observando reação nos períodos nos quais se realizaram os experimentos.

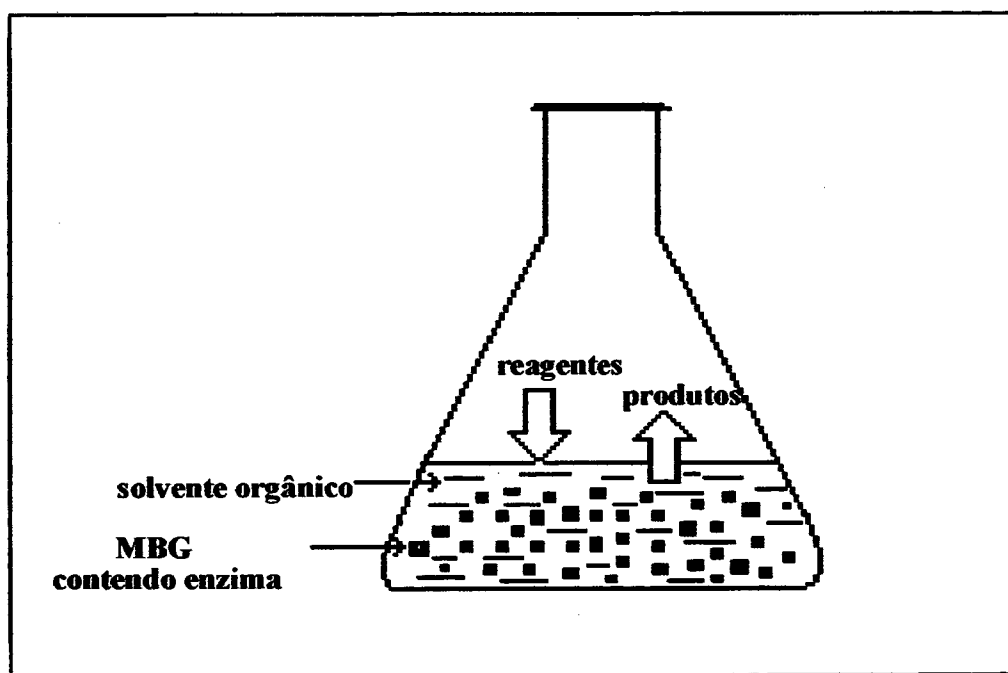


Figura 14 - Sistema de organo-gel (MBG) utilizado para realizar as reações de transesterificação.

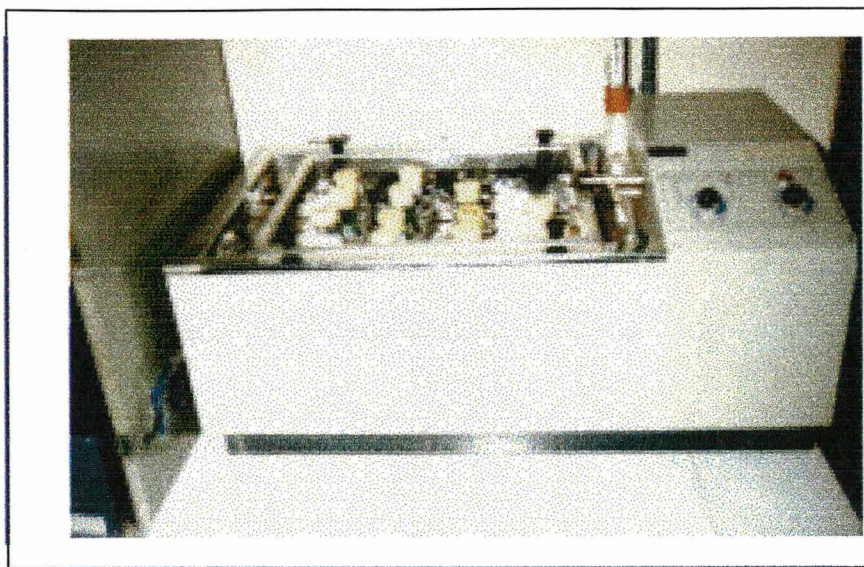


Figura 15 - Dubnoff TE 093 da Tecnal termostatzado, utilizado nas reações de Transesterificação.

2.4 - Estudos Cinéticos

As cinéticas das reações de transesterificação do laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila com os álcoois (\pm)-2-butanol, (\pm)-2-hexanol, (\pm)-2-octanol e cicloexanol, foram acompanhadas espectrofotometricamente a 25°C. Todas reações foram seguidas observando-se a formação de um dos produtos da reação, p-nitrofenol, em 307 nm.

As concentrações dos alcenoatos de p-nitrofenila foram de $1,0 \times 10^{-4}M$, enquanto as dos álcoois foram de $5,0 \times 10^{-3}M$, estando portanto os álcoois em excesso com relação ao éster. Nestas condições a reação é de pseudo-primeira ordem.

As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram calculadas usando-se um programa interativo de computador, conforme a **Equação 8**.

$$k_{\text{obs}} = \ln (A_{t\infty} - A_{tx}) / tx \quad \text{eq. 8}$$

onde:

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

A_{tx} = absorvância do produto (p-nitrofenol) no tempo "x"

tx = tempo "x" em segundos.

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

As cinéticas das reações de transesterificação dos alcenoatos de p-nitrofenila com os álcoois secundários racêmicos foram acompanhadas à 20°C, 25°C e 30°C.

2.5 - Medidas do Coeficiente de Difusão

2.5.1 - Preparação da Coluna de Difusão

Para medir os coeficientes de difusão (**D**) foram utilizados tubos de paredes grossas e sem fundo com aproximadamente 13 cm de comprimento e 1,9 cm de diâmetro, apropriados para reter o gel, conforme mostrada na **Figura 16**.

O organo-gel utilizado nas medidas de coeficiente de difusão dos alcenoatos de p-nitrofenila, foi preparado conforme o procedimento descrito no item 2.3.1:

Os ésteres, benzoatos de alquila, laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila de concentração inicial 0,1M foram dissolvidos no solvente orgânico (hexano, heptano ou cicloexano) o qual foi adicionado para fazer o

gel. A concentração final dos ésteres foi de 0,01M. O organo-gel, após alguns minutos de agitação, mas ainda no "estado líquido", foi colocado no tubo citado acima, que tinha sido previamente colocado na posição vertical sobre uma pequena placa de petri.

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

Em seguida, selou-se com parafilme a abertura superior do tubo para evitar a evaporação do solvente, e este foi deixado esfriar a temperatura ambiente. Posteriormente colocou-se na geladeira, e após o gel estar totalmente congelado, procedeu-se a leitura do coeficiente de difusão.

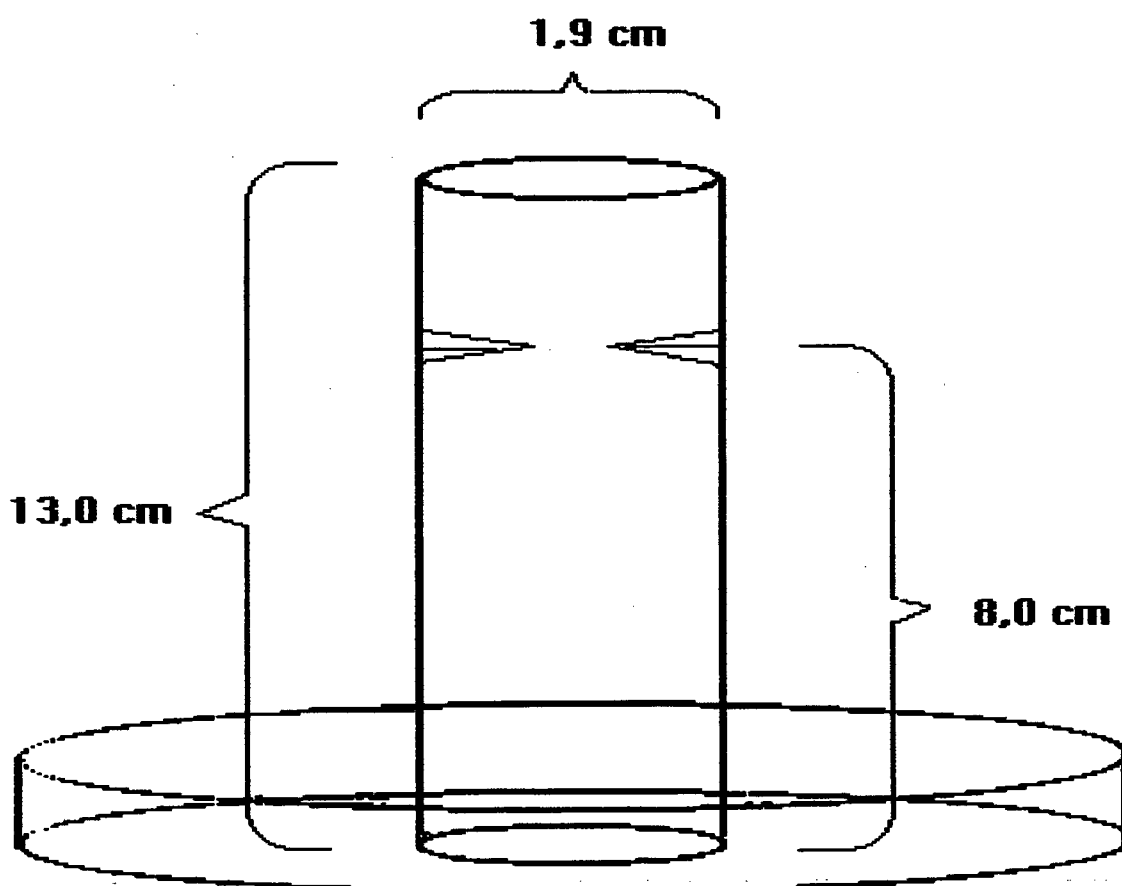


Figura 16 - Tubo de vidro utilizado nas medidas experimentais do coeficiente de difusão dos alcanatois de p-nitrofenila em organo-gel a 25°C.

2.5.2 - Medidas Experimentais de Coeficientes de Difusão em Organo-Gel

O procedimento geral de medidas dos coeficientes de difusão está representado esquematicamente na **Figura 17**.

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

Os experimentos foram realizados utilizando-se como solvente externo hexano, heptano, cicloexano, dodecano, 1,4-dioxano e acetonitrila em diferentes temperaturas à 20°C, 25°C e 30°C.

O solvente (externo) do becker foi mantido constantemente sob agitação magnética. Amostras do solvente foram retiradas em intervalos de tempo determinados e fez-se as leituras das absorbâncias em 226 nm, comprimento de onda de absorção máxima dos benzoatos de alquila e 265 nm, comprimento de onda de absorção máxima dos alcanos de p-nitrofenila.

Os valores das absorbâncias, de cada um dos experimentos, foram tratados matematicamente de acordo as **Equações 9 e 10**.¹²⁰ A partir deste tratamento matemático, obteve-se a **Figura 17** que mostram a fração difundida dos correspondentes ésteres (M_t/M_o) em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$), em organo-géis e diferentes solventes externos.

$$M_t/M_o = (A_t/A_o) (V_t^f/ V_t^i) (V_o^i/ V_o^f)$$

eq.9

onde:

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

A_t = absorvância no tempo t

A_0 = absorvância da solução do substrato para determinar A_0 .

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

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

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

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

Os resultados dos cálculos, utilizando a equação 9 foram então representados graficamente nas curvas por M_t/M_0 em função de $t^{1/2}$, que respeitam a **Equação 10**:

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

eq. 10

onde:

D = Coeficiente de difusão

L = comprimento do gel no cilindro

Aplicou-se uma regressão linear de primeira ordem na **Equação 10**, e obteve-se o valor do coeficiente de difusão D em $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ para os diferentes ésteres e com os vários solventes orgânicos estudados.

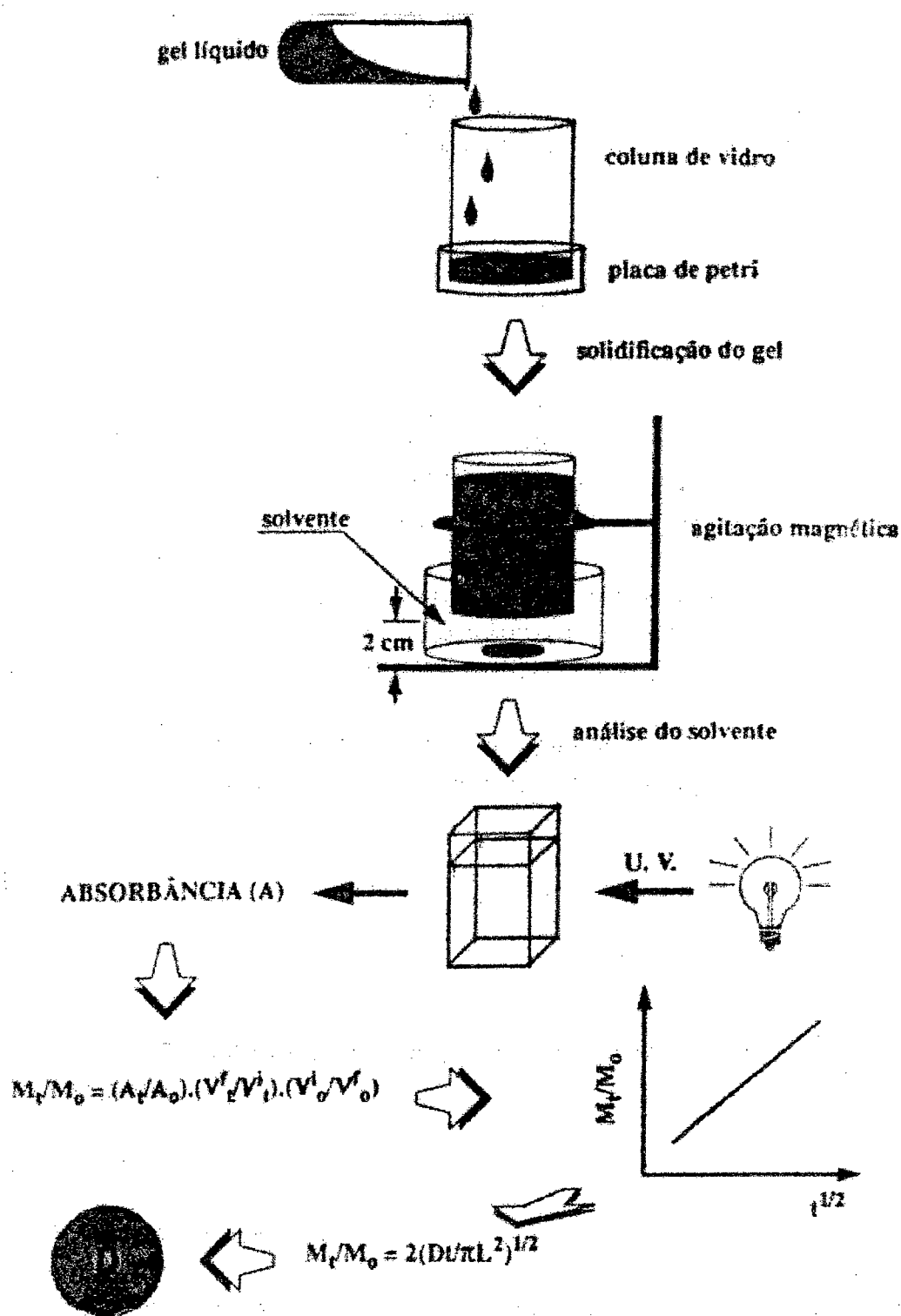
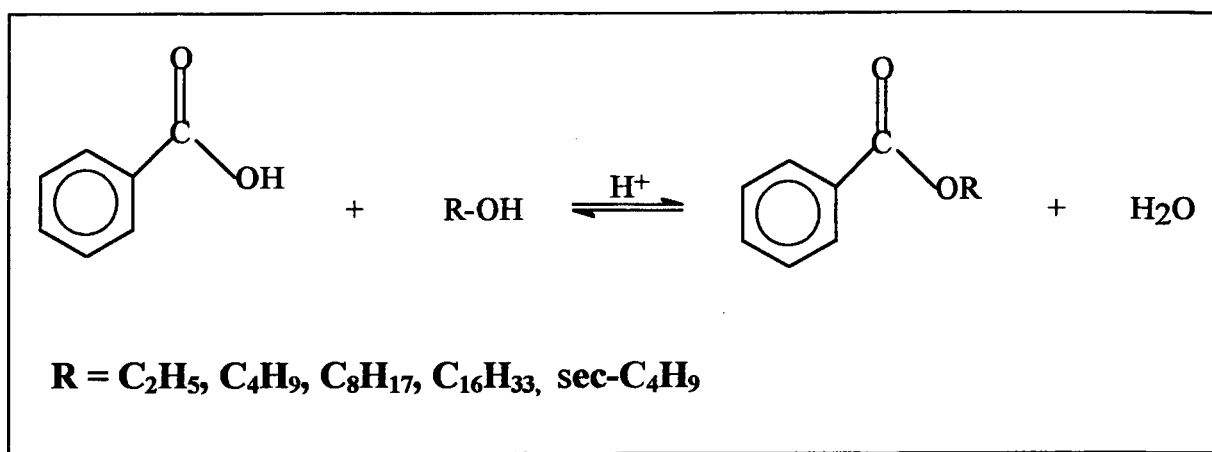


Figura 17 - Procedimento experimental utilizado para as medidas dos coeficientes de difusão dos ésteres em organo-gel.

2.6 - Preparação dos Benzoatos de Alquila

Os benzoatos de alquilas foram preparados segundo métodos clássicos da literatura.¹³⁴ Uma série de ésteres derivados do ácido benzóico foi preparada, utilizando-se álcoois com cadeias carbônicas variando de 4 a 16 átomos de carbono.

A reação de esterificação do ácido benzóico com diferentes álcoois, de maneira geral, pode ser representada conforme o Esquema VII .



Esquema VII

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

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

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

Os produtos assim obtidos, foram caracterizados por IV e RMN¹H, e de medidas do índice de refração (Tabela 10, página 92).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:

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

Todos os resultados obtidos nos experimentos feitos no laboratório, serão apresentados e discutidos, tenham sido eles bem sucedidos ou não. Esta abordagem foi adotada com o intuito de se executar um estudo razoavelmente completo do objeto da pesquisa. Assim, alguns aspectos que aparentemente possam parecer negativos, contribuíram sem dúvida para o entendimento das características do organo-gel e de sua utilização potencial em síntese orgânica.

Para uma melhor compreensão os resultados serão apresentados e discutidos em duas partes:

1ª Parte: Reações de transesterificação: Estudos cinéticos, resolução de álcoois secundários racêmicos e avaliação da atividade de diferentes lipases .

2ª Parte: Determinação do coeficiente de difusão de ésteres em organo-géis de hexano, heptano e cicloexano, em função da polaridade do solvente externo e da temperatura.

3.1 - Estudo Cinético Via Reações de Transesterificação Utilizando Enzimas Imobilizadas em MBG.

O mecanismo reacional de um sistema químico é geralmente proposto tendo por base uma análise cinética e termodinâmica dos valores de velocidades obtidas numa grande variedade de condições experimentais. Portanto, o principal objetivo do estudo cinético em reações de transesterificação catalisadas por enzimas

imobilizadas em MBG é de tentar propor um mecanismo provável e, só assim poder interpretar o comportamento dessas reações. De posse deste conhecimento pode-se intervir criteriosamente sobre o sistema reacional, quer por alterações de fatores externos (temperatura, pressão, etc.) ou por alterações de fatores internos (solvente, variação dos grupos substituintes nos substratos etc).

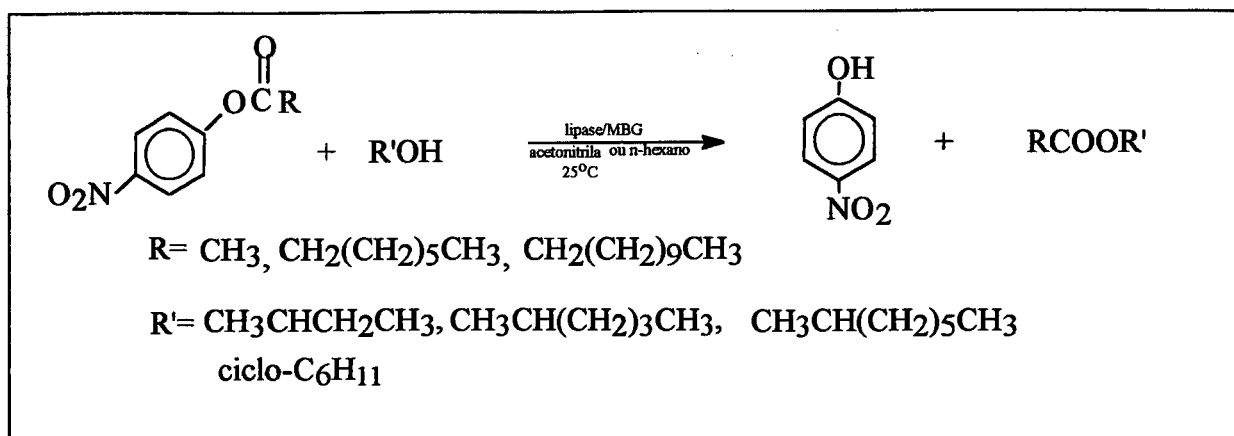
Através da análise cinética e termodinâmica das reações de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos, efetuou-se a resolução enantiosseletiva dos álcoois (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol, com C.V. lipase imobilizada em organo-gel.

3.1.1 - Reações de Transesterificação - Medidas Cinéticas

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

No presente trabalho, estudou-se a reação de transesterificação do laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila com diversos álcoois secundários racêmicos de cadeia carbônica variando em comprimento de 4 a 8 átomos de carbono. As reações foram efetuadas na presença de C.V. lipase imobilizada em organo-gel atuando como catalisador, a 25°C, utilizando como solvente externo a acetonitrila

As reações de transesterificação podem ser representadas de acordo com o Esquema VIII.



Esquema VIII

As reações de transesterificação, mostradas no **Esquema VIII**, foram acompanhadas pela formação do p-nitrofenol em função do tempo, cuja absorção máxima é em 307 nm.

As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram calculadas usando-se um programa interativo de computador que usa a Equação 8, página 43.

A partir dos dados experimentais de absorvância e de tempo, obtiveram-se gráficos de $\log (A_{t\infty} - A_{tX})$ em função do tempo t_X , cujos coeficientes angulares forneceram os valores de k_{obs} .

Os ensaios preliminares foram realizados utilizando-se como solvente externo o hexano havendo uma forte evidência de que a reação ocorreu, pois o organo-gel apresentou uma coloração amarela no seu interior. Este fato foi um indício da formação do p-nitrofenol, um dos produtos da reação de transesterificação. Porém, com este solvente, o p-nitrofenol não se difundiu do organo-gel para o solvente externo. Esta dificuldade de difusão deve-se ao fato da falta de ação de forças intermoleculares (por ex. interações dipolo-dipolo, transferência de cargas, etc.) possíveis entre o solvente (hexano) e o p-nitrofenol

A partir destes resultados, foram realizados alguns testes variando-se a polaridade do solvente com a finalidade de extrair o p-nitrofenol do interior do organo-gel. Os solventes utilizados foram os seguintes: heptano, cicloexano, clorofórmio, 1,4-dioxano e acetonitrila. O heptano e o cicloexano, análogos ao hexano em termos de polaridade não extraíram o p-nitrofenol do organo-gel para o solvente externo. Por outro lado, o clorofórmio destruiu completamente a estrutura macroscópica original do organo-gel.

