



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS- CFM**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**DISCIPLINA: ESTÁGIO SUPERVISIONADO**

**Síntese de Ésteres Catalisada por Lipase de  
*Pseudomonas sp.* Imobilizada em Filmes de  
Caseinato de Sódio/glicerol**

**ALUNO: DAMIANNI SEBRÃO**  
**ORIENTADORA: MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO**  
**CO-ORIENTADOR: MARCELO ALVES MOREIRA**

**FLORIANÓPOLIS, JULHO DE 2003.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a vida, e com ela a oportunidade de errar, acertar, errar novamente, quantas vezes forem necessárias para formar o meu caráter, e assim poder evoluir sempre.

À minha esposa Gisele pela compreensão, carinho e amor em todos momentos, e ao nosso filho Alexandre Jr. pelas risadas, “estorinhas” para dormir, e mamadeiras às 3 horas da manhã.

A toda minha família pelo amor e apoio que deles recebi. Em especial ao meu pai Gilberto e minha mãe Graça pela acolhida desde o momento nascimento, e ao Giba, Ricardo e Graciane por serem meus melhores irmãos.

À minha vó Rosa por tudo que ela representa para mim.

Especialmente, à professora Maria da Graça Nascimento por sua orientação, amizade, dedicação e por ter me acolhido carinhosamente no Laboratório de Biocatálise.

Aos colegas de laboratório Sandra, Neide, Juliana, Silvia, Marcelo, Rogério, Thiago, Roberto, Giselle, Patrícia e Karina pelo companheirismo e ajuda, não só na realização deste trabalho como na minha formação acadêmica.

A todos amigos conquistados durante toda a graduação, pelo companheirismo e amizade.

Aos professor Valdir Soldi e ao Doutor Pedro Barreto pela doação do caseinato de sódio.

À Central de Análises pelos serviços prestados.

À PRAC-UFSC pela bolsa de treinamento a mim cedida durante a realização do curso.

A todos professores de Química da UFSC pela “bagagem intelectual” que com eles adquiri durante a realização deste curso.

Enfim, a todas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

## ÍNDICE GERAL

<b>Índice de tabelas e equações</b>	iv
<b>Índice de figuras e esquemas</b>	v
<b>Lista de abreviaturas e símbolos</b>	vi
<b>Resumo</b>	iv
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 – Enzimas	1
1.2 – Vantagens de utilização de enzimas como catalisadores em síntese orgânica	3
1.3 – Classificação das enzimas	5
1.4 – Lipases e aplicações	6
1.5 – Imobilização de enzimas	11
1.6 – Caseinato de sódio	12
1.6.1 – Micelas de caseína	14
<b>2 – OBJETIVOS</b>	16
2.1 – Objetivo Geral	16
2.2 – Objetivos Específicos	16
<b>3 – PARTE EXPERIMENTAL</b>	17
3.1 – Reagentes, enzimas e solventes utilizados	17
3.2 – Métodos experimentais	18
3.2.1 – Preparação dos filmes de caseinato de sódio	18
3.2.2 – Preparação do meio reacional	19

<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	20
<b>4.1 – Esterificação de Ácidos Carboxílicos Saturados e Insaturados com Álcoois Alifáticos</b>	23
<b>4.2 – Efeito do tempo na esterificação dos ácidos oleico, láurico e linoleico com n-propanol</b>	27
<b>4.3 – Efeito da variação da quantidade de lipase PS na obtenção de ésteres derivados dos ácidos oleico e láurico</b>	29
<b>4.4 – Estudo da reutilização do sistema PSL/CS na esterificação do ácido oleico com diversos álcoois</b>	30
<b>4.5 – Estudos preliminares do efeito da imobilização simultânea das lipases PSL e F na esterificação do ácido oleico com n-pentanol</b>	31
<b>4.6 – Identificação dos produtos</b>	32
<b>5 – CONCLUSÃO</b>	35
<b>6 – PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	36
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	37

## ÍNDICE DE TABELAS E EQUAÇÕES

<b>TABELA 1</b>	Dados de conversão (%) e excesso enantiométrico (%) para a hidrólise e aminólise do DEHG e do DMHG, catalisadas por lipase de <i>Candida antarctica</i>	4
<b>TABELA 2</b>	Classificação das enzimas segundo a IUBMB	5
<b>TABELA 3</b>	Parâmetros cinéticos para a obtenção do acetato de isoamila catalisada pela lipase de <i>Pseudomonas pseudomallei</i> 12Sm livre e imobilizada em PVA	8
<b>TABELA 4</b>	Dados de conversão (%) e excessos enantiométricos (%) para as reações de transesterificação do 3-hidroxi-3-(2-tienil) propanonitrila e hidrólise do 3-acetóxi-3-(2-tienil) propanonitrila, catalisadas pela lipase PS-D	9
<b>TABELA 5</b>	Principais características físico-químicas das caseínas do leite de vaca	13
<b>TABELA 6</b>	Reutilizações do sistema filme PSL/CS em reações de esterificação do ácido oleico	30
<b>TABELA 7</b>	Valores de conversão (%) para a reação de esterificação <sup>a</sup> do ácido oleico com n-propanol, utilizando as enzimas imobilizadas simultânea e separadamente	31

## EQUAÇÕES

<b>EQUAÇÃO 1</b>	Hidrólise e aminólise enantioseletivas do DEHG e DMHG, catalisadas pela CALB	4
<b>EQUAÇÃO 2</b>	Síntese do acetato de isoamila por reação de transesterificação do acenato de vinila	7
<b>EQUAÇÃO 3</b>	Esterificação de ácidos alifáticos com diferentes lipases	10
<b>EQUAÇÃO 4</b>	Reação de esterificação catalisada pela lipase de <i>Pseudomonas sp.</i> Imobilizada em caseinato de sódio/glicerol	20

**ÍNDICE DE FIGURAS E ESQUEMAS**

<b>FIGURA 1</b>	Estruturas primária e secundária da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	1
<b>FIGURA 2</b>	Estrutura tridimensional do sítio ativo da $\alpha$ -quimiotripsina, com um substrato inserido	2
<b>FIGURA 3</b>	Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	6
<b>FIGURA 4</b>	Duloxetina	8
<b>FIGURA 5</b>	Principais métodos de imobilização de enzimas	11
<b>FIGURA 6</b>	Modelo sugeridos para as micelas de $\alpha$ e $\beta$ - caseína	15
<b>FIGURA 7</b>	Preparação dos filmes de CS e imobilização da PSL	18
<b>FIGURA 8</b>	Preparação do meio reacional e análise dos produtos	19
<b>FIGURA 9</b>	Mecanismo proposto para hidrólise (ou esterificação) de éster catalisada por lipases	21
<b>FIGURA 10</b>	Região do espectro de RMN <sup>1</sup> H dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metínicos utilizados para os cálculos de rendimentos	22
<b>FIGURA 11</b>	Variação na conversão (%) em função do n <sup>o</sup> de carbonos da cadeia alquílica do álcool	23
<b>FIGURA 12</b>	Variação na conversão (%) em alcenoatos de n-propila em função do n <sup>o</sup> de carbonos da cadeia alquílica do ácido	24
<b>FIGURA 13</b>	Variação na conversão em alcenoatos de n-propilas para os ácidos 4-pentenóico, 2-octenóico e oleico	25
<b>FIGURA 14</b>	Estrutura dos ácidos monoinsaturados oleico, 4-pentenóico e trans-2-octenóico	25
<b>FIGURA 15</b>	Influência da posição da dupla ligação na reação de esterificação dos ácidos com 2 insaturações	26
<b>FIGURA 16</b>	Estruturas dos ácidos com 2 insaturações, sórbico e linoleico	27

<b>FIGURA 17</b>	Efeito do tempo na esterificação catalisada pela lipase <i>Pseudomonas sp.</i> , dos ácidos oleico, láurico e linoleico com n-propanol	28
<b>FIGURA 18</b>	Influência da variação da quantidade de lipase de <i>Pseudomonas sp.</i> na conversão em oleatos e lauratos de n-propila	29

### ESQUEMA

<b>ESQUEMA 1</b>	Transesterificação e hidrólise do 3-hidroxi-3-(2-tienil) propanenitrila	9
------------------	---	---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\alpha$	= alfa
$\beta$	= beta
$\kappa$	= capa
$\mu$	= micro ( $10^{-6}$ )
$\gamma$	= gama
Asp	= ácido aspártico
ATP	= adenosina trifosfato
C	= carbono
$\text{Ca}^{2+}$	= íon cálcio
Cal	= lipase de <i>Candida antarctica</i>
CALB	= lipase B de <i>Candida Antarctica</i>
ccd	= cromatografia de camada delgada
$\text{CDCl}_3$	= clorofórmico deuterado
CS	= caseinato de sódio
DAG	= diacilglicerol
DEGH	= dietil-3-hidroxioglutarato
DMGH	= dimetil-3-hidroxioglutarato
DNA	= ácido desoxirribonucleico
E.C.3.1.1.3	= classificação das lipases
ee	= excesso enantiomérico
Et al.	= e colaboradores
Gli	= glicina
H	= hidrogênio
His	= histidina
IUBMB	= <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
IV	= infra-vermelho
$k_{\text{cat}}$	= eficiência catalítica
Kda	= $10^3$ dalton
$K_M$	= constante de Michaelis-Menten
log P	= logaritmo do coeficiente de partição
MAG	= monoacilglicerol



MEV	= microscopia de eletrônica de varredura
MHz	= mega Hertz ( $10^6$ Hertz)
N	= nitrogênio
O	= oxigênio
PEO	= poli(óxido de etileno)
pH	= potencial hidrogênio
pI	= ponto isoelétrico
p-NPP	= palmitato de p-nitrofenila
ppm	= partes por milhão
PS-D	= lipase de <i>Pseudomona sp.</i> imobilizada em Diatomita
PSL	= lipase de <i>Pseudomona sp.</i>
PVA	= álcool polivinílico
RMN <sup>1</sup> H	= ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	= ácido ribonucleico
Ser	= serina
<i>sp.</i>	= espécie não determinada
TMS	= tetra metilsilano
Tyr	= tirosina
V <sub>max</sub>	= velocidade máxima

## RESUMO

Nos últimos anos as lipases vêm sendo empregadas com sucesso em processos biocatalíticos. O uso destas como catalisadores em síntese orgânica pode ser dificultado pela possível desnaturação e perda da atividade catalítica em solventes orgânicos. Para minimizar estas condições adversas usam-se técnicas de imobilização em suportes poliméricos. Os filmes de caseinato de sódio (CS) podem ser utilizados como proteção às enzimas devido a sua boa estabilidade em vários solventes orgânicos. Neste trabalho utilizaram-se filmes de CS para imobilizar a lipase de *Pseudomonas sp.* (PSL, Amano) e lipase F (Amano). Estes sistemas foram usados como biocatalisadores em reações de esterificação em meio orgânico (hexano). Os parâmetros avaliados foram a influência do número de carbonos da cadeia alquílica dos reagentes (álcoois e ácidos), o efeito da concentração da enzima e do tempo de reação no grau de conversão em ésteres, a reutilização do sistema CS/PSL e a imobilização simultânea das lipases de *Pseudomonas sp* e F no mesmo suporte.