Resultados análogos foram encontrados com a água, acetona e ácido acético.¹²⁴ Apenas a acetonitrila e 1,4-dioxano puderam ser utilizados como solvente externo na reação de transesterificação, o que pode estar relacionado com a capacidade destes solventes interagirem melhor com espécies iônicas ou dipolares. Estes solventes, por serem mais polares (menor valor log P) mostraram um comportamento mais efetivo nas interações intermoleculares específicas e não específicas como por exemplo as interações iônicas, interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e transferência de cargas, etc., resultando na difusão do p-nitrofenol para o solvente externo.

Os resultados obtidos das constantes de velocidade observadas para as reações de transesterificação dos alcenoatos de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos e o cicloexanol, estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Valores de constantes de velocidade observada (k_{obs}) para reação de transesterificação do laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila com diferentes álcoois secundários racêmicos e cicloexanol, catalisada pela *C.V. lipase* imobilizada em MBG de hexano a 25°C.

ésteres Álcoois	laurato de p-nitrofenila $k_{obs} \times 10^4, s^{-1(a)}$	octanoato de p-nitrofenila $k_{obs} \times 10^4, s^{-1(a)}$	acetato de p-nitrofenila $k_{obs} \times 10^5, s^{-1(a)}$
(±) 2-butanol	2,21	2,16	1,33
(±) 2-hexanol	2,70	2,33	2,70
(±) 2-octanol	3,31	2,71	7,40
cicloexanol	1,37	2,31	9,00

(a) solvente: acetonitrila, enzima: *C.V. lipase* imobilizada em MBG. Os valores dos coeficientes de correlação da reta de $\log (A_{\infty} - A_t)$ vs $t(s)$, foram sempre maiores que 0,99. Temperatura: 25°C. Os valores de k_{obs} apresentados são médias de dois experimentos.

Os dados de constante de velocidade obtidas (Tabela 2), mostram que a *C.V. lipase* é um catalisador efetivo nas reações de transesterificação dos alcanatoos de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos e o cicloexanol, independentemente do comprimento da cadeia do álcool e do solvente utilizado. Esta observação pode estar relacionada com atividade específica da enzima, uma vez que a *C.V. lipase* utilizada apresenta atividade específica 3970 unidades/mg de proteína. Resultados análogos foram obtidos por Jesus e colaboradores, com a *Pseudomonas sp* (1900 unidades/mg de proteína) e a *lipase Microbial* (1600 unidades/mg de proteína) na reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com álcoois alifáticos primários.¹²⁶ As reações foram também realizadas nas mesmas condições experimentais utilizando géis controle, ou seja, sem enzima

imobilizada, e não foram observadas as formações dos produtos nos períodos nos quais se realizaram os experimentos.

De maneira geral, foi observado que há uma diminuição no valor da constante de velocidade na reação de transesterificação do laurato e acetato de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos, a medida que são utilizados álcoois com cadeias hidrocarbônicas menores. Na reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com os diferentes álcoois estudados, os valores de k_{obs} foram praticamente constantes.

De acordo com a **Tabela 2**, o valor da constante de velocidade observada para a reação entre o laurato de p-nitrofenila e o (\pm)-2-octanol em acetonitrila com *C. V. lipase* imobilizada, é $3,31 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Utilizando octanoato e acetato de p-nitrofenila observou-se uma diminuição no valor da constante de velocidade observada, $2,71 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $7,40 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Observou-se também, um pequeno aumento na constante de velocidade (k_{obs}) com álcoois de cadeia carbônica maiores, independente do éster utilizado. Por exemplo, para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-butanol a constante de velocidade é igual a $2,21 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e com (\pm)-2-octanol é $3,31 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Já para a reação do octanoato de p-nitrofenila com (\pm)-2-butanol a constante de velocidade é igual a $2,16 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e com o (\pm)-2-octanol é $2,71 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

De maneira geral, seria de se esperar uma diminuição na constante de velocidade observada (k_{obs}) com o aumento da cadeia carbônica do álcool, independente do éster (alcanoato) utilizado. No entanto, com o aumento da cadeia alquílica do álcool observa-se um pequeno aumento de k_{obs} . Este aumento pode ser atribuído ao aumento da solubilidade destes substratos no meio reacional, ou seja, ocorre um aumento das interações hidrofóbicas entre o solvente, substrato e produtos formados. Com o aumento da solubilidade dos substratos, mais facilmente eles se aproximam da interface da microemulsão no sistema de organo-

gel onde se encontra o sítio ativo da enzima. Portanto, este aumento nos valores de k_{obs} pode estar relacionado com a facilidade que estes substratos tem para se encaixar no sítio catalítico da enzima e efetivar a catálise.

Para a reação de transesterificação dos alcenoatos de p-nitrofenila com o cicloexanol, postula-se que os baixos valores de k_{obs} podem ser atribuídos ao efeito de reconhecimento da enzima pela estrutura cíclica do álcool. Este álcool encontra-se mais impedido estericamente, e não se aloja efetivamente no centro ativo da enzima para que ocorra a catálise. Outro fato que pode interferir na aproximação do cicloexanol ao sítio ativo da enzima, é a interação da cadeia cíclica deste álcool com a parte apolar do surfactante impedindo desta forma a aproximação do centro nucleofílico do álcool na superfície da microemulsão no organo-gel, onde localiza-se o sítio ativo da enzima.

3.1.2 – Efeito da Temperatura na Reação do Laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol e (±)-2-hexanol - Determinação de Parâmetros Termodinâmicos

O efeito da temperatura foi estudado para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol e (±)-2-hexanol com acetonitrila como solvente externo e catalisada pela C.V. lipase imobilizada em organo-gel. A partir dos dados experimentais obtidos, foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos.

Estas reações foram também acompanhadas pela formação do p-nitrofenol, em 307 nm, para cada temperatura constante. Com a ajuda de um programa interativo de computador, foram calculadas as constantes de velocidade aparente (k_{obs}) para as reações de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com os

álcoois secundários racêmicos citados acima. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito da temperatura na constante de velocidade para a reação do laurato de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos, com C.V. lipase imobilizada em MBG.

Temperatura, K	(±) 2-octanol $10^4 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1} \text{ a}$	(±) 2-hexanol $10^4 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1} \text{ a}$
293,15	2,55	1,98
298,15	3,31	2,70
303,15	4,26	4,09

(a) Os valores de k_{obs} são médias de dois experimentos. Os coeficientes de correlação foram maiores do que 0,998

De modo análogo ao que ocorre para maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas geralmente aumenta com a temperatura. Neste trabalho, considerou-se uma faixa de temperatura na qual a enzima é estável e mantém sua atividade integral (20°C a 30°C).

Para temperaturas superiores a 30°C pode também ocorrer uma maior flexibilidade na estrutura polimérica da gelatina que forma o organo-gel. Além disto, o organo-gel perde sua rigidez e estabilidade, não sendo viável a realização do experimento em temperaturas superiores. Conforme citado anteriormente a enzima pode sofrer alguma desnaturação em temperaturas mais elevadas.

Observa-se pela Tabela 3 que a velocidade da reação teve um pequeno aumento na faixa de temperatura estudada, ou seja, de 20°C a 30°C.

Aplicando a equação linearizada de Arrhenius foi possível determinar a energia de ativação (E_a) para o processo.

Através de um gráfico de \ln do valor médio de k_{obs} versus $1/T$ (Equações 11 e 12), obtém-se o coeficiente angular da reta, que é igual a $-E_a/R$ (Figuras 18 e 19).

$$k_{\text{obs}} = A \cdot \exp^{-E_a/RT}$$

eq. 11

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln A - E_a/RT$$

eq. 12

onde,

E_a = energia de ativação (kcal/mol)

A = fator de frequência

R = constante dos gases = 1,980 cal. Kelvin⁻¹. mol⁻¹

T = temperatura absoluta (Kelvin)

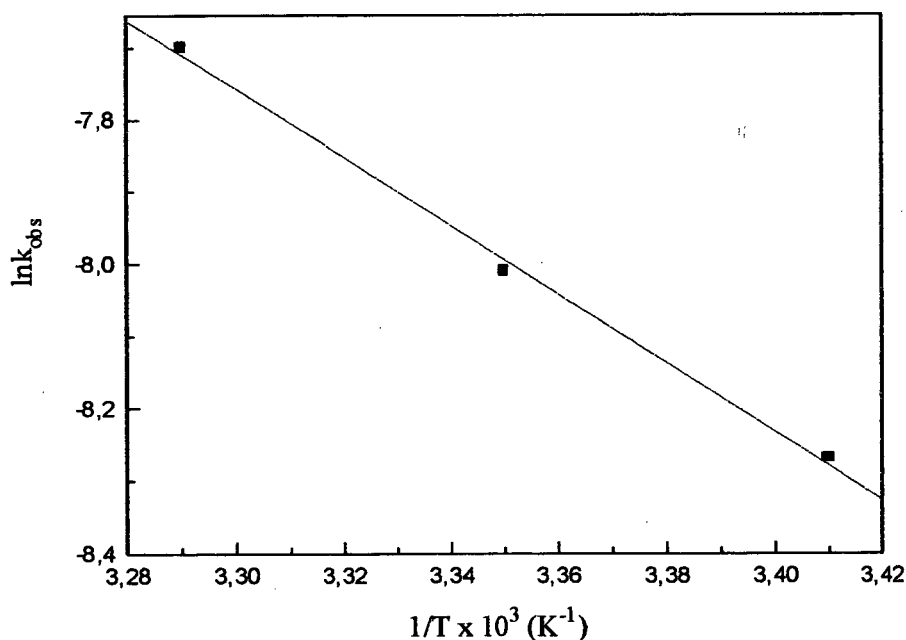


Figura 18 - Variação de k_{obs} em função da temperatura para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-octanol.

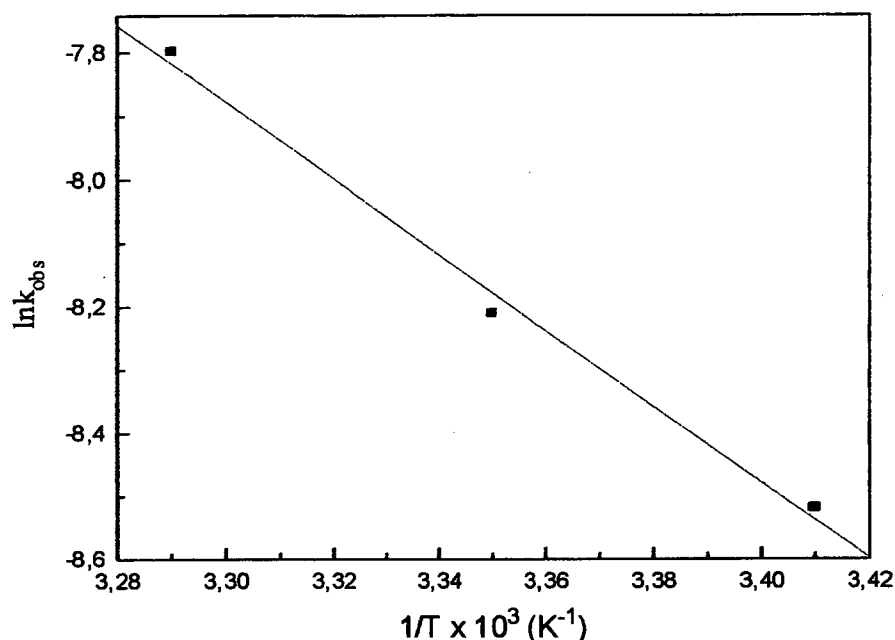


Figura 19 - Variação de k_{obs} em função da temperatura para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-hexanol.

O valor encontrado para a E_a , foi de **9,40 kcal/ mol** para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-octanol (coeficiente de correlação linear igual a 0,9982) e **11,8 kcal/ mol** para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-hexanol (coeficiente de correlação linear igual a 0,9961).

O valor baixo de energia de ativação indica que as reações catalisadas por enzimas imobilizadas em organo-gel são processos controlados por difusão.^{112, 127} A energia de ativação destes processos é baixa, pois somente a área externa do MBG é que influencia na velocidade da reação.¹¹² A título de comparação, Vecchia estudou a reação de esterificação do ácido oleico com pentanol-1, utilizando *C.V. lipase* imobilizadas em organo-gel e obteve os melhores rendimentos quando utilizou gel seccionado com volumes menores. Este resultado pode estar

relacionado com a maior área superficial externa de contato do MBG com os substratos, o que levou a formação de produtos com melhores rendimentos.¹²⁵

Aplicando a equação de Eyring, pode-se então determinar a entalpia de ativação (ΔH^\ddagger), a energia de ativação (ΔG^\ddagger) e a entropia de ativação (ΔS^\ddagger) para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com os álcoois secundários racêmicos (\pm) 2-octanol e (\pm) 2-hexanol (**Equação 13**).

$$k_{\text{obs}} = (k_B T)/h \cdot \exp^{\Delta S^\ddagger / R} \cdot \exp^{-\Delta H^\ddagger / RT} \quad \text{eq. 13}$$

onde:

k_B é a constante de Boltzmann = $1,38066 \times 10^{-3}$ Joule. Kelvin⁻¹

h é a constante de Planck = $6,626 \times 10^{-34}$ Joule. segundos

T é a temperatura absoluta, (Kelvin)

R é a constante dos gases = $8,314$ J/K.mol

A **Equação 13** linearizada fornece a **Equação 14** que permite o cálculo de ΔH^\ddagger , através do coeficiente angular.

$$\ln k_{\text{obs}} / T = \ln A - \Delta H^\ddagger / RT \quad \text{eq. 14}$$

As **Figuras 20 e 21**, mostram o gráfico de $\ln k_{\text{obs}} / T$ versus $1/T$ para a reação do laurato de p-nitrofenila com os álcoois secundários racêmicos, (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol. O valor de ΔH^\ddagger determinado através do coeficiente angular foi **7,92 kcal/ mol** (coeficiente de correlação linear igual a 0,9999) e **9,40 kcal/ mol**

(coeficiente de correlação linear igual a 0,9998) para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol e (±)-2-hexanol, respectivamente.

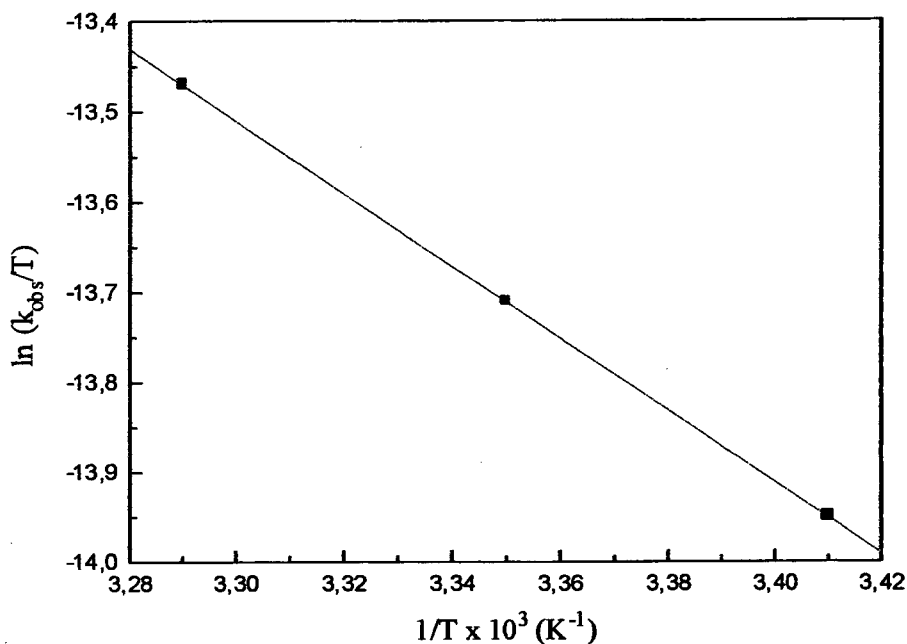


Figura 20 - Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ versus $1/T$ para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol, solvente acetonitrila e temperaturas de 20 à 30°C.

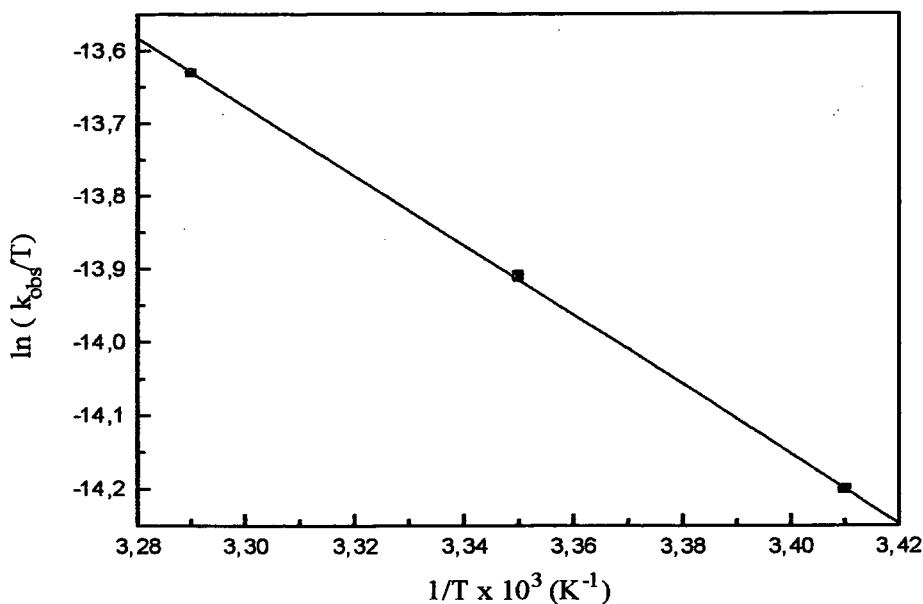


Figura 21 - Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ versus $1/T$ para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-hexanol, solvente acetonitrila e temperaturas de 20 à 30°C.

Os valores da energia livre de ativação (ΔG^\ddagger), podem ser calculados para as diferentes temperaturas nas quais realizaram-se os experimentos cinéticos, diretamente pela equação de Eyring, que pode ser rearranjada fornecendo a **Equação 15**.

$$\Delta G^\ddagger = RT \ln (k_B T / h \cdot k_{obs})$$

eq. 15

De acordo com a **Equação 15** os valores da energia livre de ativação (ΔG^\ddagger), podem ser calculados para cada temperatura (**Tabela 4**)

Tabela 4 - Valores da energia livre de ativação (ΔG^\ddagger) em diferentes temperaturas.

Temperatura (°K)	ΔG^\ddagger (Kcal.mol ⁻¹) ^a	ΔG^\ddagger (Kcal.mol ⁻¹) ^b
293,15	48,8	49,0
298,15	49,5	49,6
303,15	50,2	50,2

(a) energia livre de ativação para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol. (b) energia livre de ativação para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-hexanol.

Com os valores de ΔG^\ddagger (Tabela 4) encontrados para cada temperatura, fez-se a média geral. O valor médio de energia livre de ativação encontrado para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol foi de 49,5 kcal/mol, e para a reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-hexanol foi de 49,6 kcal/mol

Com o valor médio da energia de ativação, e com o valor da entalpia de ativação, encontrado pelo gráfico de Eyring, foi possível calcular a entropia de ativação, utilizando a Equação 16.

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\#$$

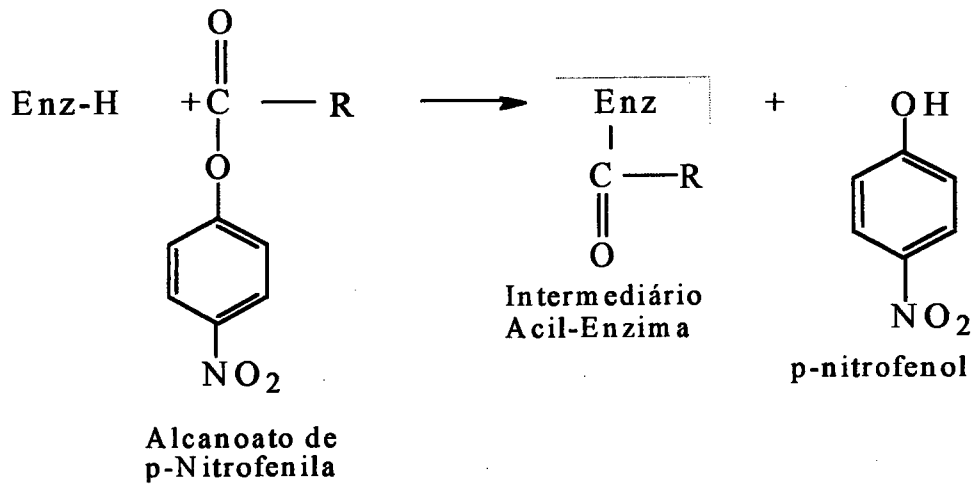
eq. 16

O valor de $\Delta S^\#$ encontrado foi de -142 cal/mol.K para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-octanol, e -137 cal/mol.K para a reação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-hexanol. Uma entropia de ativação negativa produzirá um fator de frequência muito baixo, sugerindo uma orientação específica do substrato com o sítio ativo da enzima na formação do estado de transição.

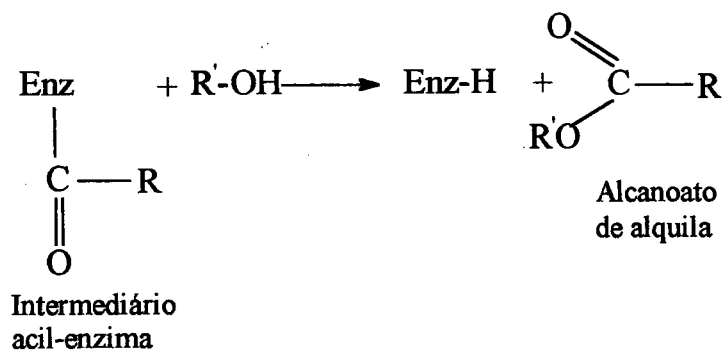
No caso do estudo das reações de transesterificação em organo-gel, deve-se também levar em consideração a influência da agitação, e da área superficial do gel (MBG) na velocidade da difusão do substrato para o meio reacional. Se forem consideradas que estas influências estão envolvidas no valor de k_{obs} , então a expressão de velocidade torna-se um pouco mais complexa e requer assim estudos mais detalhados para o sistema de organo-gel.

O mecanismo proposto para as reações de transesterificação dos alcanos de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos é mostrado abaixo. Através do mecanismo proposto o substrato, alcanos de p-nitrofenila, em uma primeira etapa combinam-se com a enzima, formando um complexo enzima-substrato. Em seguida, quebra-se a ligação éster deste substrato, e o p-nitrofenol é então liberado, enquanto que o grupamento acila do substrato fica ligado por ligação covalente. A seguir, o álcool ataca o complexo acil-enzima, liberando o alcenoato de alquila e regenerando a enzima, conforme mostrado no Esquema IX.

Primeira etapa:



Segunda etapa:



Esquema IX

Acredita-se que no sistema de organo-gel a entrada dos substratos até no interior da microestrutura da gelatina, onde encontra-se a microgota com a enzima

aprisionada, ocorra por difusão dos substratos do meio reacional para o interior. Sendo assim, a velocidade de formação dos produtos está relacionada com a velocidade de difusão.

A **Tabela 5** resume os dados dos parâmetros termodinâmicos obtidos neste trabalho, e que foram discutidos anteriormente.

Tabela 5 – Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com os álcoois secundários racêmicos (\pm)-2-hexanol e (\pm)-2-octanol.