Utilizando o sistema PSL/CS, a maior conversão foi obtida quando o 1-propanol foi utilizado na esterificação do ácido oleico (97%), e foi observado conversões menores que 50% para álcoois com mais de cinco carbonos. Na esterificação dos ácidos alifáticos com n-propanol as conversões foram quantitativas a partir de três carbonos (~100%).

Foi verificado a influência da saturação na cadeia alquílica de ácidos carboxílicos. As maiores conversões, em éster, foram obtidas com os ácidos oleico e 4-pentenóico (~100%). Não houve a formação do produtos com os ácidos trans-2-octenóico e sórbico, evidenciando a importância dos efeitos estéreos. O efeito do tempo na esterificação dos ácidos oleico, laurico e linoleico com n-propanol foi estudado, e os resultados mostraram que após 12h o éster derivado do ácido linoleico foi obtido com conversão de 93%.

A influência da quantidade de PSL imobilizada nos filmes de caseinato de sódio, foi testada na obtenção dos ésteres derivados dos ácidos oleico e laúrico.

Os resultados mostraram que é possível obter os correspondentes ésteres com boa conversão utilizando apenas 10mg da PSL (>70%) .

Os filmes contendo a PSL foram reutilizados por nove vezes na esterificação do ácido oleico com diversos álcoois. Verificou-se que este sistema pode ser reutilizado e que as conversões em produto depende na natureza do álcool.

Estudos preliminares mostraram a viabilidade da imobilização simultânea de duas ou mais lipases no mesmo suporte.

# 1 – INTRODUÇÃO

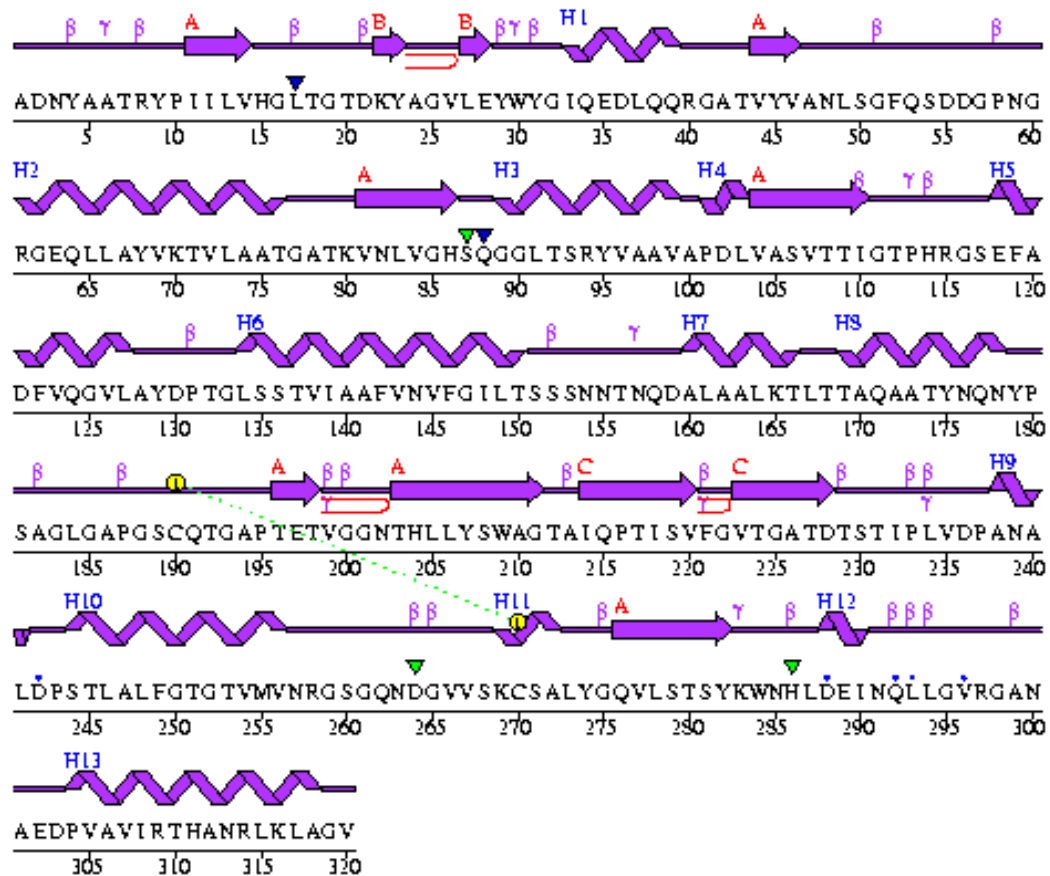
## 1.1 – Enzimas

Todas as reações que ocorrem nas células vivas são mediadas por catalisadores biológicos notáveis denominados enzimas.<sup>1</sup>

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas.<sup>2,3</sup>

As enzimas são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas, e a seqüência exata de aminoácidos da cadeia protéica é denominada estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é chamada de estrutura secundária e a disposição espacial destas estruturas é denominada estrutura terciária.<sup>4</sup>

A **Figura 1** descreve as estruturas primária e secundária da lipase de *Pseudomonas cepacia*.<sup>5</sup>