álcoois	Ea (kcal/mol)	$\Delta H^\#$ (kcal/mol)	$\Delta G^\#$ (kcal/mol)	$\Delta S^\#$ (cal/mol)
(\pm)-2-hexanol	11,8	9,40	49,6	-137
(\pm)-2-octanol	9,40	7,92	49,5	-142

3.1.3 - Resolução de Álcoois Secundários Racêmicos via Reações de Transesterificação

A utilização de enzimas como catalisadores em meio orgânico vem crescendo nos últimos anos devido principalmente a necessidade de explorar as propriedades enantiosseletivas desses biocatalisadores.^{13,126}

As lipases, por não utilizarem cofatores e pela grande disponibilidade comercial vem tendo grande aplicação na síntese orgânica assimétrica, seja na hidrólise, transesterificação ou esterificação assimétrica de grupos acilas com outros tipos de grupamento elétron-doadores.¹¹²

A importância de encontrar uma metodologia adequada para a resolução de ésteres, ácidos e álcoois racêmicos atualmente é de grande interesse, porque estes

compostos quirais são excelentes para serem utilizados em síntese orgânica pela sua facilidade de conversão em outras classes de compostos importantes. Como por exemplo, a formação de amidas cíclicas, poliésteres e lactonas opticamente ativas.¹¹

Sabe-se que a habilidade das enzimas em discriminar os enantiômeros de substratos racêmicos está no fato de serem compostas de L-aminoácidos e, conseqüentemente, seus centros ativos constituem um meio dissimétrico que é apropriado para distinguir entre os enantiômeros. O isômero reativo, será então aquele que possui uma estrutura que melhor se encaixa no sítio ativo da enzima.¹¹

O sistema de organo-gel foi utilizado anteriormente para resolução de álcoois secundários racêmicos em reações de esterificação com grande sucesso.¹⁰⁹ Portanto, a percepção que poderia também funcionar para resolução de álcoois secundários racêmicos em reações de transesterificação era de grande interesse. Assim, efetuaram-se algumas reações de transesterificação, para avaliar a possibilidade de resolver álcoois secundários racêmicos por esta metodologia.

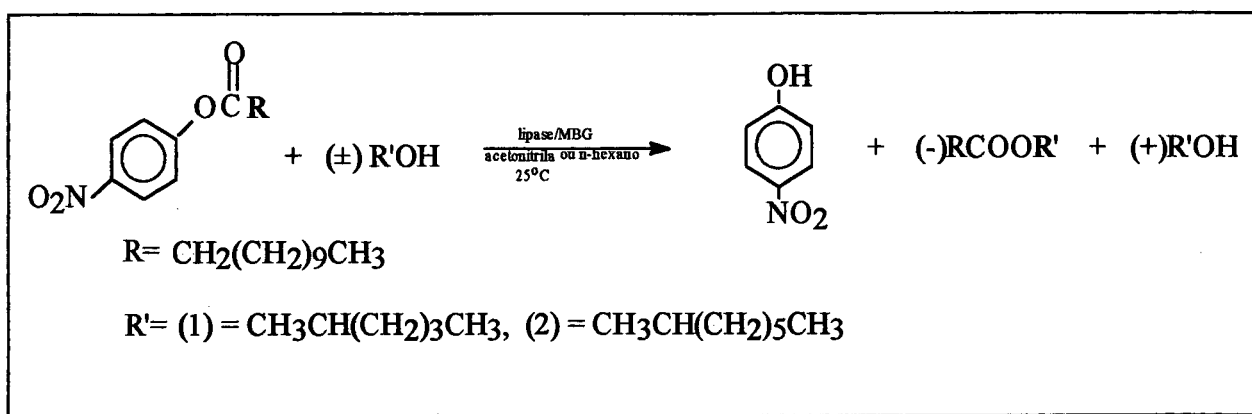
O trabalho de resolução consistiu em imobilizar as lipases de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas sp*, *Microbial* e *Lipolase* (Novo), em organo-gel de hexano e aplicá-las na reação transesterificação enantiosseletiva de álcoois secundários racêmicos (descritos na parte experimental).

Para uma melhor sistematização, a discussão dos resultados obtidos na resolução dos álcoois secundários racêmicos será abordada considerando:

- a) Comparação de diferentes lipases imobilizadas em organo-gel em reações de transesterificação.
- b) A resolução dos álcoois secundários racêmicos via reações de transesterificação, catalisada pelas lipases imobilizada em organo-gel.

As reações de transesterificação enantiosseletivas foram realizadas conforme o **Esquema X**, e foram acompanhadas por ccd e RMN¹H através da análises de aliquotas que foram periodicamente retiradas da mistura reacional. As mesmas

foram geralmente interrompidas quando o grau de conversão se aproximou de 50%. Os álcoois secundários racêmicos utilizados foram o (\pm)2-hexanol, (\pm)2-octanol. Os ésteres, formados pela reação de transesterificação dos alcenoatos de p-nitrofenila com os álcoois alifáticos secundários racêmicos foram isolados por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente hexano:acetato de etila (15:1). Os produtos obtidos foram analisados por IV, RMN¹H e medidas de rotação óptica.



Esquema X

Os trabalhos foram iniciados com o estudo da reação de transesterificação enantiosseletiva do laurato de p-nitrofenila com (\pm)2-octanol e o (\pm)2-hexanol, utilizando *C. V. lipase* imobilizada em MBG de hexano, e hexano ou acetonitrila como solventes externos. Posteriormente tentou-se resolver estes álcoois, variando o solvente externo e a enzima a fim de melhorar os resultados de excesso enantiomérico obtidos anteriormente.

A **Tabela 6** resume os resultados obtidos, no que se refere as tentativas de resolução dos álcoois em estudo, com relação as diferentes enzimas e solventes externos utilizados.

Tabela 6- Comportamento dos álcoois (\pm)-2-octanol e o (\pm)-2-hexanol com relação aos sistemas utilizados nas reações de transesterificação enantiosseletivas com laurato de p-nitrofenila.

Álcoois	Sistema de reação	Resultados
(\pm)-2-octanol /(\pm)-2-hexanol	MBG/ <i>C.V. lipase</i> /hexano ^(a)	Reagiu e resolveu
(\pm)-2-octanol /(\pm)-2-hexanol	MBG/ <i>Pseudomonas sp</i> /hexano ^(a)	Reagiu e não resolveu
(\pm)-2-octanol /(\pm)-2-hexanol	MBG/ <i>Microbial</i> /hexano ^(a)	Reagiu e não resolveu
(\pm)-2-octanol /(\pm)-2-hexanol	MBG/ <i>Lipolase</i> /hexano ^(a)	Hidrolisou
(\pm)-2-octanol /(\pm)-2-hexanol	MBG/ <i>C.V. lipase</i> /acetonitrila ^(b)	Reagiu e resolveu
(\pm)-2-octanol /(\pm)-2-hexanol	MBG/ <i>Pseud. sp</i> /acetonitrila ^(b)	Reagiu e não resolveu
(\pm)-2-octanol /(\pm)-2-hexanol	MBG/ <i>Microbial</i> /acetonitrila ^(b)	Reagiu e não resolveu
(\pm)-2-octanol /(\pm)-2-hexanol	MBG/ <i>Lipolase</i> /acetonitrila ^(b)	Hidrolisou

(a) o tempo de reação foi de 7 dias, temperatura de 25°C. (b) o tempo de reação foi de 15 dias, temperatura de 25°C.

A partir dos resultados citados acima, observa-se que os melhores sistemas de MBG para a resolução de álcoois racêmicos, é quando se utiliza *C.V. lipase* como biocatalisador, e hexano ou acetonitrila como solventes externos. Portanto, estes foram os solventes utilizados para a resolução dos álcoois racêmicos.

Além disto, como já citado, foram também realizadas as reações de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-octanol e hexano como solvente externo, utilizando outras lipases, tais como lipase *Microbial*, *Pseudomonas sp* e *Lipolase*. Para as reações de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com (\pm)-2-hexanol e (\pm)-2-octanol catalisada pela *Lipolase* imobilizada em organo-gel a 25°C, observou-se que não há formação do éster, mas sim, o produto resultante da hidrólise formando o ácido láurico e o p-nitrofenol. Para a lipase *Microbial* e para *Pseudomonas sp* imobilizadas em MBG, observou-se a

formação dos transesteres laurato de sec-octila e laurato de sec-hexila, mas não houve a resolução dos álcoois (que foram caracterizados por I.V. e RMN¹H).

As Figuras 22 e 23, mostram o espectro de RMN¹H para o ácido laurico e o p-nitrofenol, respectivamente, resultante da reação do laurato de p-nitrofenila com (±)-2-octanol catalisada pela *Lipolase* imobilizada em organo-gel a 25°C, em CDCl₃. Este resultado pode estar associado com o fato de que a *Lipolase* foi a única enzima utilizada neste trabalho em solução aquosa, podendo assim alterar o conteúdo de água do sistema (MBG), e favorecer a hidrólise dos substratos (ésteres).

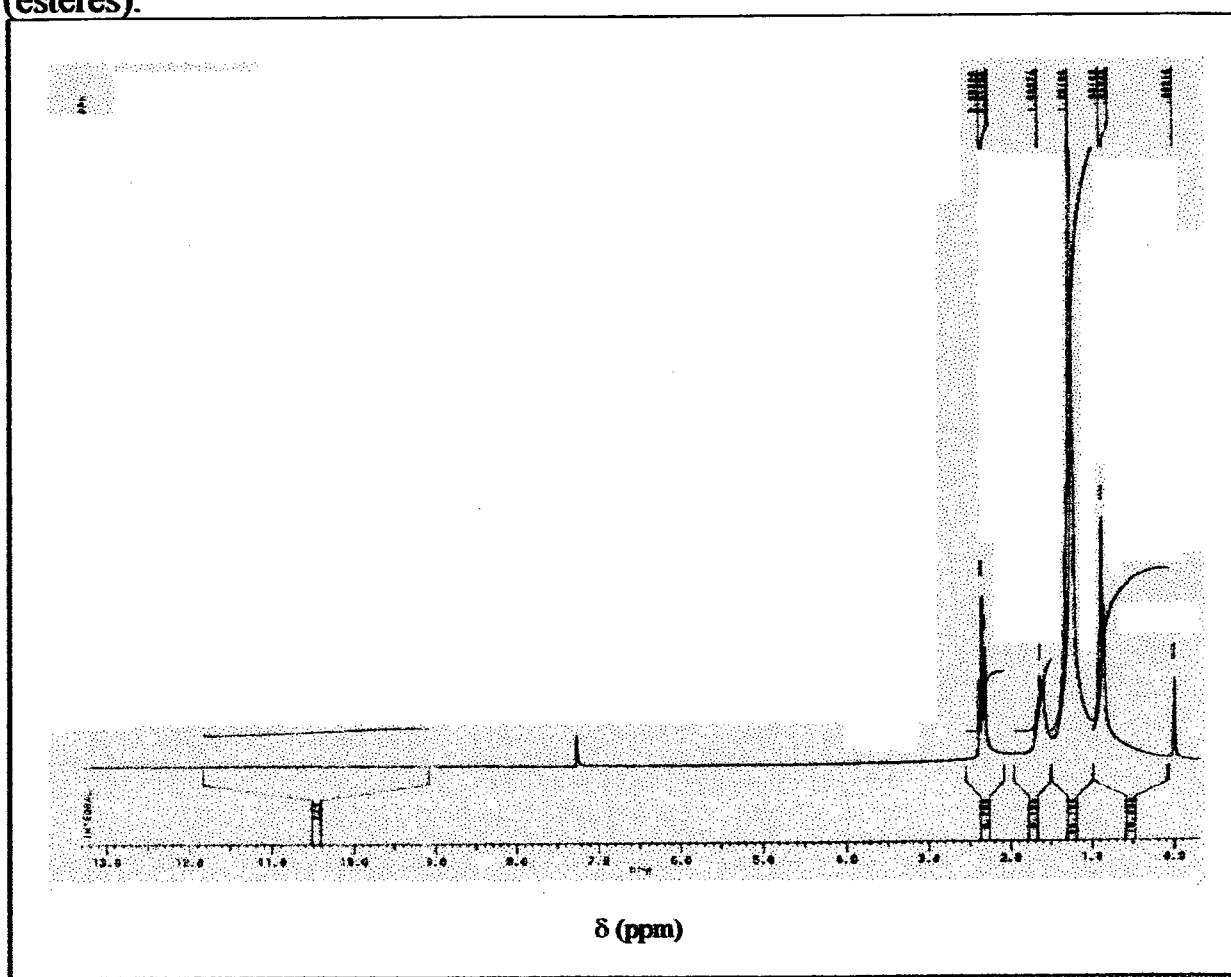


Figura 22 - Espectro de RMN¹H (200 MHz) do ácido láurico em CDCl₃.

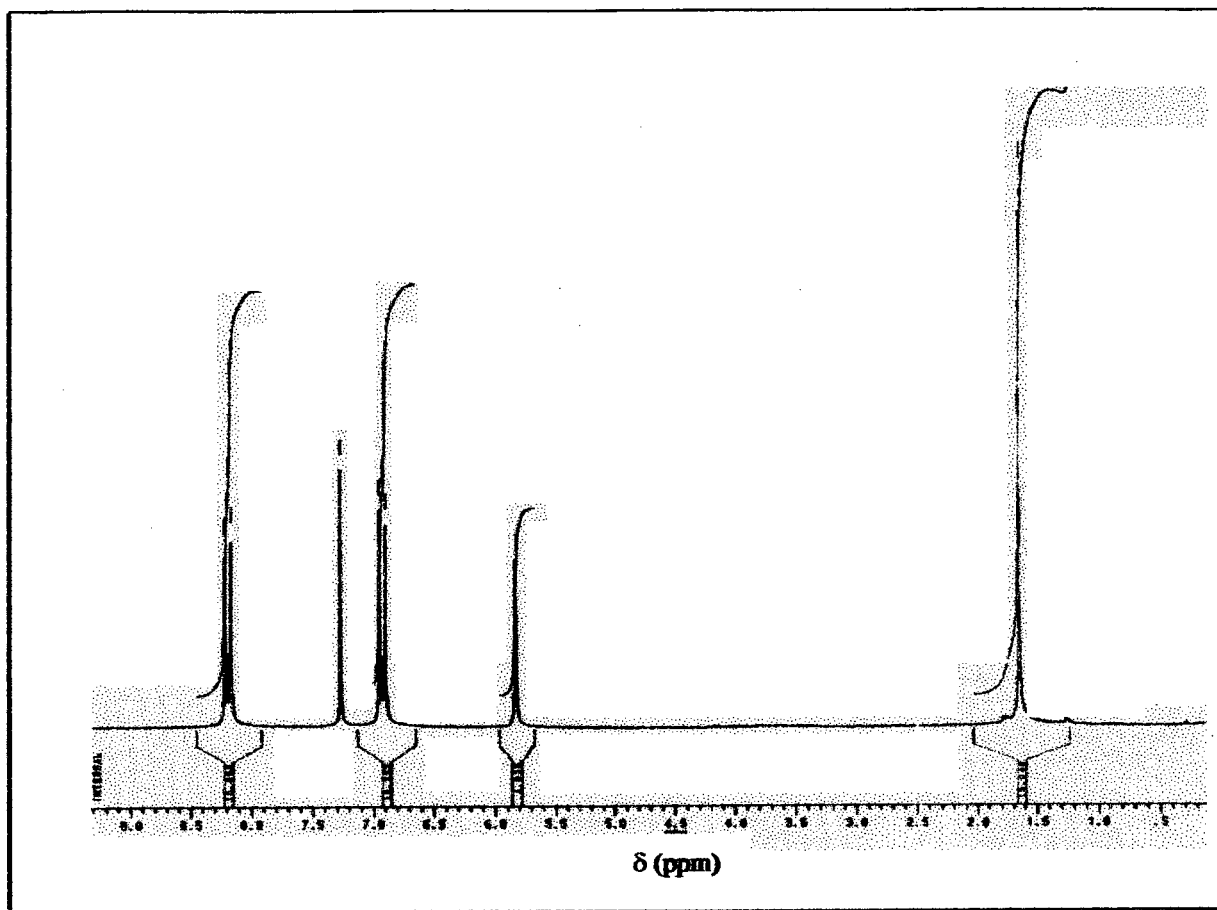


Figura 23 - Espectro de RMN^1H (200 MHz) do p-nitrofenol em $\text{CDCl}_3/\text{C}_3\text{D}_6$.

A **Figura 24**, mostra o grau de conversão da reação transesterificação em função do tempo para o laurato de p-nitrofenila com o (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol, catalisada pela *C.V. lipase* utilizando hexano como solvente externo à 25°C.

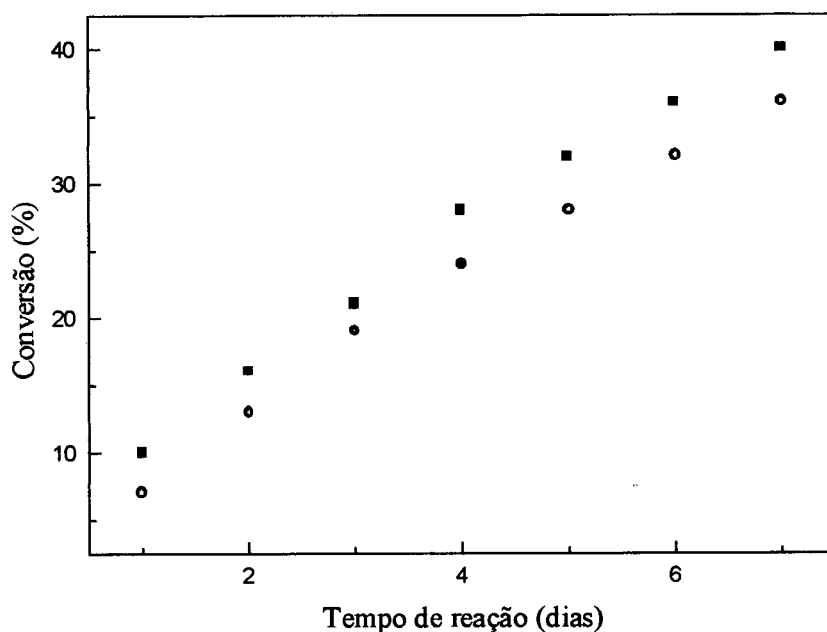


Figura 24 - Grau de conversão em função do tempo para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com (■) (\pm)-2-octanol e (○) (\pm)-2-hexanol catalisada pela *C.V. lipase* imobilizada em organo-gel utilizando como solvente externo hexano, a 25°C.

Afim de avaliar o efeito do solvente na enantiosseletividade das lipases imobilizadas em organo-gel, foi estudada a resolução destes via reação de transesterificação, utilizando como solvente externo acetonitrila.

A **Figura 25**, mostra o grau de conversão da reação transesterificação em função do tempo para a reação do laurato de p-nitrofenila com o (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol, em acetonitrila a 25°C.

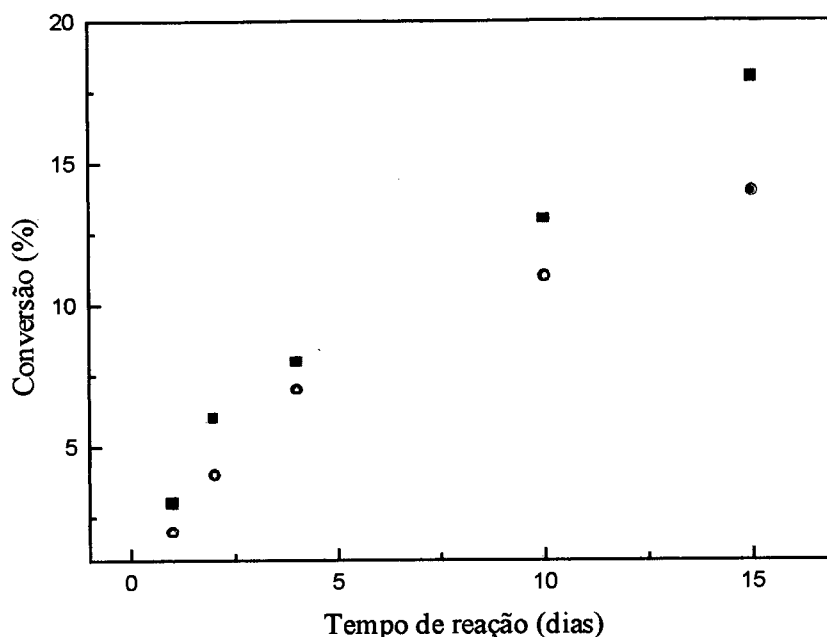


Figura 25 - Grau de conversão em função do tempo para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com (■) (±)-2-octanol e (○) (±)-2-hexanol catalisada pela C.V. lipase imobilizada em organo-gel utilizando como solvente externo acetonitrila, a 25°C.

Os graus de conversão foram estimados por RMN¹H, pela a comparação da integração do multiplete metínico do éster formado (centrado em 4,9 ppm para ésteres alifáticos) com a integração do multiplete metínico dos álcoois correspondentes (centrado em 3,5-3,8 ppm para álcoois alifáticos).

Quando comparados os resultados obtidos para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com os álcoois secundários racêmicos (±)-2-octanol e (±)-2-hexanol, observa-se que a *C.V.lipase* é mais eficiente para a reação com (±)-2-octanol, independente do solvente externo (hexano ou acetonitrila) e do tempo da reação. Por exemplo, o (-)-laurato de sec-octila foi obtido com o grau de conversão de 40%, utilizando hexano como solvente externo em 7 dias de reação. Quando

muda-se o solvente externo de hexano para acetonitrila o mesmo composto foi obtido com o grau de conversão de 18% com um tempo de reação de 15 dias. O (-)laurato de sec-hexila foi obtido com grau de conversão de 36%, utilizando hexano como solvente externo (tempo de reação 7 dias), e 14% utilizando acetonitrila como solvente externo (tempo de reação de 15 dias).

Estas diferenças no grau de conversão provavelmente estão relacionadas com o encaixe mais adequado do substrato ao sítio ativo da enzima. Dependendo do tamanho do substrato e do solvente utilizado, o encaixe (ligação) será melhor, isto é, o complexo enzima substrato fica numa posição mais acessível para que ocorra o ataque nucleofílico do álcool.

Através destes resultados, verifica-se também que há uma relação entre o grau de conversão usando diferentes álcoois com a polaridade do solvente externo, e que o aumento da polaridade do solvente (menor log P) diminui a atividade catalítica da enzima independente do tamanho da cadeia carbônica do substrato. Este fato pode estar associado com as alterações na estrutura e no sítio ativo da enzima pela presença de solventes mais polares, o que deverá diminuir a atividade catalítica.¹²⁸

Na **Tabela 7**, podem ser observados os resultados obtidos de porcentagens de conversão, valores do excesso enantiomérico para o produto e para o álcool não reativo e a razão enantiomérica para a reação de transesterificação enantiosseletiva do laurato de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol.

Tabela 7- Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos, com C.V.lipase imobilizada em organo-gel.

Álcoois	solvente	% de conversão	$[\alpha]^{25}_D$ (c, CHCl ₃) ^b	ee _p (%) ^a	ee _s (%) ^b	E ^c
(±)2-hexanol	acetonitrila	14	- 1,45	26	18	1,5
(±)2-hexanol	hexano	36	- 2,23	40	20	3,0
(±)2-octanol	acetonitrila	18	- 1,63	38	7	2,4
(±)2-octanol	hexano	40	- 2,18	51	21	4,0

(a) ee_s é o excesso enantiomérico do isômero álcool não reativo; (b) ee_p é o excesso enantiomérico do isômero éster reativo; (c) E é a razão enantiomérica calculada pela equação $E = \ln [(1 - c).(1 - ee_s)] / \ln [(1 - c).(1 + ee_s)]$ onde $c = ee_s / ee_s + ee_p$.