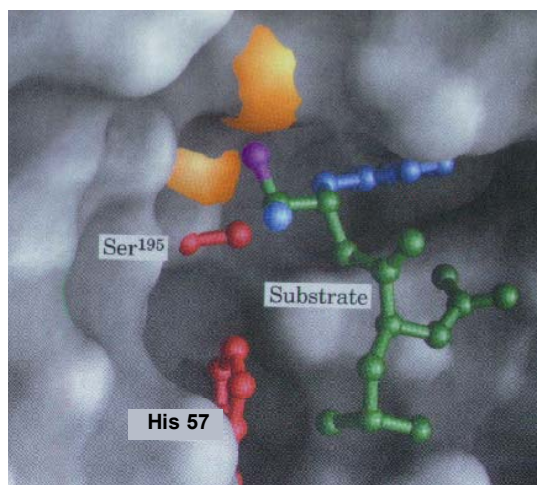


**Figura 1** – Estruturas primária e secundária da lipase de *Pseudomonas cepacia*.<sup>5</sup>

As letras maiúsculas observadas na **Figura 1** são referentes à seqüência de aminoácidos que compõem a estrutura primária da lipase, e a faixa roxa à estrutura secundária da mesma. Na mesma figura pode-se observar também os aminoácidos que fazem parte do sítio catalítico desta enzima destacados pelos triângulos verdes, e os da cavidade oxônio destacados pelos triângulos azuis.<sup>2,5</sup>

Os sítios ativos das enzimas constituem somente uma pequena proporção do volume total destas e estão usualmente próximos ou na superfície, e portanto devem estar acessíveis às moléculas de substratos. Estes contêm aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato, apresentando uma conformação e composição química determinante para a especificidade da catálise enzimática.<sup>2</sup>

A **Figura 2** mostra a estrutura tridimensional do sítio ativo da  $\alpha$ -quimiotripsina salientando os resíduos de aminoácido His 57e Ser 195, e um substrato inserido.<sup>2</sup>



**Figura 2** – Estrutura tridimensional do sítio ativo da  $\alpha$ -quimiotripsina, com um substrato inserido .<sup>2</sup>

## 1.2 – Vantagens da utilização de enzimas como catalisadores em síntese orgânica

As principais vantagens em utilizar enzimas como catalisadores, em síntese orgânica são:

✓ As velocidades das reações catalisadas por enzimas são maiores, por fatores de  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes do que as correspondentes não catalisadas. Para organismos vivos, aumentos de velocidade desta ordem de grandeza são importantes pois permitem a ocorrência de reações a velocidades razoáveis mesmo nas condições normais que existem nas células vivas (isto é, pH aproximadamente neutro e temperatura da ordem de  $35^\circ\text{C}$ ).<sup>1</sup>

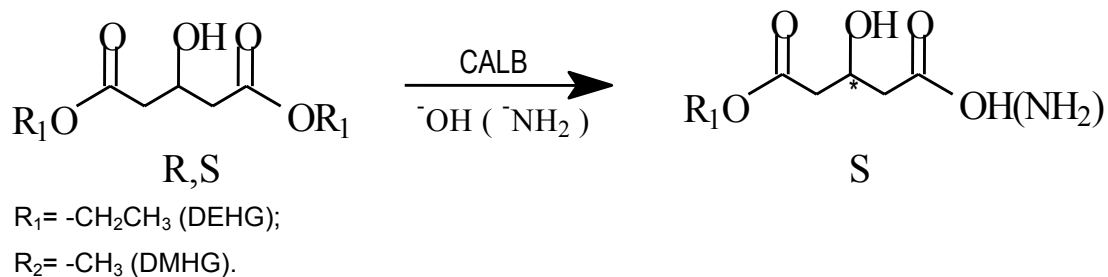
✓ As reações enzimáticas, ao contrário das catalisadas por catalisadores químicos, ocorrem em condições relativamente suaves: pressão atmosférica, temperaturas abaixo de  $100^\circ\text{C}$  e pH neutro.<sup>4</sup>

✓ As enzimas tem um alto grau de especificidade diante dos respectivos substratos, o que faz com que raramente se formem produtos laterais ou secundários.<sup>4</sup>

✓ São quirais e podem apresentar alta enantiosseletividade.<sup>6,7</sup>

A enantiosseletividade da lipase B de *Candida antarctica* (CALB, Novozyme 435) na hidrólise e aminólise do dietil-3-hidroxi-glutarato (DEGH) e do dimetil-3-hidroxi-glutarato (DMHG), foi objeto de estudo para Thorleif Anthonsen et al..<sup>7</sup>

**(Equação 1)**



**Equação 1** - Hidrólise e aminólise enantioseletivas do DEHG e DMHG, catalisadas pela CALB.

Os melhores resultados obtidos estão listados na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Dados de conversão (%) e excesso enantiomérico (%) para a hidrólise e aminólise do DEHG e do DMHG, catalisada por lipase de *Candida antarctica*.<sup>7</sup>

Configuração	Substrato	Hidrólise <sup>a</sup>		Aminólise <sup>b</sup>	
		Conversão (%)	ee <sup>c</sup> (%)	Conversão (%)	ee <sup>c</sup> (%)
S	DEHG	80	91	95	98
S	DMHG	70	90	95	98

<sup>a</sup>CALB (0.5 g), DEHG (14.7 mmol) ou DMHG (55.67 mmol) em 20 mL tampão fosfato pH 7.0, 12 min; <sup>b</sup>CALB (20 mg), DEHG (1.96 mmol) ou DMHG (2.3 mmol), em NH<sub>3</sub> borbulhado em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30°C, por uma noite; <sup>c</sup>Determinado por Cromatografia Gasosa (Cromatógrafo Varian 3800, coluna quiral CP-Chirasil-DEX G-TA da Chrompack).

### 1.3 – Classificação das enzimas

Muitas enzimas podem ser nomeadas pela adição do sufixo “ase” ao nome do substrato ou da reação que está sendo catalisada. Por exemplo, a urease catalisa a hidrólise da uréia, e a DNA polimerase catalisa a polimerização de nucleotídeos para formar o DNA. Para outras enzimas, como a pepsina e a tripsina, seus nomes não têm relação alguma com os substratos ou reações que catalisam. A *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) classifica as enzimas em seis classes, com suas subclasses e de acordo com o tipo de reações que catalisam. **(Tabela 2)**<sup>2</sup>

**Tabela 1.** Classificação das enzimas segundo a IUBMB.<sup>2</sup>

<b>Classes</b>	<b>Tipos de reações catalisadas</b>
1. Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons híbridos ou átomos de H).
2. Transferases	Reações que envolvem transferência de pequenos grupos (CO, CN).
3. Hidrolases	Reações de hidrólise de ésteres e de amidas, e transesterificação.
4. Liases	Adição de grupos a duplas ligações, ou formação de duplas ligações por remoção de grupos.
5. Isomerases	Transferência de grupos dentro das moléculas, produzindo formas isoméricas.
6. Ligases	Formação de ligações C-O, C-S, C-N e C-C por reações de condensação acoplada a clivagem de ATP

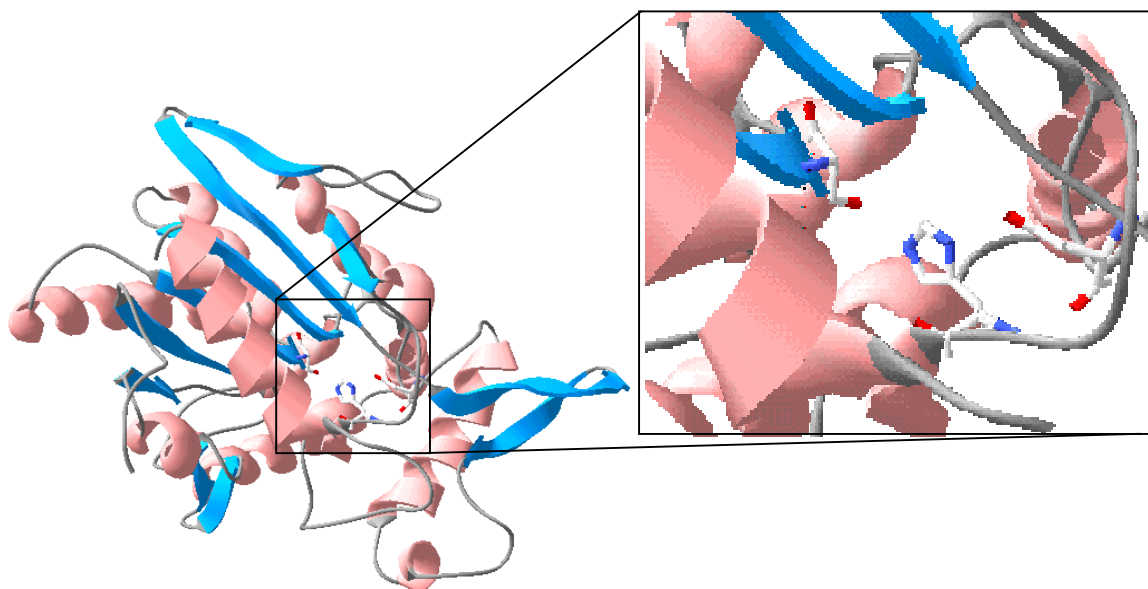


## 1.4 – Lipases e Aplicações

As lipases verdadeiras (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são hidrolases que, em seu ambiente natural catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Essas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Essa definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolizam outros lipídeos (acilidrolases, colesteroesterase, tioesterases e outras).<sup>8</sup>

As lipases encontram-se largamente distribuídas na natureza em animais, vegetais e microorganismos (fungos e bactérias). Apresentam peso molecular entre 40-50 Kda com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. São glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo a sua extração, isolamento e purificação.<sup>8</sup>

Na **Figura 3** pode-se observar a estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas cepacia* com a ampliação do seu sítio ativo, composto dos resíduos de aminoácido Ser 87, His 286 e Asp 264.<sup>5</sup>



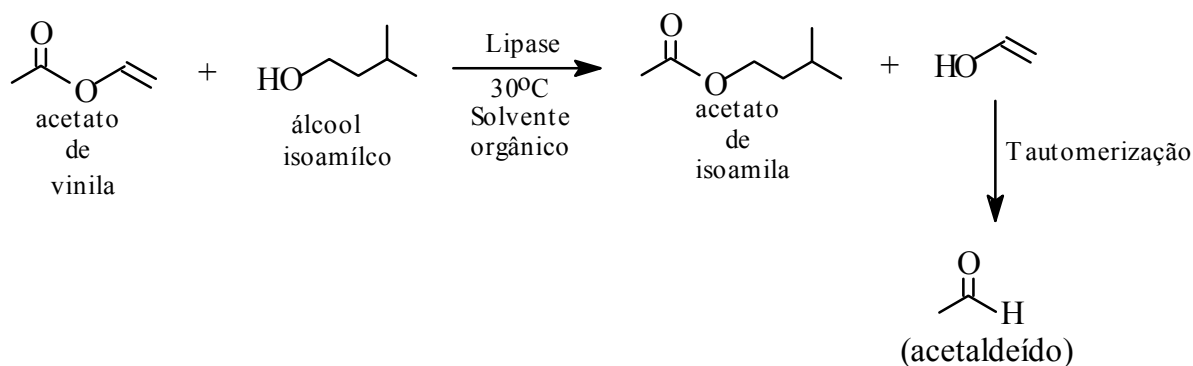
**Figura 3** - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas cepacia*.<sup>5</sup>