Para a reação catalisada pela *C.V.lipase* imobilizada em organo-gel a 25⁰C, observou-se a formação dos ésteres, laurato de sec-hexila e laurato de sec-octila, e que a preferência é pelo enantiômero com rotação óptica negativa (-). Este resultado mostra que a *C.V. lipase*, é seletiva, considerando que o comprimento da cadeia hidrocarbônica do álcool não influencia na escolha do enantiômero reativo.

Os valores de rotação óptica experimentais foram comparados com os da literatura¹⁰⁹, afim de determinar os excessos enantioméricos dos ésteres formados. Os excessos enantioméricos, para estas reações foram na faixa de 40 a 51%, quando foi utilizado hexano como solvente externo, e 26 a 38% quando foi utilizado acetonitrila como solvente externo, confirmando a enantiosseletividade da *C. V. lipase* imobilizada no sistema de MBG.

Os valores do grau de conversão estão relacionados com os valores de k_{obs}, onde observa-se o mesmo efeito para os álcoois secundários racêmicos (±)-2-octanol e (±)-2-hexanol. Como pode ser observado na Tabela 2, página 54 os

valores de k_{obs} para a reação de transesterificação dos alcenoatos de p-nitrofenila com o (\pm)-2-octanol foram sempre maiores do que aqueles para a mesma reação com o (\pm)-2-hexanol. Para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com os álcoois (\pm)-2-octanol e (\pm)-2-hexanol, os valores de k_{obs} foram 3,31 e $2,70 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$, respectivamente. Este aumento no grau de conversão e no k_{obs} pode ocorrer devido ao aumento das interações hidrofóbicas, entre o álcool de cadeia alquílica maior, solvente e surfactante (AOT).

De acordo com estes resultados, observa-se que o solvente externo altera a enantiosseletividade da enzima, haja visto que em todos os sistemas biocatalíticos contendo solventes orgânicos, a atividade catalítica e a estabilidade são influenciadas pela natureza dos solventes.¹²⁹⁻¹³⁰

A polaridade do solvente é extremamente importante. Uma diminuição da constante dielétrica do meio, leva a um aumento da interação eletrostática entre os resíduos carregados da enzima, o que leva a uma diminuição de sua flexibilidade, acompanhada pela redução da atividade catalítica. Por outro lado, a alta polaridade no sítio ativo da enzima, tem sido citado como um fator importante, no aumento da atividade catalítica. Tais mudanças, no sítio ativo ou perto dele, podem mudar a ligação e/ou a conversão dos substratos e se a mudança da constante dielétrica for muito drástica pode afetar a estrutura tridimensional da enzima.¹³¹⁻¹³²

O conteúdo de água é outro fator que pode influenciar nas reações enzimáticas em meio orgânico.¹³²⁻¹³³ A água ativa a enzima pelo aumento da flexibilidade interna de sua molécula da enzima. Sendo assim, solventes mais polares podem exercer uma ação sobre a estrutura da rede de gelatina, penetrando dentro da camada de água que estabiliza o biocatalisador ou retirando esta camada de água. Portanto, o decréscimo observado na enantiosseletividade pode estar relacionado com a interação da acetonitrila com a água, fazendo com que diminua a enantiosseletividade da enzima.

Observa-se pelos dados mostrados na Tabela 7, que quando a cadeia do álcool aumenta ocorre um aumento no grau de conversão, um aumento no excesso enantiomérico do éster formado e uma diminuição no excesso enantiomérico do substrato não reativo. Foi também observado um aumento na razão enantiomérica (*E*). Este dado fornece informações sobre a enantiosseletividade das enzimas para determinados substratos, sendo que quanto maior o valor de *E* mais enantiosseletiva é a enzima para o referido substrato.

Análises espectroscópicas de IV e RMN¹H foram realizadas para todos os produtos obtidos nas reações de transesterificação enantiosseletivas e alguns destes estão mostrados nas Figuras 26 e 27.

A Figura 26, mostra o espectro de IV para o éster (-)-laurato de sec-octila onde pode-se observar a banda característica da carbonila de éster em 1738 cm⁻¹.

A Figura 27, mostra o espectro de RMN¹H para o (-)-laurato de sec-octila, em CDCl₃. Observa-se um multiplete em 4,9 ppm que corresponde aos prótons metínicos (-CHOOC-) ligados ao oxigênio do grupo éster.

Outras regiões de absorção no IV e outros picos no RMN¹H estão mostrados abaixo:

- **laurato de sec-octila** : IV (NaCl) (cm⁻¹) 2930, 2860, 1738, 1462, 1354, 1254, 1170. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,5 (m, 41H, CH₃(CH₂)₁₁ CH₃ CH₃(CH₂)₅), 4,9 (m, 1H, CH), [α]_{exp} = -2,18 ([α]_{teórico} = -4,27)¹⁰⁹

- **laurato de sec-hexila** : IV (NaCl) (cm⁻¹) 2960, 28660, 1739, 1458, 1351, 1253, 1168. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,5 (m, 37 H, CH₃(CH₂)₁₁ CH₃ CH₃(CH₂)₃), 4,9 (m, 1H, CH), [α]_{exp} = -2,23 ([α]_{teórico} = -5,57)¹⁰⁹

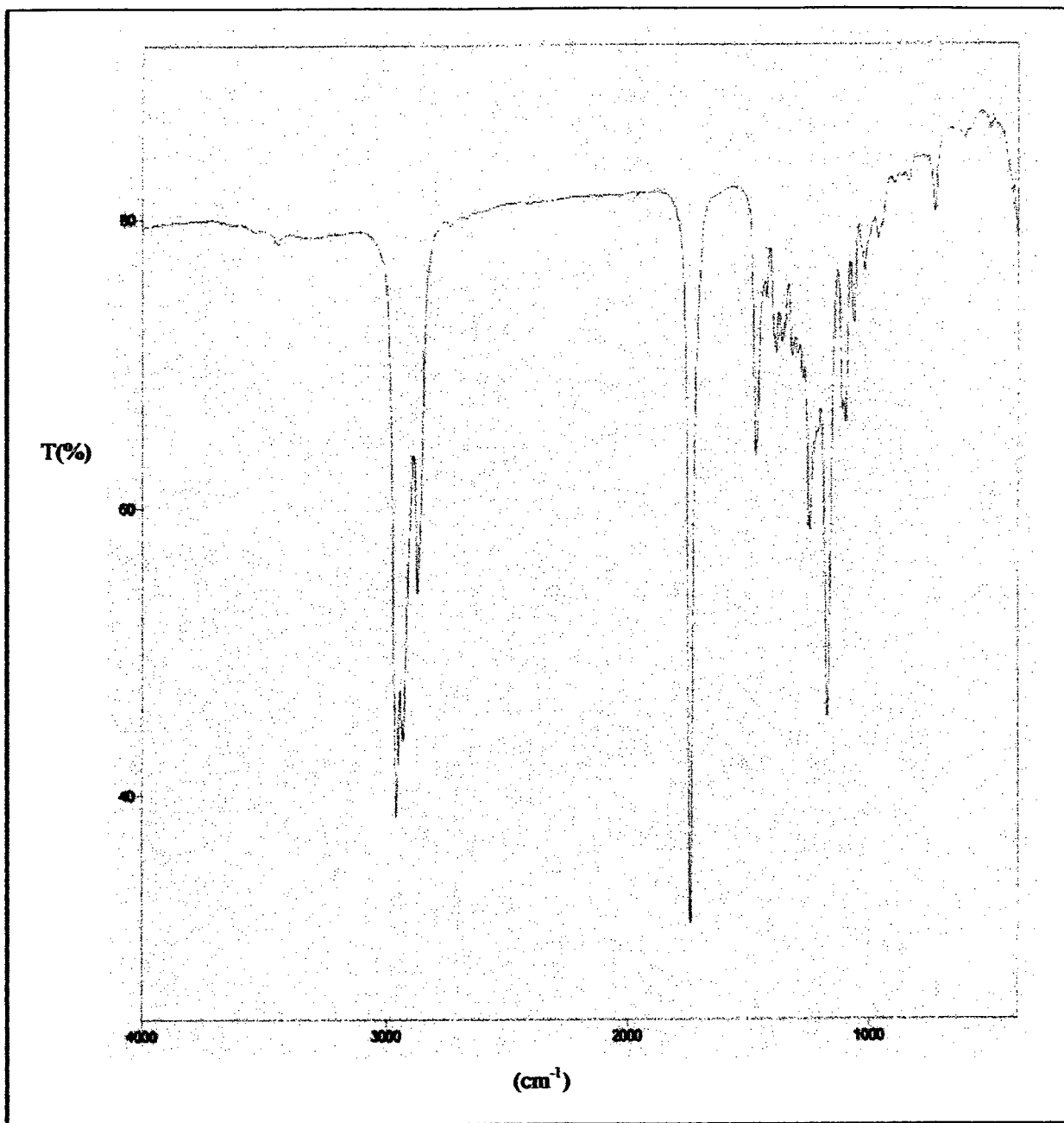


Figura 26 - Espectro de infravermelho do laurato de sec-octila em filme.

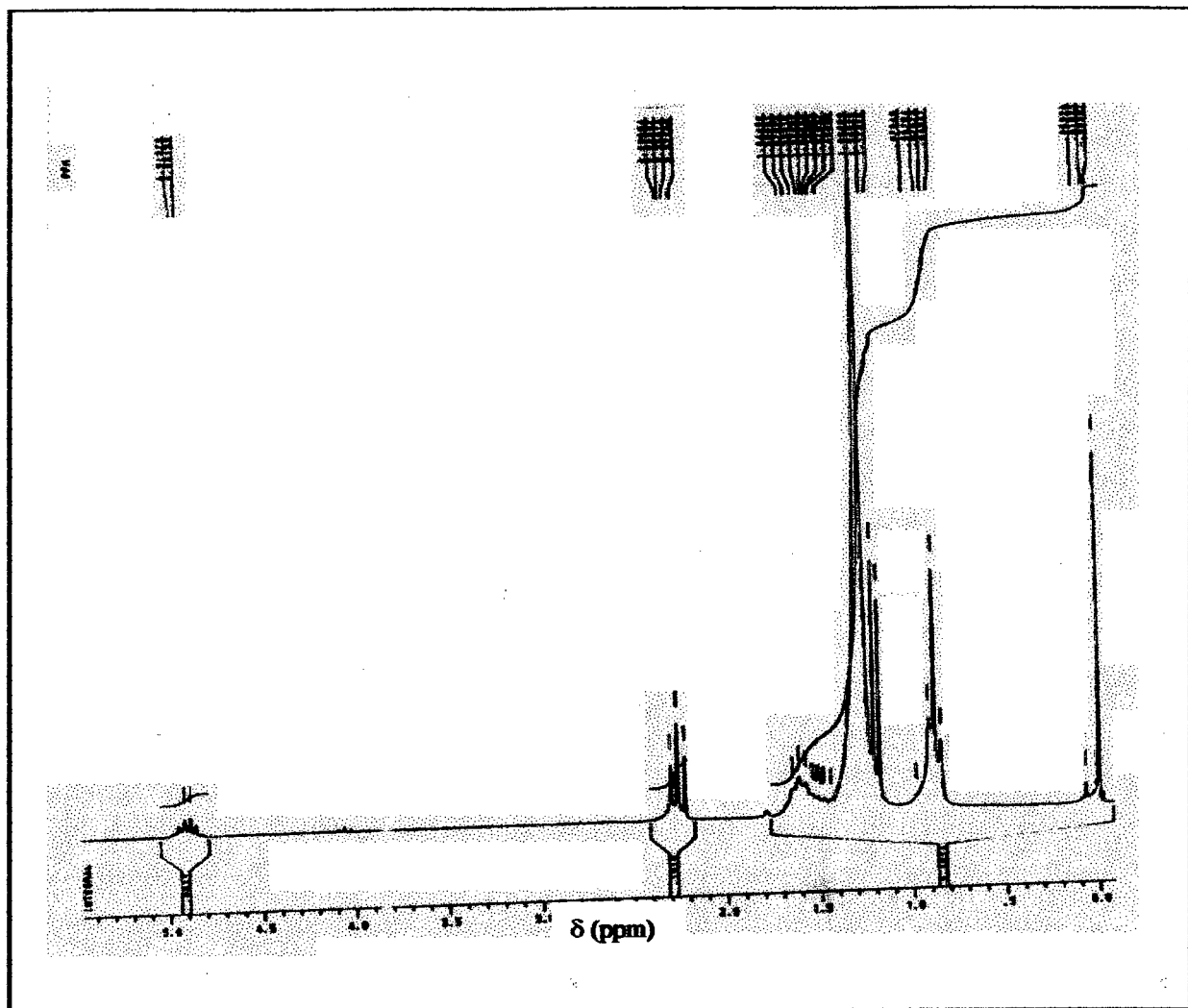


Figura 27 - Espectro de RMN^1H (200 MHz) do (-)-laurato de sec-octila em CDCl_3 .

3.1.4 - Atividade de Diferentes Lipases Imobilizadas em MBG em Reações de Transesterificação

Ésteres podem ser obtidos enzimaticamente por síntese direta (ácido e álcool) ou por reações de transesterificação (éster e álcool). São compostos orgânicos com grande aplicação na indústria alimentícia como flavorizantes e aromatizantes. Estes compostos são sintetizados por métodos químicos, porém métodos enzimáticos estão tornando-se mais atrativos. Uma das enzimas mais utilizadas na formação de ésteres são as lipases.^{111,125}

Assim, afim de avaliar o efeito da atividade de diferentes lipases imobilizadas em MBG, uma série de ésteres foram sintetizados usando laurato de p-nitrofenila e álcoois alifáticos primários de cadeia linear e secundários racêmicos, via reações de transesterificação.

A reação foi realizada a 25°C com tempo de reação de 7 dias em hexano e 15 dias em acetonitrila. As lipases (*C.V. lipase*, *Microbial*, *Pseudomonas sp* e *Lipolase*) mostraram uma atividade eficiente nestas reações. Os dados analíticos de rendimentos dos transésteres formados, são mostrados nas **Tabelas 8 e 9**

Inicialmente foram feitas reações variando-se o tamanho da cadeia do álcool. Foram realizados experimentos com álcoois alifáticos de 5 a 11 átomos de carbono na cadeia alquílica, utilizando hexano como solvente externo e *C.V. lipase* imobilizada em organo-gel. Em seguida, utilizaram-se álcoois secundários racêmicos no mesmo sistema e enzimas de outras fontes como por exemplo, *Microbial*, *Pseudomonas sp* e *Lipolase*.

Tabela 8 - Rendimentos para reação de transesterificação laurato de p-nitrofenila com diferentes lipases e álcoois primários e secundários racêmicos, a 25°C^(a).

Álcoois	C.V. Lipase Rend.(%) ^(a)	Lipolase Rend.(%) ^(b)	<i>Pseudomonas sp</i> Rend (%) ^(c)	Microbial Rend. (%) ^(d)
1-pentanol	96	93	94	70
1-octanol	88	83	85	63
1-dodecanol	83	71	78	58
(±)2-hexanol	72	58 (hid.)	61	50
(±)2-octanol	80	46 (hid.)	53	43

(a)As reações foram realizadas utilizando 0,02 mol de substrato (1:1), solvente: hexano, enzima: *C.V. lipase* imobilizada em MBG. Temperatura: 25°C. (b) As reações foram realizadas utilizando 0,02 mol de substrato (1:1), solvente: hexano, enzima: *lipolase* imobilizada em MBG. Temperatura: 25°C. (c) As reações foram realizadas utilizando 0,02 mol de substrato (1:1), solvente: hexano, enzima: *lipase Pseudomonas sp* imobilizada em MBG. Temperatura: 25°C. (d) As reações foram realizadas utilizando 0,02 mol de substrato (1:1), solvente: hexano, enzima: *lipase Microbial* imobilizada em MBG. Temperatura: 25°C. Os rendimentos foram determinados por RMN¹H.

A análise dos resultados obtidos mostra que com o aumento da cadeia carbônica do álcool, ocorre uma diminuição gradual no rendimento da reação, obtendo-se um melhor resultado para a reação do laurato de p-nitrofenila com o pentanol, independente da enzima utilizada, com rendimentos de 70 a 96%. Este crescimento pode ser atribuído ao aumento de uma melhor interação dos substratos com o sítio ativo da enzima.

O efeito da diminuição no rendimento da reação causado pelo aumento da cadeia carbônica do álcool, é atribuído ao efeito de reconhecimento da enzima, ou seja, substratos de cadeias carbônicas maiores estão impedidos estericamente, não

se alojando efetivamente no centro ativo da enzima para que possa ocorrer a catálise. Outro fator, que interfere na aproximação dos substratos de cadeias longas com o centro ativo, é a interação destes substratos com a parte apolar do surfactante impedindo a aproximação do centro nucleofílico do álcool na superfície da microemulsão onde está localizado o sítio ativo.

Os rendimentos para estas reações no sistema MBG, também estão associados com a atividade específica da enzima por miligrama de proteína usada. A *C.V. lipase* (atividade específica 3970 unidades/ mg de proteína) foi a enzima mais eficiente no sistema MBG para estas reações, seguido pela *Pseudomonas sp* (atividade específica 1900 unidades/ mg de proteína), *Microbial* (atividade específica 1600 unidades/ mg de proteína) e Lipolase (atividade específica 100 KLU/g). Resultados semelhantes foram observados por Jesus e colaboradores para reações de esterificação de álcoois secundários racêmicos.¹²⁵

Um outro fator a ser considerado é o efeito da polaridade do meio, ou seja, o efeito do solvente nestas reações. Para analisar-se o efeito do solvente nas reações de transesterificação foram realizadas as mesmas reações utilizando como solvente externo acetonitrila. Os resultados obtidos estão mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Rendimentos para as reações de transesterificação laurato de p-nirofenila com diferentes lipases e álcoois primários e secundários racêmicos, a 25°C^(a).

Álcoois	C.V. lipase Rend.(%) ^(a)	Lipolase Rend.(%) ^(b)	Pseudomonas Rend (%) ^(c)	Microbial Rend. (%) ^(d)
1-pentanol	38	32	34	28
1-octanol	33	26	29	20
1-dodecanol	29	22	25	18
(±)2-hexanol	28	78 (hid.)	19	12
(±)2-octanol	36	70 (hid.)	14	10

(a) As reações foram realizadas utilizando 0,02 mol de substrato (1:1), solvente: acetonitrila, enzima: *C.V. lipase* imobilizada em MBG. Temperatura: 25°C. (b) As reações foram realizadas utilizando 0,02 mol de substrato (1:1), solvente: acetonitrila, enzima: *lipolase* imobilizada em MBG. Temperatura: 25°C. (c) As reações foram realizadas utilizando 0,02 mol de substrato (1:1), solvente: acetonitrila, enzima: lipase *Pseudomonas sp* imobilizada em MBG. Temperatura: 25°C. (d) As reações foram realizadas utilizando 0,02 mol de substrato (1:1), solvente: acetonitrila, enzima: lipase *Microbial* imobilizada em MBG. Temperatura: 25°C. Os rendimentos foram determinados por RMN¹H.

Em todos os sistemas biocatalíticos contendo solventes, a atividade catalítica e a estabilidade da enzima são influenciadas pela natureza destes solventes. A polaridade do solvente é extremamente importante. Sendo assim, uma maior solvatação ou interação do solvente com o sítio ativo da enzima, poderá levar a uma redução de sua atividade catalítica.¹³⁰⁻¹³³

Neste trabalho, observou-se que o rendimento das reações diminuiu com o aumento da polaridade do solvente (dados mostrados nas Tabelas 8 e 9).

A presença de um solvente orgânico pode ser um problema para a inativação da enzima. A maneira como ocorre a interação dos solventes orgânicos com a molécula da enzima, e a influência que os solventes exercem sobre a estabilidade

não está bem claro na literatura. Quando solventes miscíveis em água são adicionados em concentrações moderadas, não são observados efeitos negativos para enzima. Entretanto, quando grandes quantidades são necessárias para dissolver o substrato, pode levar a inativação. O grau de inativação da enzima depende do solvente usado para efetuar-se a reação, pois cada solvente interage de uma forma diferente com o sítio ativo da enzima. A tendência dos solventes de inativar as enzimas, não depende unicamente da hidrofobicidade. Outras características físico-químicas são importantes, tais como: habilidade de solvatação e a geometria molecular.^{132,133}

Todos os produtos obtidos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de IV e RMN¹H e serão mostrados a seguir.

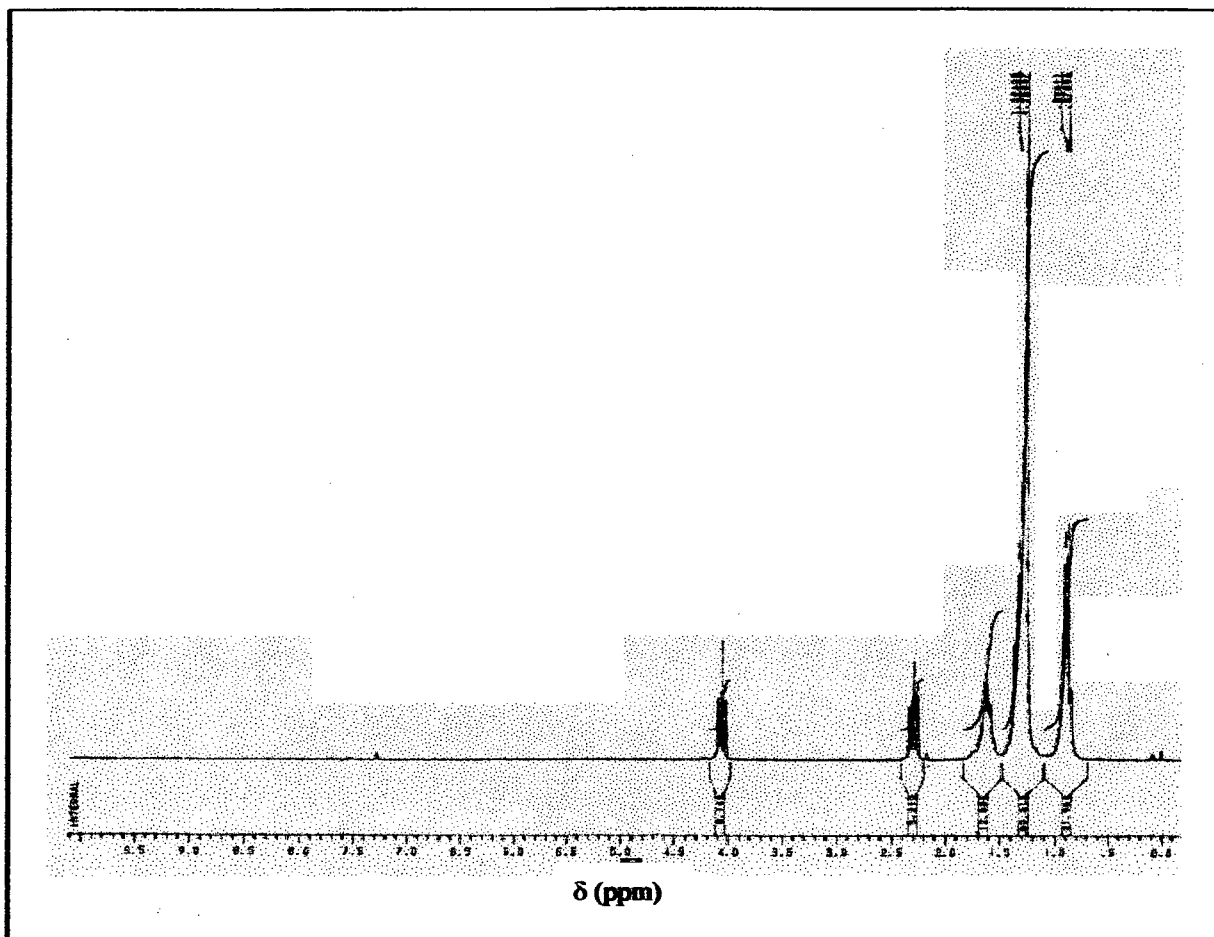


Figura 28 - Espectro de RMN^1H (200 MHz) do laurato de pentila em CDCl_3 .