Como vantagens na sua utilização pode-se citar o baixo custo, a sua versatilidade catalítica, o fato de não requererem cofatores, serem estereosseletivas e atuarem em faixas de pH bastante amplas.<sup>9</sup>

Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificações, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos, entre outras.<sup>10</sup>

Nos últimos anos tem sido realizados vários estudos visando a utilização de lipases em meio orgânico, visto que muitos dos substratos empregados em síntese são insolúveis em água.<sup>11,12,13</sup>

Pranab Goswami et al.<sup>14</sup> produziram e isolaram uma lipase de *Pseudomonas pseudomallei* 12Sm, cultivando esta bactéria em n-hexadecano. A lipase manteve-se estável em pH alcalino e a atividade ótima foi observada em pH 10. Após a imobilização desta em álcool polivinílico (PVA), efetuou-se a síntese do acetato de isoamila (**Equação 2**) por reação de transesterificação do acetato de vinila (100 mmol) com álcool isoamílico (100 mmol), durante 12 horas, a 30°C. A estabilidade em solvente orgânico foi muito maior do que a da lipase nativa, particularmente com solventes com log P entre 0.23 (acetato de etila) e 0.85 (éter etílico).



**Equação 2** – Síntese do acetato de isoamila via transesterificação do acetato de vinila com álcool isoamílico.<sup>14</sup>

Parâmetros cinéticos tais como a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), velocidade máxima ( $v_{max}$ ), eficiência catalítica ( $k_{cat}$ ) e coeficiente de especificidade ( $k_{cat}/K_m$ ) foram determinados e comparados com os da enzima livre (**Tabela 3**).

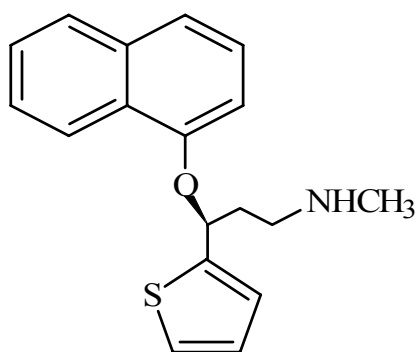
**Tabela 3** - Parâmetros cinéticos para a obtenção do acetato de isoamila catalisada pela lipase de *Pseudomonas pseudomallei* 12Sm livre e imobilizada em PVA. <sup>14</sup>

Parâmetros Cinéticos	Lipase livre	Lipase imobilizada
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$178 \pm 12$	$555 \pm 18$
$v_{max}$ (U/mg)	$172 \pm 8$	$72 \pm 5$
$K_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$409 \pm 10$	$347 \pm 18$
$K_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ )	2.3	0.62

As lipases têm um enorme potencial em processos químicos como catalisadores em vários ramos da indústria e da medicina. <sup>15</sup>

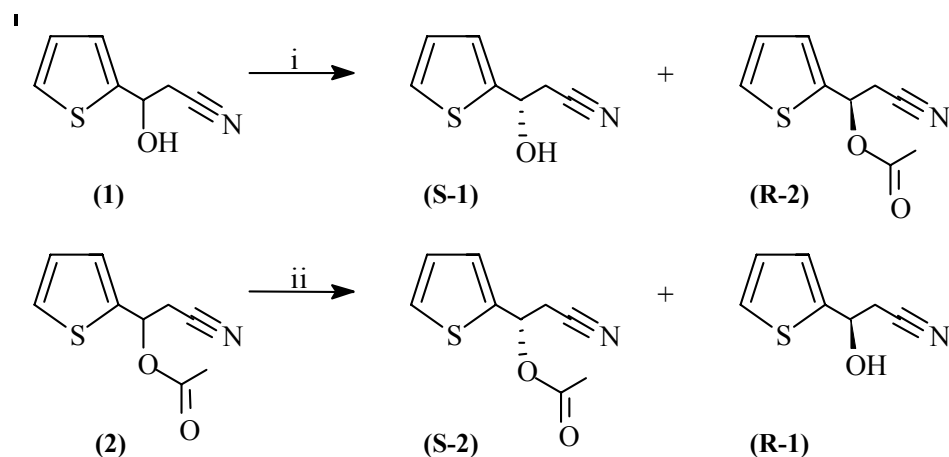
Recentemente Ahmed Kamal et al. <sup>16</sup> estudaram a resolução enzimática do 3-hidroxi-3-(2-tienil)propanonitrila (**1**) com várias lipases.

Este composto enantiomericamente puro, serve como precursor na síntese da duloxetina, um agente antidepressivo extremamente eficiente no tratamento de distúrbios psiquiátricos. (**Figura 4**)



**Figura 4** - Duloxetina

A lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em diatomita (PS-D), foi usada na transesterificação do 3-hidroxi-3-(2-tienil)propanonitrila com acetato de vinila, em éter diisopropílico, ou na hidrólise do 3-acetóxi-3-(2-tienil)propanonitrila em solução tampão de fosfato (pH 7.2).<sup>16</sup> (**Esquema 1**)



**Esquema 1** - Transesterificação e hidrólise do 3-hidroxi-3-(2-tienil)propanonitrila. (i) transesterificação [ lipase PS-D e acetato de vinila, em éter diisopropílico, 14horas ]; (ii) hidrólise [ lipase PS-D e tampão fosfato, 14 h.]

Os melhores resultados estão listados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Dados de conversão (%) e excessos enantioméricos (%) para as reações de transesterificação<sup>a</sup> do 3-hidroxi-3-(2-tienil)propanonitrila e hidrólise<sup>b</sup> do 3-acetóxi-3-(2-tienil)propanonitrila, catalisadas pela lipase PS-D.

Transesterificação <sup>a</sup>				Hidrólise <sup>b</sup>			
Álcool(S-1)		Acetato(R-2)		Álcool(S-2)		Acetato(R-1)	
Conversão	ee <sup>c</sup>	Conversão	ee <sup>c</sup>	Conversão	ee <sup>c</sup>	Conversão	ee <sup>c</sup>
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
42	>99	43	>99	41	>99	40	>99

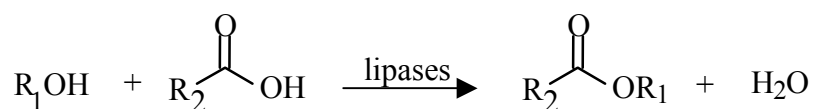
<sup>a</sup> Com acetato de vinila, em éter diisopropílico, 14h.; <sup>b</sup> Em tampão fosfato, 14h.; <sup>c</sup> Determinado por HPLC quiral (OJ-H coluna quiral; Diacel); hexano-isopropanol (85:15) como fase móvel a 0.75mL/min e monitorado por UV (254nm).

Utilizando qualquer um dos enantiômeros obtidos, pode-se sintetizar através das rotas sintéticas propostas no trabalho de Kamal, o antidepressivo S-duloxetine ou o seu enantiômero R com bons rendimentos.<sup>16</sup>

Um outro exemplo da utilização de lipases está na produção de aromas naturais. Quando se faz uso de métodos biotecnológicos, particularmente os enzimáticos, esses aromas podem ser caracterizados como “naturais” ou “idênticos aos naturais”, sendo por este motivo preferidos pelo mercado consumidor.<sup>17</sup>

Macedo, G.A. et al.<sup>17</sup> testaram cinco lipases microbianas (de *Geotrichum sp. 72*, de *Alcaligenes sp.B*, de *Aspergillus sp.1068*, de *Aspergillus sp.1099* e de *Rhizopus sp.*), todas produzidas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA – UNICAMP, quanto a habilidade catalítica na síntese de ésteres formadores de aromas. **(Equação 3)**

As esterificações foram realizadas na ausência de solvente orgânico, e os resultados foram comparados com os obtidos usando uma lipase comercial (lipase de *Candida rugosa*). Obteve-se 88% de conversão na síntese de laurato de isoamila e 72% para o propionato de isoamila com a lipase de *Rhizopus sp.*, e 82% na conversão em acetato de isopropila com a lipase de *Alcaligenes sp.B*, após 24 horas de reação.



R<sub>1</sub> = -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;

R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>;

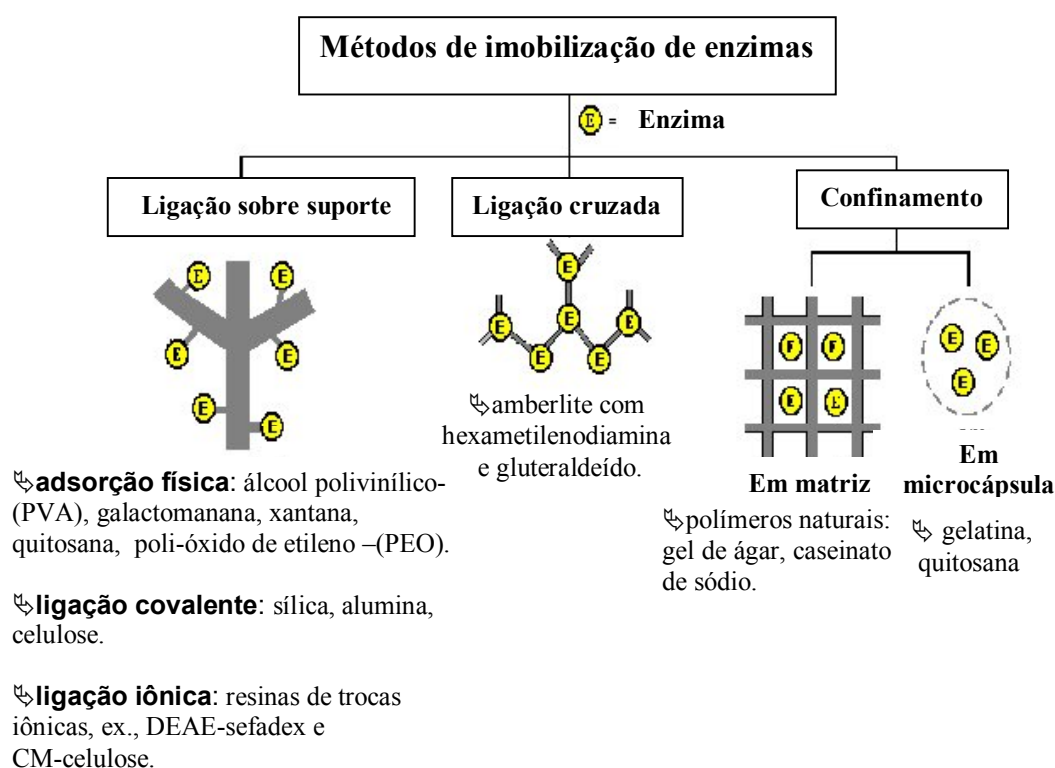
Lipases: de *Geotrichum sp. 72*, de *Alcaligenes sp.B*, de *Aspergillus sp.1068*, de *Aspergillus sp.1099* e de *Rhizopus sp.*.

**Equação 3** – Esterificação de ácidos alifáticos com diferentes lipases (0,02 mol ácido: 0,04 mol álcool, 1% de lipase, 24 horas, 40°C).<sup>17</sup>

## 1.6 – Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas é uma das importantes facetas da biotecnologia, e vários métodos vêm sendo desenvolvidos com este fim, tais como a absorção em materiais insolúveis, confinamento em géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligações cruzadas com o auxílio de reagentes bi ou multifuncionais, e ligações em suporte insolúvel.<sup>15,18</sup>

A **Figura 5** ilustra as principais técnicas de imobilização existentes.