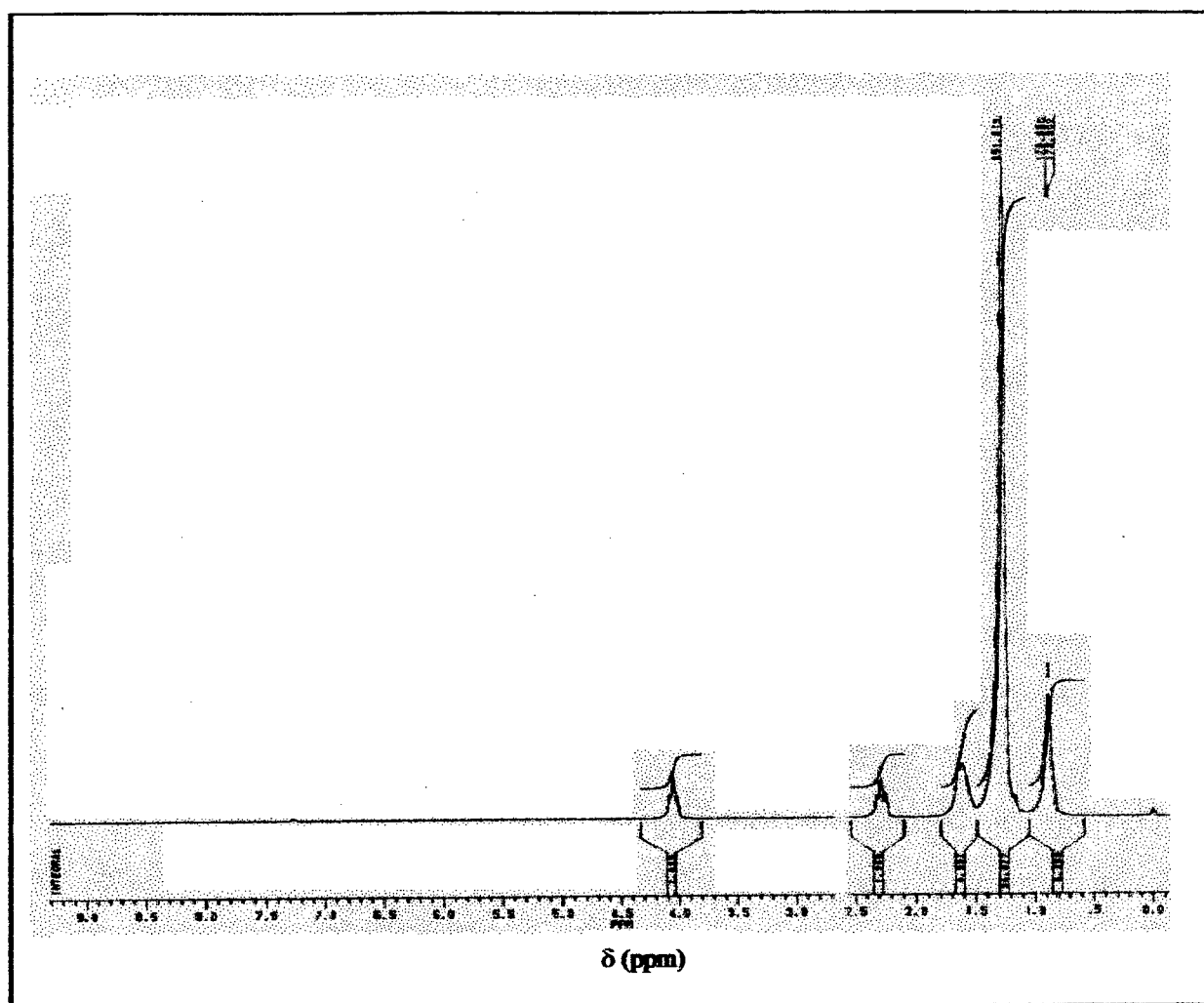


Figura 29 - Espectro de RMN^1H (200 MHz) do laurato de octila em CDCl_3 .

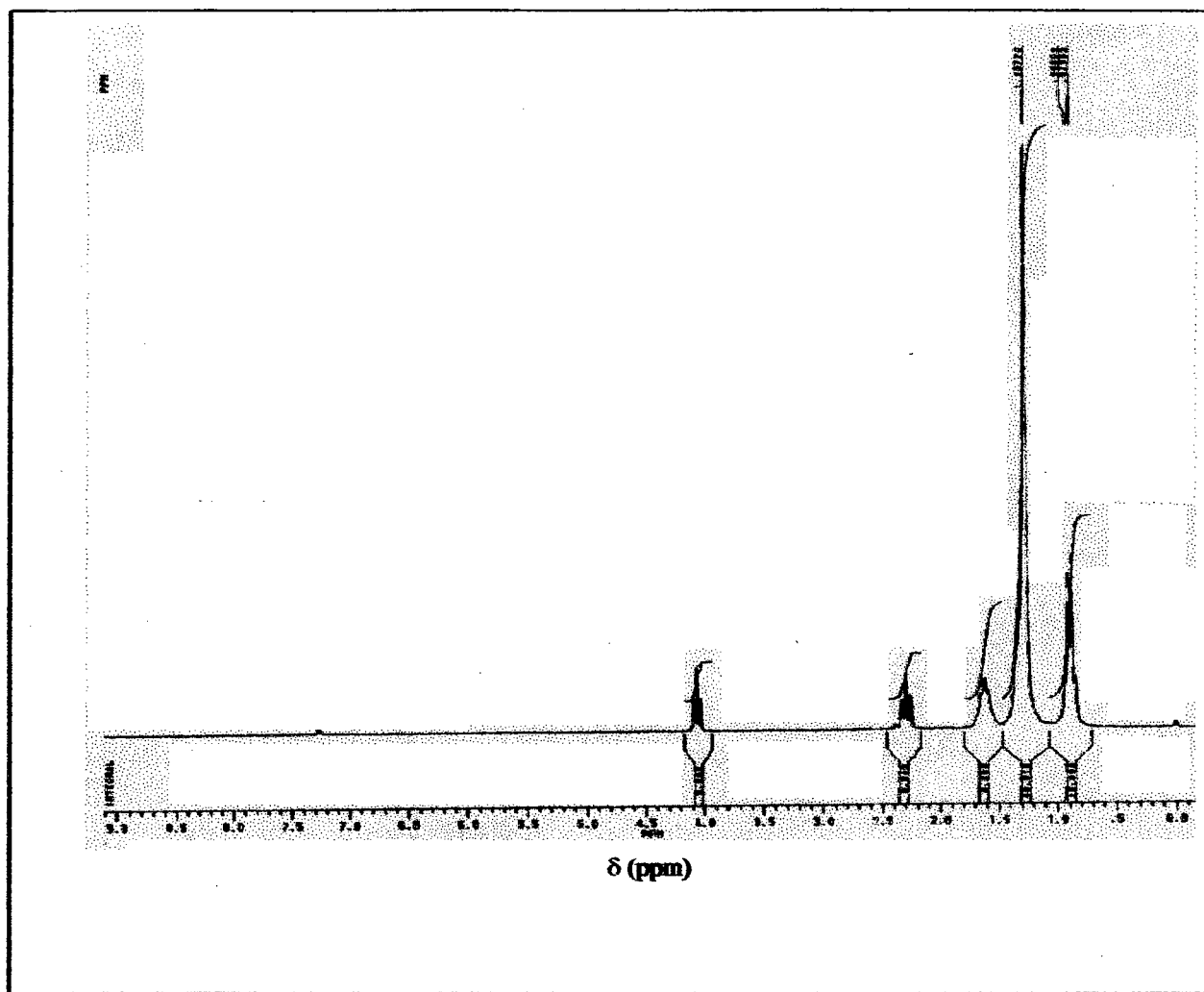


Figura 30 - Espectro de RMN^1H (200 MHz) do laurato de dodecila em CDCl_3 .

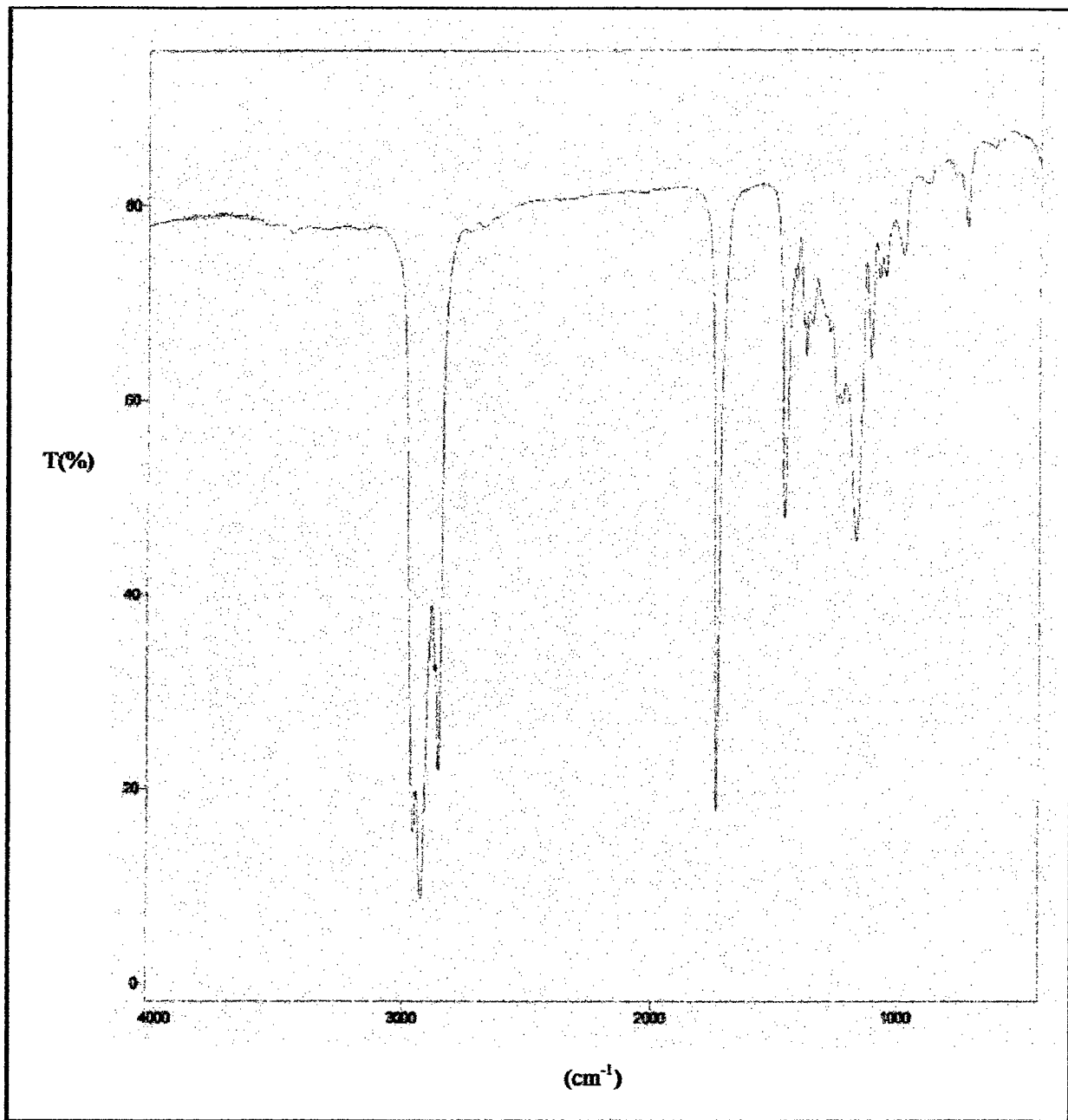


Figura 31 - Espectro de infravermelho do laurato de pentila em filme.

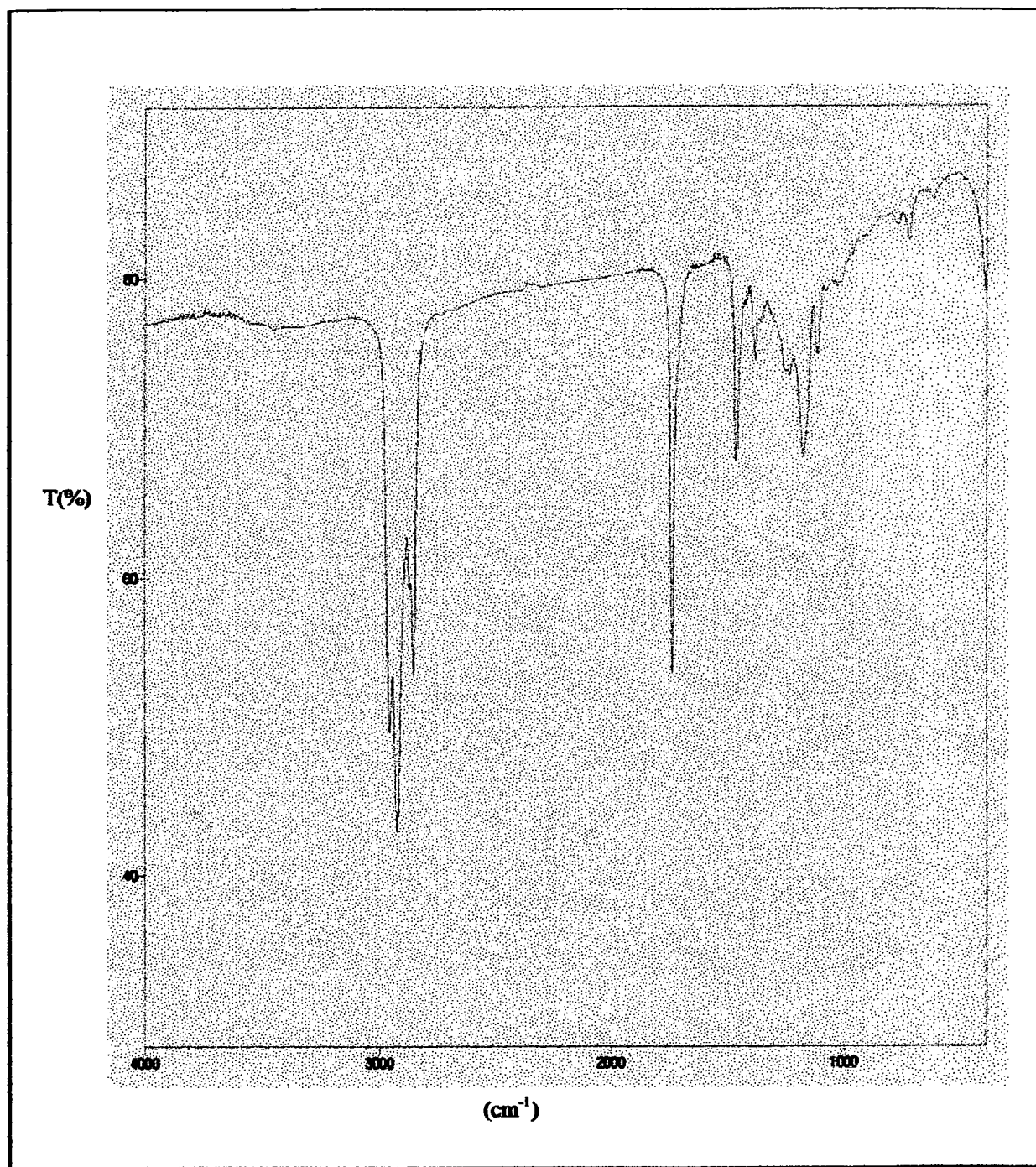


Figura 32 - Espectro de infravermelho do laurato de octila em filme.

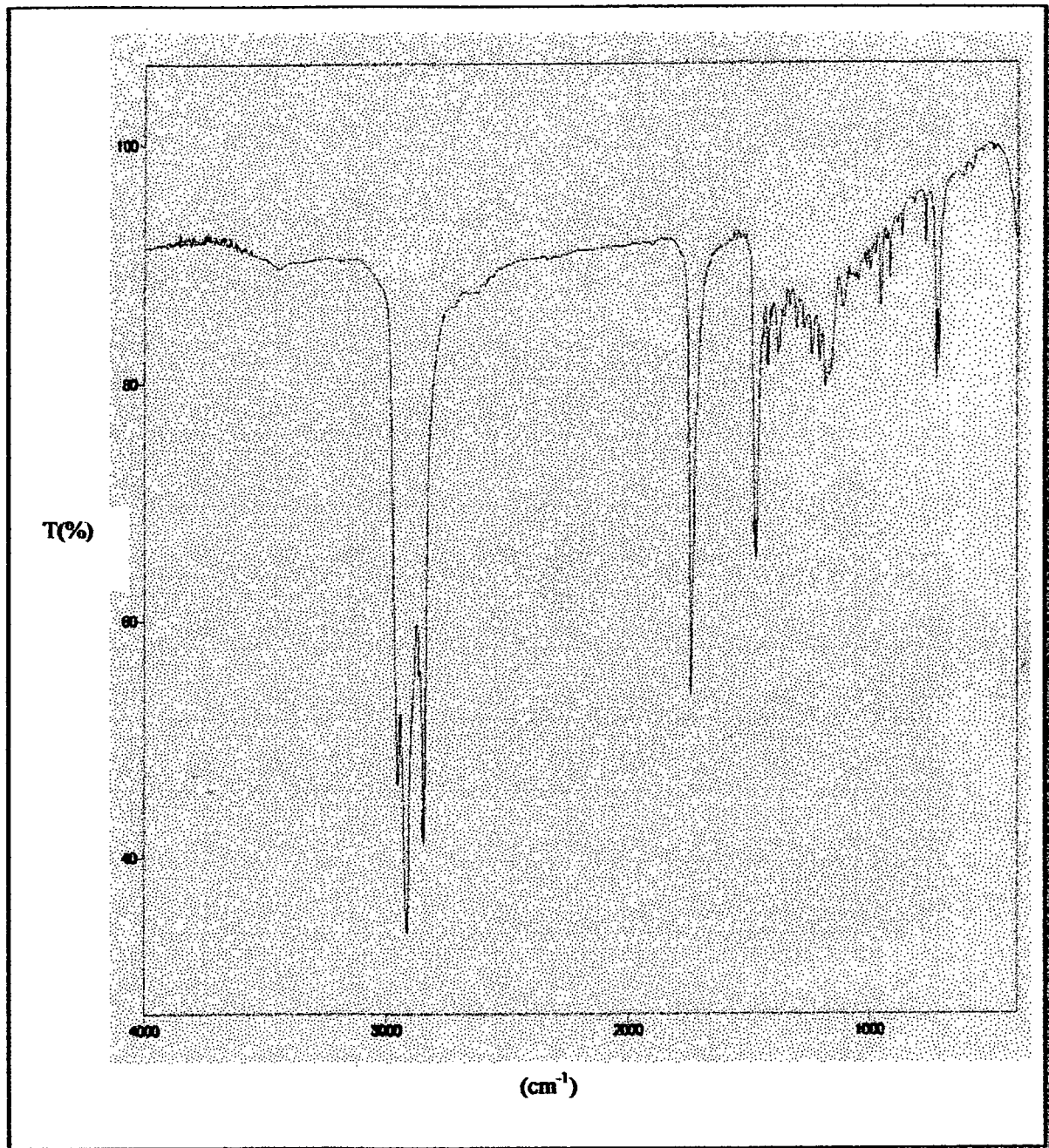


Figura 33 - Espectro de infravermelho do laurato de dodecila em filme.

3.2 - DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO

Para os estudos de determinação de coeficiente de difusão em organo-gel, inicialmente foram preparados e caracterizados uma série de benzoatos de alquila. Estes foram, posteriormente, suportados no organo-gel e determinado sua difusão para diferentes solventes orgânicos.

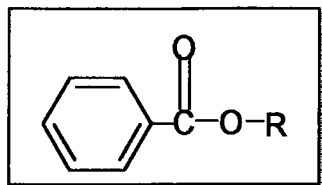
A seguir será descrito a identificação e caracterização dos benzoatos de alquila, embora alguns deles já tenham sido descritos na literatura.¹³⁵

Os resultados obtidos para os coeficientes de difusão, serão discutidos em termos da estrutura do substrato difundido (benzoato de alquila), composição do organo-gel e solvente externo. Também será avaliada a difusão dos alcanatoatos de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo. O efeito da temperatura também será avaliado para a difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, com hexano como solvente externo.

3.2.1 - Identificação e caracterização dos benzoatos de alquila

Alguns dados analíticos e espectroscópicos para os produtos obtidos na esterificação do ácido benzóico com diferentes álcoois alifáticos, são mostrados na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Dados de rendimento, R_f, IV e índice de refração para os benzoatos de alquila.



Composto	R
1	C ₂ H ₅
2	C ₄ H ₉
3	C ₈ H ₁₇
4	C ₁₆ H ₃₃
5	sec-C ₄ H ₉

composto	rendimento(%)	R _f ^(a)	IV ν-C=O (cm ⁻¹) ^(b)	Índice de refração ^(c)	
				exp.	Lit ¹³⁶
1	94	0,58	1720	1,50	(1,50)
2	96	0,60	1721	1,48	(1,49)
3	52	0,57	1722	1,47	(-)
4	86	0,55	1724	1,42	(-)
5	47	0,59	1727	1,49	(-)

(a) eluente n-hexano : acetato de etila 15 : 1 (b) filme, em cela de NaCl (c) temperatura 25°C.

A esterificação foi realizada refluxando-se o ácido benzóico com os álcoois por um tempo de 4 a 16 horas, dependendo da cadeia carbônica do álcool, conforme discutido anteriormente (item 2.6, página 48).

Os benzoatos de alquila obtidos, apresentaram rendimentos que variaram de 47 a 96%. O menor rendimento foi obtido para a reação entre o ácido benzóico e o 2-butanol, mostrando novamente a menor reatividade dos álcoois secundários em relação aos álcoois primários em reações de esterificação. Nos ésteres de cadeias alquílicas normais, a absorção no infravermelho do grupo carbonila ocorre em torno de 1740 cm⁻¹. Para os benzoatos de alquila, devido à conjugação do grupo

fenila com a carbonila, ocorre uma diminuição na frequência de estiramento e os valores são observados na região de 1720 cm^{-1} , conforme mostrado na Tabela 10.

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

- **benzoato de etila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2982, 1720, 1602, 1452, 1368, 1276, 1174. RMN^1H (200 MHz, $\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 5H, CH_3CH_2), 4,2 (t, 2H, CH_2), 7,2 (s, 5H, C_6H_5)

- **benzoato de n-butila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2960, 2874, 1720, 1602, 1456, 1386, 1276, 1176. RMN^1H (200MHz, $\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 9H, $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_3$), 4,3 (t, 2H, CH_2), 7,1 (s, 5H, C_6H_5).

- **benzoato de sec-butila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2962, 2874, 1718, 1604, 1456, 1274, 1174. RMN^1H (200 MHz, $\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 8H, $\text{CH}_3, \text{CH}_3\text{CH}_2$) 5,0 (t, 1H, CH), 7,4 (s, 5H, C_6H_5).

- **benzoato de n-octila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2928, 2856, 1722, 1602, 1454, 1274, 1176. RMN^1H (200 MHz, $\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 17H, $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7$), 4,2 (t, 2H, CH_2), 7,2 (s, 5H, C_6H_5).

- **benzoato de cetila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2922, 2850, 1718, 1602, 1474, 1276, 1178. RMN^1H (200 MHz, CDCl_3 / TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 33H, CH_3 (CH_2)₁₅), 4,2 (t, 2H, CH_2), 7,1 (s, 5H, C_6H_5).

3.2.2 - Determinação do Coeficiente de Difusão de Benzoatos de Alquila em Organo-gel

O sistema de organo-gel foi usado recentemente como uma alternativa para imobilização de enzimas em meio orgânico. Neste novo sistema a enzima fica aprisionada no centro micelar da microemulsão de água/óleo (w/o), e a catálise acontece por difusão do substrato ao centro micelar e vice-versa. Dependendo do óleo (hexano, heptano ou ciclohexano) utilizado para preparar o organo-gel, foram observados rendimentos diferentes em reações de esterificação e transesterificação.¹³⁶ Acredita-se que estas diferenças nos rendimentos das reações possam estar associadas com a dificuldade do substrato em difundir-se do organo-gel para o meio reacional ou vice-versa.

A determinação experimental de valores de coeficiente de difusão poderá trazer mais informações de como a estrutura rígida do organo-gel influencia na formação de produtos quando enzimas são imobilizadas neste suporte (sistema).

Os valores das absorvâncias em função do tempo, em cada um dos experimentos, foram tratados matematicamente de acordo as equações 9 e 10 (item 2.5.2, página 45). A partir deste tratamento matemático obtêm-se curvas que mostram a fração difundida (M_t/M_o) em função do tempo.

Para ilustrar, a **Figura 34** mostra a fração difundida (M_t/M_o) dos (benzoatos de alquilas em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$), em organo-gel de hexano usando dodecano como solvente externo.

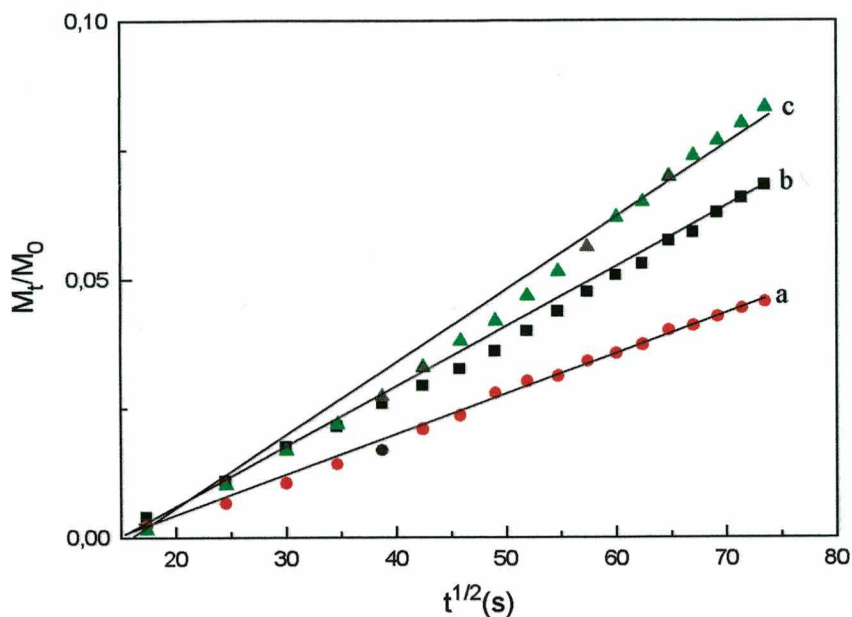


Figura 34 – Fração difundida em função do tempo à 25°C: a) benzoato de etila (●); b) benzoato de butila (■) ; c) benzoato de cetila (▲) usando dodecano como solvente externo.

A **Equação 9** (página 45), mostra que um gráfico de M_t/M_0 versus $t^{1/2}$, fornece uma linha reta cujos os gradientes (D) podem ser calculados, pela **Equação 10** (página 46).

A partir deste tratamento, foram obtidos valores de D para os benzoatos de alquila em organo-géis de hexano em função de vários solventes orgânicos externos. Os dados são mostrados na **Tabela 11** para todos os sistemas utilizados.

Tabela 11 – Valores de Coeficiente de difusão (D) para os benzoatos de alquila em organo-gel de hexano a 25⁰C em função da polaridade do solvente externo.

solvente	Log P ^(a) Viscosid. (cp) ^(b)	C ₆ H ₅ COO-R				
		R=C ₂ H ₅	R= C ₄ H ₉	R= C ₈ H ₁₇	R=C ₁₆ H ₃₄	R=sec-C ₄ H ₉
Cicloexano	3,20 0,898	0,88	1,00	1,20	1,90	0,60
Hexano	3,50 0,298	0,57	1,60	2,40	2,80	0,70
Heptano	4,00 0,386	0,43	1,20	1,20	1,60	0,40
Dodecano	6,6 1,35	5,02	9,30	11,4	14,3	1,33
1,4-dioxano	-1,1 1,322	1,30	1,10	0,93	0,79	0,49
Acetonitrila	-1,3 0,345	1,40	0,65	0,54	0,36	0,23

(a) Coeficiente de Partição ¹²⁷; (b) referência ¹³⁵; (c) média de dois valores experimentais, tempo total de difusão, 90 min.

Os resultados acima podem ser discutidos em termos da polaridade do solvente externo (expressa em log P); comprimento da cadeia alquílica dos benzoatos de alquila e a composição do organo-gel. Para todos os experimentos, o hexano foi utilizado como solvente para a preparação do organo-gel.

Como pode ser observado, através dos dados mostrados na **Tabela 11** e **Figura 35**, em geral há um aumento no valor do coeficiente de difusão com o aumento da cadeia carbônica dos benzoatos de alquila quando o solvente externo é apolar como o cicloexano, hexano, heptano ou dodecano. Exceções foram observadas para o grupo sec-butil onde foram obtidos valores de D semelhantes,

embora, os solventes orgânicos externos sejam diferentes em termos de polaridade (dados mostrados na Tabela 11).

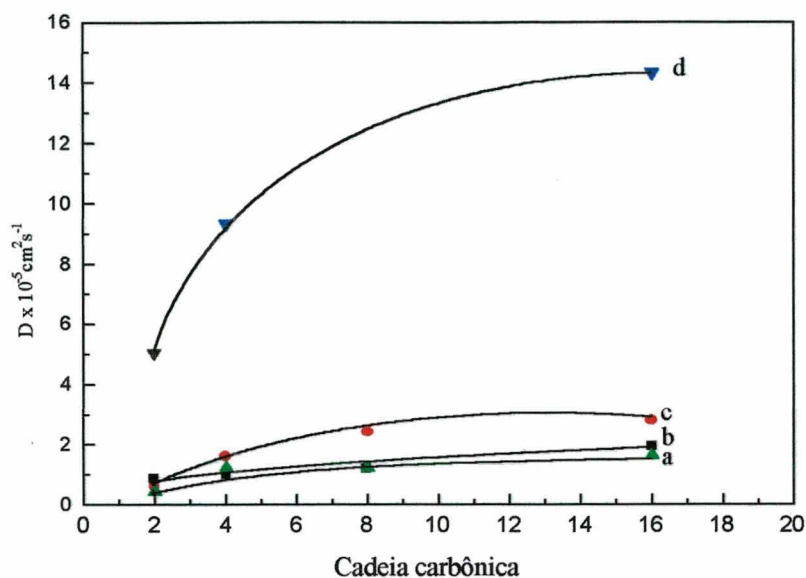


Figura 35 – Valores de D para os benzoatos de alquila em função do aumento da cadeia alquílica em organo-gel de hexano a 25°C: a) cicloexano (▲); b) heptano (■); c) hexano (●); d) dodecano (▼), como solvente externo.

Usando organo-gel de hexano e hexano como solvente externo, os valores de D obtidos para os benzoato etila, butila, octila e de cetila foram 0,57; 1,60; 2,40 e 2,80 $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$, respectivamente. Quando cicloexano ou heptano foram usados como solventes externos, a mesma tendência foi observada. Este resultado é bastante coerente, pois estes solventes têm polaridade semelhante, apresentando altos valores de log P. É interessante observar que os maiores valores de D foram obtidos quando dodecano (Log P = 6,6) foi usado como solvente externo. Novamente, estes valores aumentam com o aumento da cadeia carbônica dos benzoatos de alquila. Neste caso, são esperadas interações melhores entre a fase do óleo, substrato (benzoato de alquila) e a microestrutura de organo-gel, que

conforme discutido anteriormente é formada por solvente orgânico/surfactante/gelatina/água .

Também é interessante discutir, os valores de D para o mesmo substrato em função da polaridade do solvente externo. Por exemplo, os valores de D para benzoato de etila um substrato com cadeia alquílica pequena, em organo-gel de hexano aumentam com o aumento da polaridade do solvente. Como pode ser observado na Tabela 11, utilizando cicloexano, hexano, heptano, dodecano, 1,4-dioxano e acetonitrila como solventes externos os valores de D foram: 0,88; 0,57; 0,43; 5,02; 1,30 e $1,40 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; respectivamente.

As melhores interações ocorrem entre o benzoato de cadeia alquílica pequena (por exemplo, grupo de etila) e solventes mais polares como 1,4-dioxano e acetonitrila. Exceção foi observada quando dodecano é usado como solvente externo. Porém este resultado não pode ser explicado somente em termos de log P (6,6 para o dodecano).

Outro aspecto observado nos resultados obtidos, é que ocorre uma melhor interação hidrofóbica entre os ésteres de cadeia alquílica maior, solvente apolar e o surfactante na microestrutura do MBG. Este aumento nas interações é devido a uma maior solubilidade destes ésteres no meio orgânico.

3.2.2 - Efeito do Solvente na Composição do Organo-gel.

Para verificar o efeito do solvente orgânico utilizado na composição do organo-gel, foram determinados os valores de D em organo-géis de hexano, ciclohexano e heptano utilizando como solvente orgânico os mesmos de sua preparação e composição. Os resultados obtidos para estas medidas são mostrados na Tabela 12 e Figura 36.

Tabela 12 – Valores do Coeficiente de Difusão (D) para os benzoatos de alquila em organo-gel de hexano, cicloexano e heptano, a 25°C.

solvente	Log P	C_6H_5COO-R				
		$R=C_2H_5$	$R=C_4H_9$	$R=C_8H_{17}$	$R=C_{16}H_{34}$	$R=sec-C_4H_9$
Cicloexano ^(a)	3,20	1,60	2,70	3,90	5,60	0,84
Hexano ^(b)	3,50	0,57	1,60	2,40	2,80	0,70
Heptano ^(c)	4,00	0,70	1,60	2,60	3,20	0,74

(a) organo-gel de cicloexano com cicloexano como solvente externo, (b) organo-gel de hexano com hexano como solvente externo, (c) organo-gel de heptano com heptano como solvente externo, (d) média de dois valores experimentais; tempo total de difusão 90 min.

Em geral, observa-se um aumento nos valores de D com o aumento da cadeia carbônica dos benzoatos de alquila, com exceção do grupo sec-butil, provavelmente devido a efeitos estéreo. Os valores dos coeficientes de difusão para o benzoato de etila, butila, octila e cetila em organo-gel de hexano utilizando hexano como solvente externo foram respectivamente $0,57 \times 10^{-5}$; $1,60 \times 10^{-5}$; $2,40 \times 10^{-5}$; e $2,80 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Foram observados resultados semelhantes para o organo-gel de heptano com heptano como solvente externo, e para o organo-gel de cicloexano com cicloexano como solvente externo, isto porque eles apresentam polaridade semelhante (expressa através do log P).¹²⁷

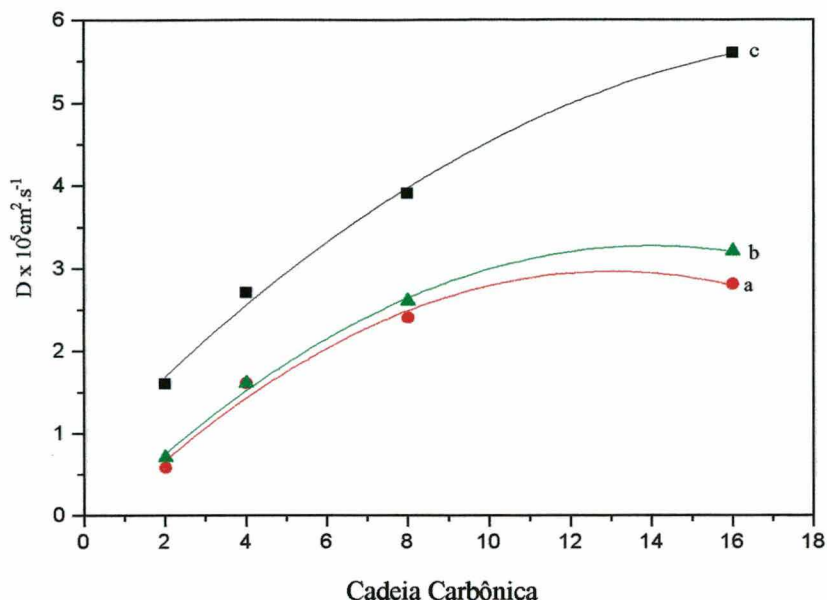


Figura 36 – Valores de D para os benzoatos de alquila em função do aumento da cadeia alquímica a 25°C . a)organo-gel de hexano com hexano como solvente externo (●); b)organo-gel de heptano com heptano como solvente externo (▲); c)organo-gel de cicloexano com cicloexano como solvente externo (■).

Os valores do coeficiente de difusão para o benzoato de sec-butila não mudam significativamente em função do solvente utilizado para preparar o organo-gel, conforme mostrado na **Tabela 11**.

Também, foi observado que há uma grande diminuição no coeficiente de difusão para o benzoato de sec-butila quando comparou-se com os de cadeias alquílicas normais, independentemente do óleo utilizado para preparar o organo-gel (hexano, heptano ou cicloexano), bem como do solvente externo. A diminuição no valor de D para ésteres ramificados pode estar relacionada com efeitos de estereos e com a dificuldade deste substratos para difundirem-se pela estrutura do organo-gel. É observado que solventes orgânicos têm interações diferentes com

gelatina e os outros componentes do sistema. Para o mesmo substrato, foram obtidos valores de D diferentes dependendo do solvente orgânico utilizado para a preparação do organo-gel.

Estudos prévios de diagramas de fase para cicloexano, heptano e hexano mostraram a existência de quatro regiões diferentes.^{108,137} Aspectos importantes podem ser observados quando são comparados os diagramas de fase do cicloexano, heptano e hexano. Independentemente do solvente orgânico, a formação do organo-gel depende do ajuste de seus componentes (água, AOT, solvente orgânico e gelatina) que variam, por exemplo, de um solvente para o outro.^{108,137}

Os valores de D obtidos para o benzoato de octila foram de 3,90; 2,60 e 2,40 $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ em organo-gel de cicloexano, heptano e hexano, respectivamente, com o mesmo óleo como solvente externo. Novamente estes valores não podem ser explicados só em termos de $\log P$, e deve-se considerar a viscosidade destes solventes orgânicos. Como mostrado na **Tabela 11**, o hexano e heptano têm viscosidade mais baixa que cicloexano; 0,298; 0,386 e 0,898, respectivamente. Provavelmente há uma melhor interação entre os benzoatos de alquila e a microestrutura do organo-gel que é formada de cicloexano (com o óleo na sua composição). A mesma tendência é observada para os benzoatos de etila, butila e cetila. Novamente, menores valores de D foram observados para o benzoato de sec-butila.

Assim, a avaliação e determinação de valores de D nestes sistemas diferentes, são importantes para fazer uma correlação de alguns resultados prévios obtidos em termos de rendimentos de reações com as barreiras impostas na estrutura rígida do organo-gel.

De acordo com os resultados obtidos de D , observou-se uma relação entre o coeficiente de difusão dos ésteres em organo-gel, com os rendimentos nas reações de esterificação e transesterificação para este sistema (MBG). Vecchia¹²⁵, observou

que para a reação de esterificação do ácido oléico com diferentes álcoois primários, utilizando enzima imobilizada em MBG, e hexano como solvente, ocorre um aumento no rendimento do produto formado (ésteres) a medida que aumenta a cadeia alquílica do álcool. O mesmo foi observado para os valores do coeficiente de difusão, onde ocorre um aumento gradual do coeficiente de difusão a medida que aumenta a cadeia alquílica do éster. Jesus e colaboradores¹⁰⁹, observaram o mesmo tipo de comportamento para esterificação de álcoois secundários racêmicos utilizando enzimas imobilizadas em MBG de hexano.

3.3 - Medidas de coeficientes de difusão dos alcenoatos de p-nitrofenila em organo-gel de hexano

Torna-se necessário determinar a velocidade de difusão dos ésteres em sistema de organo-gel, a fim de relacionar com os rendimentos das reações de esterificação e transesterificação estudadas neste sistema. Utilizou-se também para este propósito a técnica desenvolvida por Crooks para determinar o coeficiente de difusão do azul de bromofenol em gel de ágar.¹²¹

Os resultados obtidos das medidas de absorvância dos alcenoatos de p-nitrofenila (acetato, octanoato e laurato) em função do tempo em organo-gel de hexano, utilizando hexano e acetonitrila como solventes externos, foram tratados de acordo com as **Equações 9 e 10** (páginas 45 e 46).

A partir deste tratamento matemático, obteve-se as **Figuras 37, e 38**, que mostram a fração difundida dos alcenoatos de p-nitrofenila (M_t/M_0) em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$), em organo-gel de hexano. O valor do coeficiente angular fornece o valor de D , de acordo com a **Equação 10**, página 46.

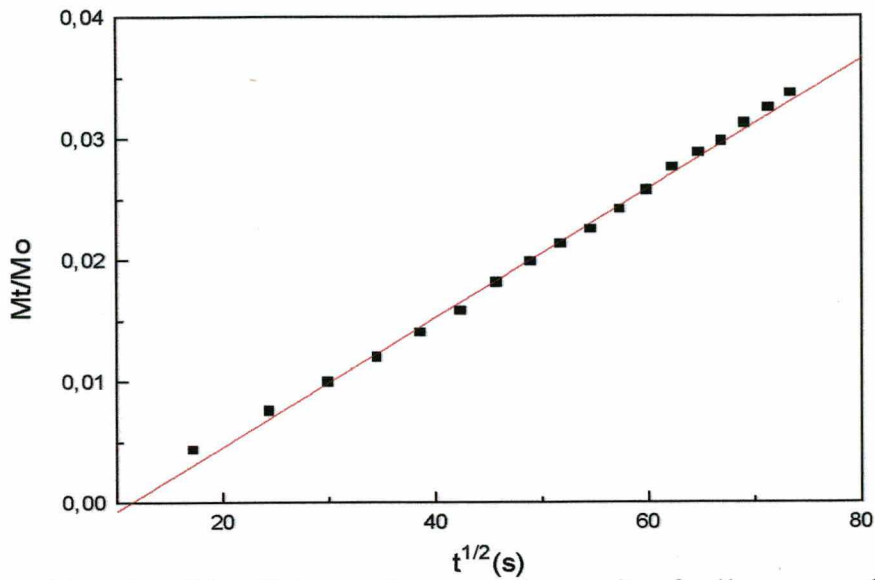


Figura 37 - Fração difundida do laurato de p-nitrofenila , em função da raiz quadrada do tempo, em organo-gel de hexano utilizando como solvente externo hexano, a 25°C.

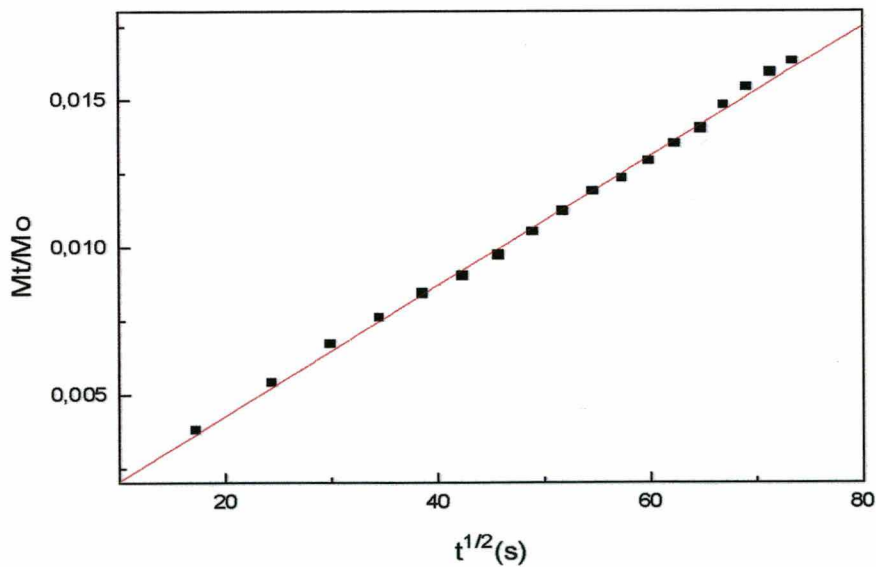
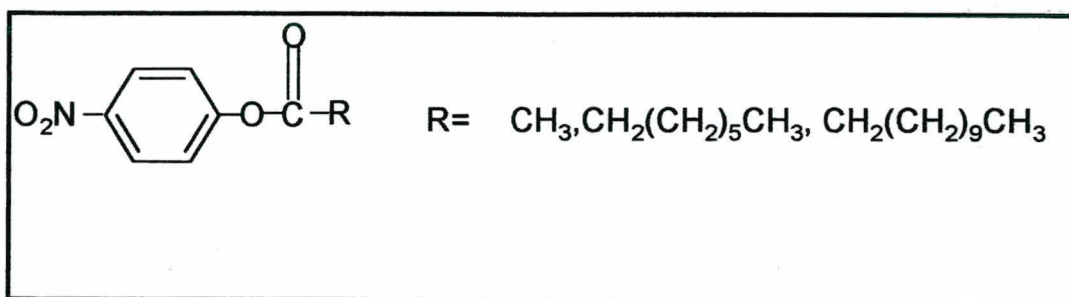


Figura 38 - Fração difundida do laurato de p-nitrofenila , em função da raiz quadrada do tempo, em organo-gel de hexano utilizando como solvente externo acetoneitrila, a 25°C.

Os resultados do coeficiente de difusão obtidos para os alcanóatos de p-nitrofenila, utilizando como solvente externo hexano e acetonitrila, estão apresentados na **Tabela 13**.

Os dados mostram que a medida que aumenta a cadeia alquílica do éster, há em geral um favorecimento no aumento no coeficiente de difusão quando o solvente externo é apolar (hexano). O efeito da cadeia alquílica é observado quando são analisados os valores de D para o acetato ($D= 1,3 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$) e para o laurato ($D= 3,2 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$) de p-nitrofenila, pois há um aumento no coeficiente de difusão com o aumento da cadeia alquílica do éster.

Tabela 13 - Valores de coeficiente de difusão do laurato, octanoato e acetato de p-nitrofenila, em sistema de organo-gel de ciclohexano a 25 °C.



solvente externo	log P	R= CH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃	CH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₃	CH ₃
	viscosid. (cp)	D = 10 ⁵ cm ² /s		
hexano	3,50 0,298	3,20	2,12	1,32
acetonitrila	-1,33 0,345	0,40	1,31	2,70

Um outro aspecto interessante que deve ser analisado é o efeito da polaridade do meio. Aumentando a polaridade do solvente, observa-se um aumento no coeficiente de difusão para os ésteres de cadeia alquílica menor e uma diminuição para os ésteres de cadeia alquílica maior.

Por exemplo, quando utiliza-se hexano (maior log P) como solvente externo o valor do coeficiente de difusão do acetato de p-nitrofenila é $1,32 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ e para o laurato de p-nitrofenila é $3,20 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Em acetonitrila (menor log P) o valor do coeficiente de difusão do acetato de p-nitrofenila é $2,70 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ e para o laurato de p-nitrofenila é $0,40 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Esta variação no coeficiente de difusão é determinada pelo solvente externo presente no sistema; uma vez que os outros parâmetros são mantidos constantes.

Estes resultados estão associados com o coeficiente de partição (log P) dos solventes. Portanto, quanto menor o log P do solvente, maior será sua polaridade, e maior afinidade por substratos de cadeias alquílicas menores. Pode-se também, observar claramente que solventes que apresentam log P maiores (ver **Tabela 11**), interagem melhor com substratos de cadeias alquílicas maiores, fazendo com que estes difundam-se mais rapidamente.

Outros solventes com polaridade intermediária entre a acetonitrila e o n-hexano foram testados, tais como o clorofórmio, tetrahydrofurano, acetato de etila e diclorometano, a fim de utilizá-los como solventes externos, para se determinar o coeficiente de difusão. Porém, estes não foram adequados para se efetuar a determinação do coeficiente de difusão, já que eles absorvem na mesma região dos alcenoatos de p-nitrofenila, que é em 256 nm.

3.3.1 - Efeito da Temperatura na Difusão do Laurato de p-nitrofenila

O efeito da temperatura foi estudado para difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo. A partir dos resultados experimentais obtidos, será possível determinar alguns parâmetros termodinâmicos.

A determinação do coeficiente de difusão do laurato de p-nitrofenila foi efetuada acompanhando a variação da absorbância em função do tempo em 256 nm (absorção máxima do laurato de p-nitrofenila), para cada temperatura constante. A metodologia e tratamento matemático utilizados são os mesmos que foram descritos anteriormente no item 3.1.2, página 53.

Os dados obtidos para a difusão do laurato de p-nitrofenila em diferentes temperaturas, estão mostrados na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Valores do coeficiente de difusão para o laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo em diferentes temperaturas.

Temperaturas (°C)	$D \times 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1(a)}$
20	2,49
25	3,20
30	5,01

(a) os valores de D foram sempre uma média de dois experimentos.

A velocidade de difusão do laurato de p-nitrofenila aumenta com o aumento da temperatura, dentro de uma faixa de temperatura estudada e na qual o organo-gel é estável (20 a 30°C). Para temperaturas superiores, o organo-gel perde sua

rigidez e estabilidade, não sendo assim possível a realização do experimento em temperaturas superiores, conforme discutido anteriormente para as reações de transesterificação enantiosseletivas.

A **Figura 39**, mostra um gráfico de $\ln D$ versus $1/T$ (**Equação 12**), de onde obtém-se o coeficiente angular da reta, que é igual a $-E_a/R$.

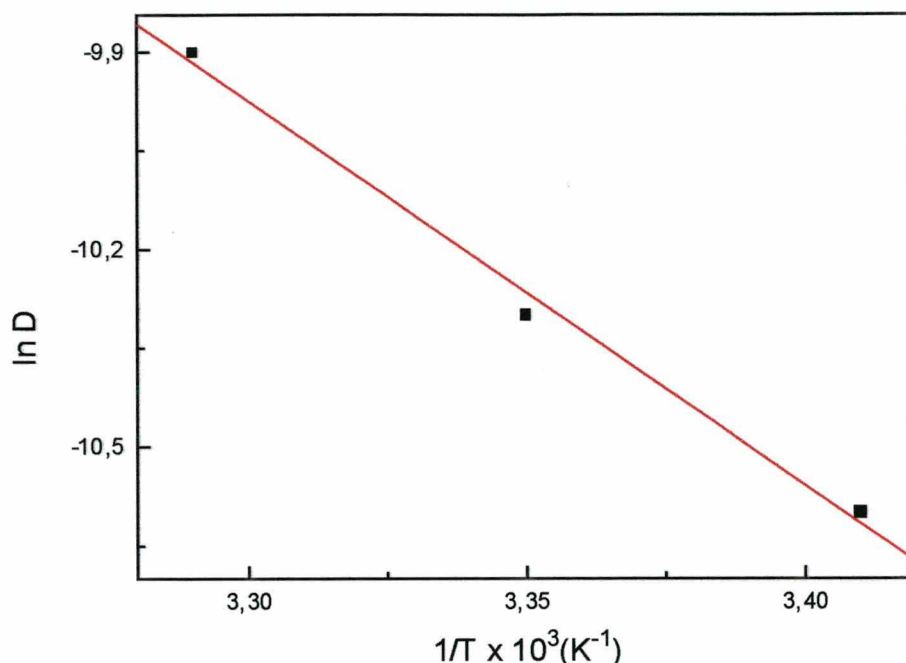


Figura 39 - Variação de D em função da temperatura para a difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo.

Utilizando a equação linearizada de Arrhenius foi possível determinar a energia de ativação (E_a) para este processo.

O valor encontrado para a E_a , foi de **11,5 Kcal/ mol** (coeficiente de correlação linear igual a 0,996). Este valor baixo de energia de ativação é um indício de que o processo é lento e controlado por difusão.

Aplicando a equação de Eyring, pode-se então determinar outros parâmetros termodinâmicos, como a entalpia de ativação (ΔH^\ddagger), a energia de ativação (ΔG^\ddagger) e a entropia de ativação (ΔS^\ddagger).

A **Equação** de Eyring foi mostrada na página 60 (**Equação 13**). A **Equação 13** linearizada fornece a **Equação 14** (Página 60) que permite o cálculo de ΔH^\ddagger , através do coeficiente angular.

A **Figuras 40**, mostra o gráfico de $\ln D/ T$ versus $1/T$ para a difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo. O valor de ΔH^\ddagger determinado através do coeficiente angular foi **11,5 Kcal/ mol**, e o coeficiente de correlação linear foi igual a 0,996.

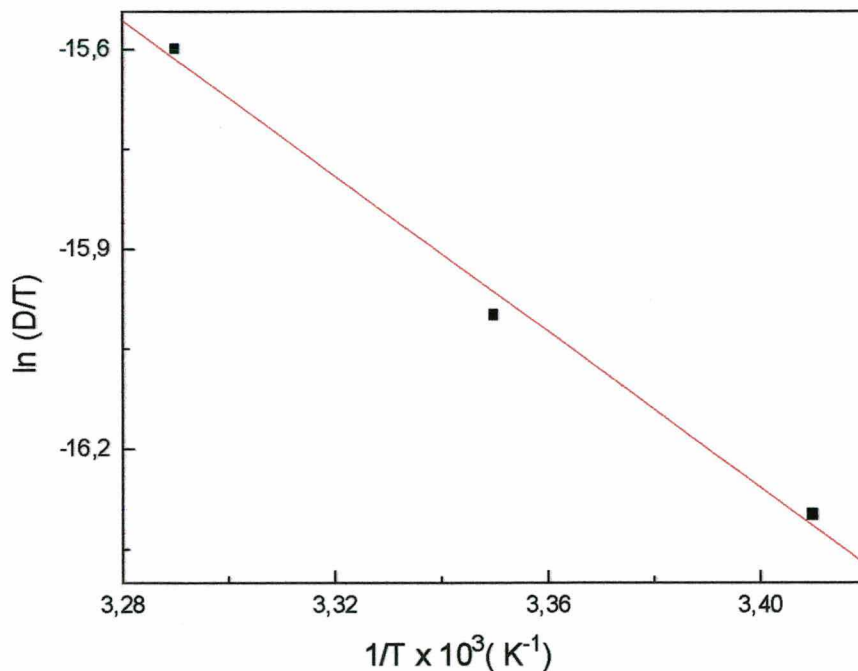


Figura 40 - Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ versus $1/T$ para a difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo em temperaturas de 20 à 30°C.

A equação de Eyring pode ser rearranjada fornecendo a **Equação 16** (página 62). Assim valores da energia livre de ativação (ΔG^\ddagger), podem ser calculados para as diferentes temperaturas nas quais realizaram-se os experimentos.

De acordo com a **Equação 15** os valores da energia livre de ativação (ΔG^\ddagger) podem ser calculados para cada temperatura. O valor de ΔG^\ddagger determinado através da equação rearranjada foi de **11,5 kcal/ mol**.

Com o valor da energia de ativação, e com o valor da entalpia de ativação, encontrado pelo gráfico de Eyring, foi então possível calcular a entropia de ativação, utilizando a **Equação 16**, página 62. O valor de ΔS^\ddagger encontrado foi de **-132 cal/mol.K**.

A **Tabela 15** resume os dados dos parâmetros termodinâmicos obtidos para difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo.

Tabela 15 – Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para a difusão do laurato de p-nitrofenila em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo.

éster	E_a (kcal/mol)	ΔH^\ddagger (kcal/mol)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	ΔS^\ddagger (cal/mol)
Laurato de p-nitrofenila	11,5	11,5	50,9	-132

Comparando os resultados termodinâmicos obtidos de coeficiente de difusão com os valores obtidos para a reação de transesterificação do laurato de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos, observou-se uma relação efetiva

entre os mesmos. Nestes sistemas foram obtidos valores baixos de energia de ativação, o que indicam que estes processos são controlados por difusão. Observou-se também, que para a reação de transesterificação enantiosseletiva dos alcenoatos de p-nitrofenila com diferentes álcoois secundários racêmicos, utilizando enzima imobilizada em organo-gel, e hexano como solvente externo, ocorre um aumento no rendimento do produto formado (transéster), a medida que aumenta a cadeia alquílica do álcool. Resultados semelhantes foram observados para os valores do coeficiente de difusão, pois o coeficiente de difusão aumenta a medida que aumenta a cadeia alquílica do substrato (éster).

4 – CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos, pode-se fazer algumas considerações finais sobre a técnica de imobilização de enzimas em organo-gel para sua utilização em reações de transesterificação.

- O sistema de MBG utiliza pequena quantidade de enzima (10 mg / mL), bem menor que outros sistemas, e é um método que pode ser amplamente utilizado em solventes de baixa polaridade.
- As lipases imobilizadas em MBG mostraram ser um método bastante eficiente, para as reações de transesterificação dos alcenoatos de p-nitrofenila com álcoois secundários racêmicos.
- A *C.V.lipase* quando imobilizada em sistema de organo-gel é a mais ativa como catalisador em reações de transesterificação, pois apresenta maior rendimento quando comparada com as outras lipases (*Microbial*, *Lipolase* e *Pseudomonas sp*).
- Os baixos valores encontrados de energia de ativação e entalpia de ativação, além de um valor de entropia negativo para a reação de transesterificação, do laurato de p-nitrofenila com os álcoois secundários racêmicos, demonstra que neste sistema as reações têm velocidades controladas por difusão dos substratos do meio reacional para o organo-gel e vice-versa.

- Quando a C.V. lipase é imobilizada em organo-gel e utilizada na resolução de álcoois secundários racêmicos via reações de transesterificação, este sistema demonstrou preferência pelo enantiômero com rotação óptica negativa.
- As lipases *Microbial*, *lipolase* e *Pseudomonas sp*, quando foram imobilizadas em organo-gel e utilizadas na resolução de álcoois secundários racêmicos via reações de transesterificação, não foram eficientes, ou seja, não resolveram os racematos.
- Os valores de enantiosseletividade (E) foram baixos, sendo que os melhores resultados de excessos enantioméricos foram obtidos para resolução do (\pm)-2-octanol (ee_p 51%) em organo-gel de hexano, utilizando hexano como solvente externo.
- Os melhores rendimentos (70-96%) foram obtidos com a C.V.lipase e hexano como solvente externo. Com a mesma enzima, e utilizando acetonitrila como solvente externo os rendimentos ficaram em torno de 30%.
- A velocidade de difusão é favorecida para ésteres de cadeia alquílica longa em meio apolar, visto que o coeficiente de difusão aumenta com o aumento da cadeia do substrato. Enquanto que o aumento da polaridade do meio favorece a difusão de substratos de cadeia carbônica pequena.
- O grau de impedimento imposto pelas barreiras difusionais é maior para substratos ramificados (por ex. benzoato de sec-butila).

- Os valores do coeficiente de difusão, mostraram uma relação entre o rendimento da reação de esterificação ou transesterificação com a velocidade de difusão do substrato no organo-gel (MBG).

Finalmente, a partir destes resultados, pode-se concluir que o organo-gel é um sistema bastante eficiente para realizar reações de transesterificação enzimática em meio orgânico. Com relação aos baixos valores de excessos enantioméricos encontrados, talvez estes possam ser melhorados utilizando enzimas mais puras ou aumentando a sua concentração no meio reacional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G.;
Lipases Imobilizadas em Organo-Gel e Sua Aplicação em Síntese Orgânica,
Anais do IIº Seminário Internacional de Tecnologia Enzimática, vol. 2,
1995.
2. BONNEAU, P. R.; MARTIN, R.; LEE, T.; SAKOWICZ, R.;
MARTICHONOK, V.; HOGAAN, J. K.; GOLD, M.; JONES, J. B.;
“Enzymes in Organic Synthesis. Present and Future”, **J. Braz. Chem. Soc.**,
7, 357, **1996**.
3. IVANOV, A. E.; SCHNEIDER, M.; “Methods for the Immobilization of
Lipases and Their Use for Ester Synthesis”, **J. Molecular Catalysis B:
Enzymatic**, 3, 303, **1997**.
4. KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITON, H.; “Proteased-Catalyzed Synthesis
Reactions and Immobilization-Activation of the Enzymes in Hydrophilic
Organic Solvents”, **J. Biotechnol.**, 14, 239, **1991**
5. HINZE, W. L.; UEMASU, I.; DAI, F.; BRAUN, J. M.; “Analytical and Related
Applications of Organogels”, **Current Opinion in Colloid & Interface
Science**, v. 01, cap. 4, **1996**.
6. MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; **HARPER: Bioquímica**,
Atheneus, SP, 6º ed., cap. 7, **1990**.

7. MORRISON, R. T.; BOYD, R. N.; **Organic Chemistry**, Allyn and Bacon, Boston, 5^o ed., cap. 41, 1990.
8. Revista Publicada pela Novo Nordisk S/A 1996.
9. JONES, J. B.; "Enzymes in Organic Synthesis", **Tetrahedron**, 42, 3351, 1986.
10. THORNTON, R. M.; "The Chemistry of Life", Benjamin/Cummings, Califórnia, 1998.
11. FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3rd Edition, Springer-Verlag, New York, 1997.
12. STRYER, L. **Bioquímica**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992.
13. JESUS, P.C.; SILVA, P.L.F; JOÃO, J.J.; NASCIMENTO, M.G.; "Enantioselective Esterification of 2-Methylpentanoic Acid Catalysed via Immobilized Lipases in Chrysotile and Microemulsion-Based Gels", **Synthetic Communication**, 28, 15, 1998.
14. BERGER, D. L.; **Aroma Biotechnology**. Hannover, Springer. 1995.
15. GUTMAN, A. L.; ZUOBI, K.; GUIBE, J. E.; "Lipase Catalyzed Hydrolyses of γ -Substituted α -Aminobutyrolactones", **Tetrahedron Lett.**, 31, 2037, 1990.

16. RUCKENSTEIN, E.; WANG, X.; "Lipase Immobilized on Hydrophobic Porous Polymer Supports Prepared by Concentrated Emulsion Polymerization and Their Activity in the Hydrolysis of Triacylglycerides", **Biotechnol. and Bioengineering**, 42, 821, 1993.
17. KRAMER, G. F. H.; BATENBURG, L.; DERKSEN, J. T. P.; CUPERUS, F. P.; "A Convenient Assay for Immobilized Lipases", **J. Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 3, 121, 1997.
18. BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R.R.; "Substâncias Enantiomericamente Puras: A Questão dos Fármacos Quirais", **Quimica Nova**, 20, 647, 1997.
19. LIMA, V. L. E.; "Os Fármacos e a Quiralidade uma Breve Abordagem", **Quimica Nova**, 20, 657, 1997.
20. DESNUELLE, P.; The lipases. In: **The enzymes**, New York: Academic Press, 7, 575, 1975.
21. CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A.; "Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases", **Quimica Nova**, 18, 544, 1995.
22. MARGOLIN, A. L.; KLIBANOV, A. M.; Peptide Synthesis Catalyzed by Lipases in Anhydrous Organic Solvents, **J. Am. Chem. Soc.** 109, 3802, 1987.

23. KARLSSON, S.; BACKLUND, S.; ERIKSSON, F.; HEDSTROM, G.; “Enzymatic Esterifications and Transesterifications in AOT-based Gels with different composition”, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 10, 137, 1998.
24. MOHAPATRA, S. C.; HSU, J. T.; “Lipase Kinetics in Organic-Water Solvent with Amphipathic Substrate for Chiral Reaction”, **Biotechnol. and Bioengineering**, 55, 399, 1997.
25. KLIBANOV, A. M.; “Asymmetric Transformations Catalyzed by Enzymes in Organic Solvents”, **Acc. Chem. Res.** 23, 114, 1990
26. BRIEVA, R.; CRICH, J. E.; SIH, C. J.; “Chemoenzymatic Synthesis of the C-13 Side Chain of Taxol: Optically-Active 3-Hydroxy-4-Phenyl β -Lactam Derivatives”, **J. Org. Chem.**, 58, 1068, 1993.
27. GU, Q. M.; CHEM, C. S.; SIH, C. J.; “A Facile Enzymatic Process for Preparation of (+)-S-2-(6-Methoxy-2-Naphthyl) Propionic Acid (Naproxen)”, **Tetrahedron Lett.**, 27, 1763, 1986.
28. BIANCHI, D.; BOSETTI, A.; CESTI, P.; GOLINI, P.; “Enzymatic Resolution of 1,2 Diols: Preparation of Optically Pure Dropropizine”. **Tetrahedron Lett.**, 33, 3231, 1992.

29. OTTOLINA, G.; CARRERA, G.; RIVA, S.; "Synthesis of Ester Derivatives of Chloramphenicol by Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic Solvents". *J. Org. Chem.*, 55, 2366, 1990.
30. BEVINAKATTI, H.; S.; BANERTI, A. A.; "Lipase Catalysis in Organic Solvents. Application to the Synthesis of (R)-and (S)-Atenolol", *J. Org. Chem.*, 57, 6003, 1992.
31. LANGRAND, G.; BARATTI, J.; BUON, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; "Lipase Catalyzed Reactions and Strategy for Alcohol Resolution", *Tetrahedron Lett.*, 27, 29, 1986
32. FABER, K.; RIVA, S.; "Enzyme-Catalyzed Irreversible Acyl Transfer", *Synthesis*, 10, 895, 1992.
33. NAEMURA, K.; FUKUDA, R.; TAKAHASHI, N.; KONISHI, M.; HIROSE, Y.; TOBE, Y.; Enzyme-Catalyzed Asymmetric Acylation and Hydrolysis of cis-2,5-Disubstituted Tetrahydrofuran Derivatives: Contribution to Development of Models for Reactions Catalysed by *Porcine Liver Esterase* and *Porcine Pancreatic Lipase*", *Tetrahedron Asymmetry*, 4, 911, 1993.
34. TOONE, E. J.; JONES, B.; "Enzymes in Organic Synthesis 49. Resolutions of Racemic Monocyclic Ester with *Pig Liver Esterase*", *Tetrahedron Asymmetry*, 2, 207, 1991.

35. LAUMEN, K.; BRETGOFF, D.; SCHNEIDER, M. P.; "Enzymic Preparation of Enantiomerically Pure Secondary Alcohols. Ester Synthesis by Irreversible Acyl Transfer Using a Highly Selective Ester Hydrolases from *Pseudomonas sp.*; an Attractive Alternative to Ester Hydrolysis, **J. Chem. Soc. Chem. Commun**, 1459, 1988.
36. SEU, Y. B.; LIM, T. K.; KIM, C. J.; KANG, S. C.; "Preparation of Enantiomerically Pure (R)-2-Butyryloxymethylglycidol by Lipase-Catalyzed Asymmetric Hydrolysis", **Tetrahedron Asymmetry**, 6, 3009, 1995.
37. SONNET, P. E.; "Kinetic Resolutions of Aliphatic Alcohols with a Fungal Lipase from *Mucor Miehei*", **J. Org. Chem.**, 52, 3477, 1987.
38. KANG, S. K.; JEON, J. H.; YAMAGUCHI, T.; KIM, J. S.; KO, B. S.; "Enzymatic Synthesis of (S)-(-)-1-(2-Thienyl)propyl Acetate", **Tetrahedron Asymmetry**, 6, 2139, 1995.
39. MORGAN, B.; OEHLISCHLAGER, A. C.; STOKES, T. M.; "Enzyme Reactions in Apolar Solvent. The Effect of Adjacent Unsaturation on the PPL-Catalyzed Kinetic Resolution of Secondary Alcohols", **J. Org. Chem.**, 57, 3231, 1992.
40. CHEN, C. S.; LIU, Y. C.; "Amplification of Enantioselectivity in Biocatalyzed Kinetic Resolution of Racemic Alcohols", **J. Org. Chem**, 56, 1966, 1991.

41. OKAHATA, Y.; HATANO, A.; JIRO, K.; "Enhancing Enantioselectivity of a Lipid-Coated Lipase via Imprinting Methods for Esterification in Organic Solvents", **Tetrahedron: Asymmetry**, 6, 1311, 1995.
42. LUNDH, M.; SMITT, O.; HEDENSTRÖM, E.; "Sex Pheromone of Pine Sawflies: Enantioselective Lipase Catalysed Transesterification of Erythro-3,7-Dimethylpentadecan-2-ol, Diprionol", **Tetrahedron Asymmetry**, 7, 3277, 1996.
42. KARO, K.; NEGI, S.; KAWASHIMA, A.; NAKAMURA, K.; "Optical Resolution of 1- Arylethanol Using Transesterification Catalyzed by Lipases", **Enantiomer**, 2, 261, 1997.
43. CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; COMBES, D.; "Kinetics of Geranyl Acetate Synthesis by Lipase-Catalysed Transesterification in n-Hexane", **Enzyme Microb. Technol**, 14, 293, 1992.
44. LUNDH, M.; NORDIN, O.; HEDENSTROM, M.; HOGBERG, H. E.; "Enzyme Catalysed Irreversible Transesterifications with Vinyl Acetate. Are They Really Irreversible?", **Tetrahedron Asymmetry**, 6, 2237, 1995.
45. MURAKAMI, M.; KAWASAKI, Y.; KAWASARI, M.; OKAI, H.; "Transesterifications of Oil by Fatty Acid-Modified Lipase", **JAOCS**, 70, 571, 1993.

46. SERIBURI, V.; AKOH, C. C.; “Enzymatic Transesterifications of Triolein and Stearic Acid and Solid Fat Content of Their Products”, **JAOCS**, 75, 1511, 1998.
47. MUSTRANTA, A.; SUORTTI, T.; POUTANEN, K.; “Transesterification of Phospholipids in Different Reaction Conditions”, **JAOCS**, 71, 1415, 1994.
48. CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; “Kinetics and Modelling of Transesterification Reactions Catalised by Cutinase in AOT Reversed Micelles” **J. Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 5, 361, 1998.
49. YEE, L. N.; AKOH, C. C.; PHILLIPS, R. S.; “Lipase PS-Catalyzed Transesterification of Citronellyl Butyrate and Geranyl Caproate: Effect of Reaction Parameters”, **JAOCS**, 74, 255, 1997.
50. WU, X. Y.; JAASKELAINEN, S.; LINKO, Y.; “An Investigation of Crude Lipases for Hydrolysis, Esterification and transesterification”, **Enzyme Microb. Technol.** 19, 227, 1996.
51. FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI A.; SANTANIELLO, E.; “A Chemoenzymatic Synthesis of Enantiomerically Pure (R)-and (S)-2-Methyldecan-1-ol”, **J. Chem. Soc. Perkin Trans I**, 1159, 1992.

52. MORGAN, B.; OEHLSCHLAGER, A. C.; STOKES, T.; Enzyme Reactions in Apolar Solvents. The Resolution of Branched and Unbranched 2-Alkanols by Porcine Pancreatic Lipase”, **Tetrahedron**, 47, 1611, 1991.
53. CARRETERO, J. C.; DOMINGUEZ, E.; “Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of γ -Hydroxy Phenyl Sulfones”, **J. Org. Chem.**, 57, 3867, 1992.
54. MILTON, J.; BRAND, S.; JONES, M. F.; RAYNER, R. M.; “Enzymatic Resolution of α -Acetoxysulfides: A New Approach to the Synthesis of Homochiral S, O-Acetals”, **Tetrahedron Asymmetry**, 6, 1903, 1995.
55. LEGROS, J. Y.; TOFFANO, M.; DRAYTON, S.; RIVARD, M.; FIAUD, J. C.; “Kinetic Resolution of Secondary Alcohols Mediated by *Rabbit Gastric Lipase*”, **Tetrahedron Lett.**, 38, 1915, 1997.
56. WANG, Y. F.; CHEN, S. T.; LIU, K. K. C.; WONG, C. H.; “Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification Using Enol Esters: Resolution of Cyanohydrins and Syntheses of Ethyl (R)-2-Hydroxy-4-Phenylbutyrate and (S)-Propanolol”, **Tetrahedron Lett.**, 30, 1917, 1989.
57. KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M.; “Enzymatic Reactions in Organic Media”, 1^o ed., Chapman & Hall, London, p.95, 1996.
58. SCHMID, R. D.; VERGER, R.; “Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications”, **Angew. Chem. Int. Ed.** 37, 1608, 1998.

59. BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, 343,767, 1990.
60. BLOKMAN, H., MONSEN, TSUJITA, T., Lipid-lipid complexes: properties and effects on lipase binding to surfaces. **J. Am. Org. Chem. Soc.**, 65, 89, 1988.
61. CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A.; "Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases", **Quím. Nova**, 18, 544, 1995.
62. WONG, C.; WHITESIDES, M.; **Enzymes in Organic Chemistry**, Pergamon, 12, 70, 1994.
63. NATARAJAN, K. R.; "Biocatalysis in Organic Solvents", **J. Chem. Educ.**, 68, 13, 1991.
64. KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITON, H.; "Proteased-Catalyzed Synthesis Reactions and Immobilization-Activation of the Enzymes in Hydrophilic Organic Solvents", **J. Biotechnol.**, 14, 239, 1991.
65. POTTIE, M.; EYCKEN, J. V.; VANDEWALLE, M. "Enzymatic Enantioselective Hydrolysis of 2,2-Dimethyl-1,3-Dioxolane-4-Carboxylic Esters", **Tetrahedron Lett.** 30, 5319, 1989

66. KALBE, J.; HOCKER, H.; BERNDT, H.; "Design of Enzyme Reactors as Chromatographic Columns for Racemic Resolution of Amino and Esters", **Chromatographia**, 28, 193, 1989.
67. BIANCHI, D.; CESTI, P.; BATTISTEL, E.; Anhydrides as Acylating Agents in Lipase- Catalyzed Stereoselective Esterification of Racemic Alcohols", **J. Org. Chem**, 53, 5531, 1988.
68. KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITON, H.; "Proteased-Catalyzed Synthesis Reactions and Immobilization-Activation of the Enzymes in Hydrophilic Organic Solvents", **J. Biotechnol.**, 14, 239, 1991.
69. MORGAN, B.; OEHLISCHLAGER, A. C.; STOKES, T. M.; "Enzyme Reactions in Apolar Solvents. The Resolution of Branched and Unbranched 2-Alkanols by *Porcine Pancreatic Lipase*", **Tetrahedron**, 47, 1611, 1991.
70. KLIBANOV, A. M.; CAMBOU, B.; "Preparative Production of Optically Active Esters and Alcohols Using Esterase-Catalyzed Stereospecific Transesterification in Organic Media", **J. Am. Chem. Soc.**, 106, 2687, 1984.
71. KLIBANOV, A. M.; KIRCHNER, G.; SCOLLAR, M. P.; "Resolution of Racemic Mixtures via Lipase Catalysis in Organic Solvents", **J. Am. Chem. Soc.**, 107, 7072, 1985.

72. INADA, Y.; NISHIMURA, H.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMOTO, T.; SAHA, A. R.; SAITO, Y.; "Ester Synthesis Catalyzed by Polyethylene Glycol-Modified in Benzene", **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 122, 845, 1984.
73. TAKAHASHI, K.; AJIMA, A.; YOSHIMOTO, T.; OKADA, M.; MATSUSHIMA, A.; TAMAURA, Y.; INADA, Y.; "Chemical Reactions by Polyethylene Glycol Modified Enzymes in Chlorinated Hydrocarbons", **J. Org. Chem.**, 50, 3414, 1985.
74. KODERA, Y.; TAKAHASHI, K.; NISHIMURA, H.; MATSUSHIMA, A.; SAITO, Y.; INADA, Y.; "Ester Synthesis From α -Substituted Carboxylic Acid Catalyzed by Polyethylene Glycol Modified Lipase From *Candida cylindracea* in Benzene", **Biotechnol. Lett.**, 8, 881, 1986.
75. NISHIO, T.; TAKAHASHI, K.; TSUZUKI, T.; YOSHIMOTO, T.; KODERA, Y.; MATSUSHIMA, A.; SAITO, Y.; INADA, Y.; "Ester Synthesis in Benzene by Polyethylene Glycol-Modified from *Pseudomonas fragi*", **J. Biotechnol**, 8, 39, 1988.
76. INADA, Y.; MATSUSHIMA, A.; TAKAHASHI, K.; SAITO, Y.; "Polyethylene Glycol (PEG) Protein Conjugates: Application to Biotechnological Process", **J. Bioactive and Compatible Polymers**, 5, 343, 1990.

77. BARBARIC, S.; LUISI, P. L. "Micellar Solubilization of Biopolymers in Organic Solvents. 5. Activity and Conformation of α -Chymotrypsin in Isooctane - AOT Reverse Micelles", **J. Am. Chem. Soc.**, 103, 4239, 1981.
78. MARTINEK, K.; LEVASHOV, A. V.; KLYACHKO, N. L.; PANTIN, V. I.; BEREZIN, I. V.; "The Principles of Enzymes Stabilization VI. Catalysis by Water-Soluble Enzymes Entrapped into Reversed Micelles of Surfactants in Organic Solvents", **Biochem. Biophys. Acta**, 657, 277, 1981.
79. LEVASHOV, A. V.; KHMELNITSKY, Y. L.; KLYACHKO, N. L.; CHERNYAK, V.Y.A.; MARTINEK, K.; "Enzymes Entrapped into Reversed Micelles in Organic Solvents", **J. Colloid Interface Sci.**, 88, 444, 1982.
80. LUISI, P. L.; "Enzymes Hosted in Reverse Micelles in Hydrocarbon Solution", **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, 24, 439, 1985.
81. JAIN, T. K.; VARSHNEY, M.; MAITRA, A.; "Structural Studies of Aerosol - OT Reverse Micellar Aggregates by FT-IR", **J. Phys. Chem.**, 93, 7409, 1989.
82. RUCKENSTEIN, E.; KARPE, P.; "On the Enzymatic Superactivity in Ionic Reverse Micelles", **J. Colloid Interface Sci.**, 149, 408, 1990.
83. MARTIN, C.; MAGID, L.; "Carbon-13 NMR Investigations of Aerosol - OT Water-in-Oil Microemulsions", **J. Phys. Chem.**, 85, 3938, 1981.

84. FLETCHER, P. D. I.; FREEDMAN, R. B.; MEAD, J.; "Reactivity of α -*Chymotrypsin* in Water-in-Oil Microemulsion", **J. Colloid Surfaces**, 10, 193, 1984.
85. FLETCHER, P. D. I.; ROBINSON, B. H.; "Activity of Lipase in Water-in-Oil Microemulsion", **J. Chem. Soc. Faraday Trans I**, 81, 2667, 1985.
86. FLETCHER, P. D. I.; FREEDMAN, R. B.; ROBINSON, B. H.; "Lipase-Catalysed Ester Synthesis in Oil-Continuous Microemulsion", **Biochem. Biophys. Acta**, 912, 278, 1987.
87. DERKSEN, J. T. P.; CUPERUS, F. P.; "Lipase-Catalysed Hydrolysis of Crambe Oil in AOT-Isooctane Reversed Micelles", **Biotechnol. Lett.**, 14, 937, 1992.
88. HAERING, G.; LUISI, P. L.; "Hydrocarbon Gels from Water-in-Oil Microemulsions", **J. Phys. Chem.**, 90, 5892, 1986.
89. ROBINSON, B. H.; "Microemulsions - Properties and Novel Chemistry", **Chem. in Brit.**, 4, 342, 1991.
90. STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; PROVELEGIOUS, M.; KOLISIS, F. N.; "Esterification Reactions Catalyzed by Lipases in Microemulsions: The Role of Enzyme Localization in Relation to Its Selectivity", **Biotechnol. and Bioeng.**, 42, 103, 1993.

91. OSTERBERG, E.; BLOMSTROM, A. C.; HOLMBERG, K.; “Lipase Catalysed Transesterifications of Unsaturated Lipids in a Microemulsion”, **JAOCS**, 66, 1330, 1989.
92. DANIELSON, I.; LINDMAN, B.; “The Definition of Microemulsion”, **Colloids and Surfaces**, 3, 391, 1981.
93. MENGER, F. M. “Chemical Collectivism”, **Chem. in Brit.**, 300, 1993.
94. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; “Some Comments on the Gelation of Gelatin Containing Water/ Oil Microemulsions”, **J. Phys. Chem.**, 91, 4211, 1987.
95. REES, G. D.; ROBINSON, B. H.; “Microemulsions and Organogels: Properties and Novel Applications”, **Advanced Materials**, 5, 608, 1993.
96. HAERING, G.; LUISI, P. L.; “Hydrocarbon Gels from Water-in-Oil Microemulsions”, **J. Phys. Chem.**, 90, 5892, 1986.
97. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; “Mutual Gelation of Gelatin and Water-in-Oil Microemulsion”, **Chimia**, 40, 233, 1986.
98. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; “Evidence of Fractal Network Formation in Gelatin w/o Microemulsion”, **Europhys Lett.**, 9, 293, 1989.
99. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; XU, G.; “Synthesis of Covalently Cross-Linked Gelatin Gels in Percolating Water-in-Oil Microemulsions”, **Makromol Chem. Rapid. Commun.**, 11, 217, 1990.

100. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; SAGER, W.; "Formation of Microemulsion-Based Gels", **J. Phys. Chem.**, 95, 5642, 1991.
101. ATKINSON, P. J.; GRINSON, M. J.; HEENAN, R. K.; HOWE, A.M.; ROBINSON, B. H.; "Structure of Microemulsion-Based Organo-Gels", **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, 1807, 1989.
102. NASCIMENTO, M. G.; REES, G. D.; JENTA, T. R. J.; ROBINSON, B. H.; "Enzyme-Catalysed Organic Synthesis in Microemulsion-Based Gels", **Atual. de Físico-Química Orgânica.**, 520, 1989.
103. NASCIMENTO, M. G.; REES, G. D.; JENTA, T. R. J.; ROBINSON, B. H.; "Enzyme-Catalysed Organic Synthesis in Microemulsion-Based Gels", **Atual. de Físico-Química Orgânica.**, 520, 1989.
104. REES, G. D.; NASCIMENTO, M. G.; JENTA, T. R. J.; ROBINSON, B. H.; "Reverse Enzyme Synthesis in Microemulsion-Based Organo-Gels", **Biochem. Biophys. Acta**, 1073, 493, 1991.
105. NASCIMENTO, M. G.; REZENDE, M. C.; VECCHIA, R. D.; JESUS, P. C.; AGUIAR, L. M. Z.; "Enzyme-Catalysed Esterification in Microemulsion-Based Organogels. **Tetrahedron Lett.**, 33, 5891, 1992.

106. REES, G. D.; JENTA, T. R. J.; NASCIMENTO, M. G.; CATAURO, M.; ROBINSON, B. H.; STEPHENSON, G. R.; OLPHERT, R. D. G.; "Use of Water-in-Oil Microemulsions and Melatin-Containing Microemulsion-Based Gels for Lipase-Catalysed Ester Synthesis in Organic Solvents", **Indian J. Chem.**, 32, 30, 1993.
107. REES, G. D.; ROBINSON, B. H.; "Microemulsions and Organogels: Properties and Novel Applications", **Advanced Materials**, 5, 608, 1993.
108. AGUIAR, L. M. Z.; NASCIMENTO, M. G.; PRUDENCIO, G. E.; REZENDE, M. C.; VECCHIA, R. D.; "The Preparation of Microemulsion-Based Gels of n-Hexane or Cyclohexane for Enzyme Immobilization", **Quím. Nova**, 16, 414, 1993.
109. JESUS, P. C.; REZENDE, M. C.; NASCIMENTO, M. G. "Enzymatic Resolution of Alcohols via Lipases Immobilized in Microemulsion-Based Gels", **Tetrahedron Asymmetry**, 6, 63, 1995.
110. ANTHOSEN, H. W.; HOFF, B. H.; ANTHONSEN, T.; "A Simple Method for Calculating Enantiomers Ratio and Equilibrium Constants in Biocatalytic Resolutions", **Tetrahedron: Asymmetry**, 6, 3015, 1995.
111. CHEN, C. S.; WU, S. H.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J.; "Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers. 2. Enzymes-Catalyzed Esterifications in Water-Organic Solvents Biphasic Systems", **J. Am. Chem. Soc.**, 109, 2812, 1987.

112. JESUS, P. C.; “Enzimas Imobilizadas em Crisotila e Organo-gel: Aplicação na Resolução de Ácidos Racêmicos”, **Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis, SC, 1998.**
113. **A Concise Dictionary of Chemistry – Oxford 1990, p.96 (Oxford University Press)**
114. FOREMAN, M. I., KELLY, I., LUKOWIECKI, G, A. A Method for the Measurement of Diffusion Constants Suitable for Studies of Non-Occluded Skin., **J. Pharm. Pharmac., .29,108, 1977.**
115. CONSTANTINO, L., VOLPE, C. D., ORTONA, O., et al. Difusion in Microemulsion Systems. **J. Col. Inter. Sci., 148, 72, 1992.**
116. HADGRAFT, J., Calculations of Drug Release Rates from Controlled Release Devices. **Inst. J. Pharmaceut., 2, 177, 1979.**
117. ALBERY, W. J., COUPER, A. M., HADGRAFT, J.,et al. Transport and Kinetics in two Phase Systems. **J. Chem. Soc., Faraday Trans I., v70, 1124, 1974.**
118. KARSA, D. R., and STEPHENSON, R. A., Encapsulation and Controlled Release. **The Royal Society of Chemistry, 86-98, 1993.**
119. MOSKOVITS, M., DEREWLANY, L., A Physical, Chemistry Experiment **J. Chem. Educ., 15, 45, 1976.**

120. IRINA, J., A Spectrophotometric Method for Measuring Diffusion Coefficients. **J. Chem. Educ.**, 57, 676, 1980.
121. KROOKS, J. E., Measurement of Diffusion Coefficients. **J. Chem. Ed.** 66, 614, 1989.
122. LOH, W; TONEGUTTI, C. A; VOLPE P. L. O; "Diffusion Coefficients of Aqueous Phenols Determined by the Taylor Dispersion Technique", **J. Chem. Faraday Trans.** 88, 2371, 1992.
123. CHAN, T. C; CHAN, M. L; "Diffusion of Pseudoplanar Solutes: An Investigation on the Effects Hydrogen Bonding", **J. Phys. Chem.** 99, 5765, 1995.
124. CASTILLO, R. C.; DOMINGUEZ, H. C.; "Determination of Mutual Diffusion Coefficients in Water-Rich 2-Butoxyethanol/Water Mixtures Using the Taylor Dispersion Technique", **J. Phys. Chem.** 94, 8731, 1990.
125. VECCHIA R. D.; "Síntese de Ésteres Alifáticos Catalisada pela *C.V. lipase* Imobilizada em Microemulsão Água-Óleo em Sistema de Gel", **Dissertação de Tese de Mestrado - UFSC, 1994.**
126. JESUS, P.C.; JOÃO, J. J.; BURLIN, G.; SILVA, P.L.F.; NASCIMENTO, M.G.; "Organo-Gel: Um Novo Sistema para a Imobilização de Lipases e sua Aplicação em Síntese Orgânica", **Química Nova**, 20, 664, 1997.

127. PENHA, F, G.; “Cinética de Adsorção do Etilxantato de Potássio Sobre Pirlita”, **Dissertação de mestrado**, UFSC, Florianópolis, SC, **1997**
128. LAANE, C.; BEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C.; “Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents”, **Biotechnol. and Bioeng.**, 30, 81, **1987**.
129. TAWAKI, S.; KLIBANOV, A. M.; “Inversion of Enzyme Enantioselectivity Mediated by the Solvent”, **J. Am. Chem. Soc.** 114, 1882, **1992**
130. FITZPATRICK, P. A.; KLIBANOV, A. M.; “How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity”, **J. Am. Chem. Soc.** 113, 3136, **1991**.
131. CATONI, E.; CERNIA, E.; PALOCCI, C.; “Different Aspects of Solvent Engineering in Lipase Biocatalysed Esterification”, **J. Molecular Catalysis B: Chemical**, 105, 79, **1996**.
132. TORRES, C.; OTERO, C.; “Influence of the Organic Solvents on the Activity in Water and the Conformation of *Candida rugosa* Lipase-Activating Pretreatment”, **Enzyme Microb. Technol.** 19, 594, **1996**.
133. BELL, G.; HALLING, P. J.; MOORE, B. D.; PATRIDGE, J.; REES, G.; “Biocatalyst Behaviour in Water Systems”, **Elsevier Science**, 13, 468, **1995**.

134. SVENSSON, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B.; “Effects of Water Activity on Reaction Rates and Equilibrium Positions in Enzymatic Esterifications”, **Biotechnol. and Bioengineering**, 44, 549, 1994.
135. VOGEL, A. **Textbook of practical chemistry**. Fourth edition, Longman Inc., New York, EUA, 1978.
136. **Handbook of Chemistry and Physics**, 60th Edition, 1979-1980.
137. QUEIRÓZ, N.; NASCIMENTO, M. G.; “Organo-Gel de Heptano: Diagrama de Fases e Aplicações Sintéticas”, **Química Nova**, Aceito para publicação, 1999.

ANEXOS

Produção Acadêmica nos Anos 1995 -1998

a) Artigos e Anais

JOÃO, J.J.; JESUS, P.C.; NASCIMENTO, M.G.; Diffusion Coefficient Measurements of Alkyl Benzoates in Organo-Gels, *14ª Conferência Internacional de Físico-Química Orgânica da IUPAC*, Florianópolis, SC, Agosto de 1998.

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G.; Lipases Imobilizadas em Organo-Gel e Sua Aplicação em Síntese Orgânica, *Anais do IIº Seminário Internacional de Tecnologia Enzimática*, vol. 2, 1995.

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; BURLIN, G.; SILVA, P.L.F.; NASCIMENTO, M.G.; Organo-Gel: Um Novo Sistema para a Imobilização de Lipases e sua Aplicação em Síntese Orgânica, *Química Nova*, 20(6), 664, 1997.

JESUS, P.C.; SILVA, P.L.F.; JOÃO, J.J.; NASCIMENTO, M.G.; Enantioselective Esterification of 2-Methylpentanoic Acid Catalysed via Immobilized Lipases in Chrysotile and Microemulsion-Based Gels, *Synthetic Communication*, vol 28 (15), 1998.

b) Comunicação em Congressos

JOÃO, J. J.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Reações de transesterificação catalisadas por lipases imobilizadas em organo-gel. *18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Caxambu, MG, 30/05 a 02/06 de 1995.

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G.; Lipases Imobilizadas em Organo-Gel e Sua Aplicação em Síntese Orgânica, *IIº Seminário Internacional de Tecnologia Enzimática*, Rio de Janeiro, RJ, 25 a 27/10 de 1995.

NASCIMENTO, M.G.; JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; BURLIN, G.; SILVA, P.L.F.; Aplicação de Lipases Imobilizadas em Organo-Gel, *XXII Congresso Latino-Americano de Química (FLAQ)*, Concepcion, Chile, 7 a 12/01 de 1996.

BURLIN, G.; JESUS, P. C.; JOÃO, J. J.; NASCIMENTO, M. G.; Síntese de Diésteres com Lipases Imobilizadas em Gel de Ágar, *19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, 27 a 30/05 de 1996.

JESUS, P. C.; SILVA, P.F.L.; CHIES, A.; JOÃO, J. J.; NASCIMENTO, M. G.; Estudo da Adsorção da Lipase de *Candida Cilindracea* em Crisotila, *20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, 24 a 27/05 de 1997.

JOÃO, J. J.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Reações de Transesterificação Enantiosseletivas com Lipases Imobilizadas em Organo-Gel, *20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, 24 a 27/05 de 1997.

JESUS, P. C.; SILVA, P.F.L.; CHIES, A.; JOÃO, J. J.; NASCIMENTO, M. G.; Estudo da Adsorção da Lipase de *Candida Cilindracea* em Crisotila, *Vº Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química da Região Sul – SBQ sul*, Porto Alegre, RS, 16 a 17 de novembro de 1997.

JOÃO, J. J.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Reações de Transesterificação Enantiosseletivas com Lipases Imobilizadas em Organo-Gel, *Vº Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química da Região Sul – SBQ sul*, Porto Alegre, RS, realizada de 16 a 17 de novembro de 1997.

JOÃO, J. J.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Dependência da atividade enzimática em reações de transesterificação com lipases imobilizadas em organo-gel, *21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, 25 a 28/05 de 1998.

JOÃO, J.J.; JESUS, P.C.; NASCIMENTO, M.G.; Diffusion Coefficient Measurements of Alkyl Benzoates in Organo-Gels, *14ª Conferência Internacional de Físico-Química Orgânica da IUPAC*, Florianópolis, SC, Agosto de 1998.

JOÃO, J. J.; ALVES, E.; NASCIMENTO, M. G.; Síntese de ésteres alifáticos catalisada pela lipase lipozyme IM em solvente orgânico, **VI^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química da Região Sul – SBQ sul**, Maringá, PR, 04 a 06 de novembro de 1998.

JOÃO, J. J.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Medidas de coeficiente de difusão de ésteres em organo-gel, **VI^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química da Região Sul – SBQ sul**, Maringá, PR, 04 a 06 de novembro de 1998.

JOÃO, J. J.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; “Efeito da Temperatura na Reação de Transesterificação do Laurato de p-nitrofenila com Álcoois Secundários Racêmicos Catalisada pela C.V. lipase Imobilizada em Organo-gel”. **22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 1999.

JOÃO, J. J.; SOUSA, C. S.; NASCIMENTO, M. G.; “Atividades de Diferentes Lipases Imobilizadas em Organo-gel em Reações de Transesterificação”. **22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 1999.

JOÃO, J. J.; SOUSA, C. S.; NASCIMENTO, M. G.; “Avaliação do Efeito do Solvente na Reação de Diesterificação do Ácido Adípico com o Butanol Catalisada pela Lipozyme IM Imobilizada em uma Resina Fenólica”. **22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 1999.

JESUS, P. C.; JOÃO, J. J.; NASCIMENTO, M. G.; “Estudo Cinético da Adsorção da Lipase de *Candida cylindracea* em Crisoltila”. **22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 1999.