**Figura 5** – Principais métodos de imobilização de enzimas (Adaptado da ref. 18).

Para muitas enzimas a imobilização confere uma estabilidade adicional frente a várias formas de desnaturação, além de fornecer uma maneira fácil de recuperá-las e reutilizá-las, sem perda considerável da atividade.<sup>18,19</sup>

R.V.S. Amorim et al.<sup>20</sup> estudaram o uso da quitosana proveniente de *Syncephalastrum racemosum*, um adubo herbívoro natural do nordeste brasileiro, como suporte para uma lipase comercial. Em nove cepas selecionadas, um elevado nível de quitosana (152 mg / g de micela seca, ou seja 15,2%) foi obtido do *Syncephalastrum racemosum*. Da quitosana obtida foi confeccionado um filme para imobilizar a lipase, usando glutaraldeído como agente bifuncional. A enzima imobilizada foi usada como catalisador da hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (p-NPP), e reteve 47% de sua atividade inicial após cinco reações, resultado este condizente com o obtido para a lipase imobilizada em filme de quitosana comercial (extraída dos crustáceos).

A seguir serão discutidas algumas das principais propriedades, e dos métodos de obtenção do caseinato de sódio, considerando que este biopolímero foi utilizado neste trabalho para imobilização de lipases.

## 1.7– Caseinato de Sódio

O caseinato de sódio é um sal derivado da caseína, que é a principal proteína existente no leite de vaca, cuja constituição é de aproximadamente 3,5% de proteínas, das quais 2,9% são caseínas e 0,6% são proteínas do soro. O leite é uma solução aquosa de proteínas, lactose, minerais e algumas vitaminas. A caseína é definida como a proteína que precipita quando o leite desnatado é acidificado a pH 4,6 e temperatura 20°C.<sup>21,22</sup>

Estudos baseados na mobilidade molecular, tais como cromatografia, eletroforese, filtração e centrifugação, demonstram a existência de quatro tipos de caseína: a caseína  $\alpha_{s1}$  (50% do total de caseínas), a caseína  $\beta$  (33%), a caseína  $\kappa$  (15%) e a caseína  $\gamma$  em quantidades variáveis. O “s” da caseína  $\alpha$  refere-se à sensibilidade de precipitação frente aos íons cálcio.<sup>21,22,23</sup>

Embora os prefixos  $\alpha_s$ ,  $\beta$ , etc., definam espécies específicas de proteínas, atualmente reconhece-se que existem uma variedade de tipos de caseínas (variantes genéticas), que possuem pelo menos um resíduo de aminoácido diferente na cadeia polipeptídica. Por exemplo, a caseína  $\alpha_{s1}C$  difere da caseína  $\alpha_{s1}B$  (a variante mais comum) apenas porque na posição 192 da cadeia polipeptídica têm o resíduo glicina ao invés do resíduo ácido glutâmico. Atualmente pode-se identificar espécies de vacas através de uma análise detalhada de uma amostra de leite, para se verificar as proporções destas variantes.<sup>21</sup>

A **Tabela 5** apresenta as principais características físico-químicas das caseínas do leite de vaca.

**Tabela 5** - Principais características físico-químicas das caseínas do leite de vaca.<sup>22</sup>

Caseína	% no Leite Desnatado	pl.*	Peso Molecular	Variantes Genéticos
$\alpha_{s1}$ ( $\alpha_{s0}$ , $\alpha_{s2}$ , $\alpha_{s3}$ , $\alpha_{s4}$ , $\alpha_{s5}$ )	45-55	4,1	23.613	A,B,C,D
$\beta$	25-35	4,5	24.000	A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub>
$\kappa$	8-15	4,1	19.000	A,B
$\gamma$	3-7	5,8	21.000	A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , B
$\gamma_1$			20.500	A <sub>1</sub> ou A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , B
$\gamma_2$			11.800	A <sub>1</sub> ou A <sub>2</sub> ou A <sub>3</sub> , B
$\gamma_3$			11.500	

\* pl = pH no ponto isoelétrico.

A caseína  $\alpha_{s1}$  é formada de 199 resíduos de aminoácidos. Contém um seguimento hidrofílico (resíduos 43-70) com elevada densidade de carga. Os seguimentos 1 a 42 e 98 a 199 apresentam caráter hidrofóbico. Esta proteína é rica em prolina, dificultando a formação de estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice. A caseína  $\alpha_{s1}$  tem uma forte tendência a interações hidrofóbicas, conferindo a esta um papel importante na formação das micelas de caseína.



As caseínas do grupo  $\beta$  apresentam o fenômeno de associação-dissociação cujo equilíbrio depende da concentração de proteína, da temperatura e de pH. Apresentam-se como monômeros à temperaturas abaixo de 8°C ou em elevados valores de pH. Formam polímeros na forma de rosário, à temperaturas elevadas e pHs quase neutros.

As caseínas  $\kappa$  não reagem com o cálcio, mas na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  reagem com as caseínas  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$  para formar micelas termodinamicamente estáveis. Nestas proteínas predominam os resíduos apolares na extremidade N-terminal (1-105) e, na extremidade C-terminal (106-169), predominam os resíduos polares.

As caseínas  $\gamma$  parecem resultar da hidrólise enzimática parcial das caseínas  $\beta$ , sendo altamente hidrofóbicas e se comportando de maneira muito semelhante à estas, em relação à dependência de pH e temperatura, no fenômeno de associação-dissociação.<sup>22</sup>

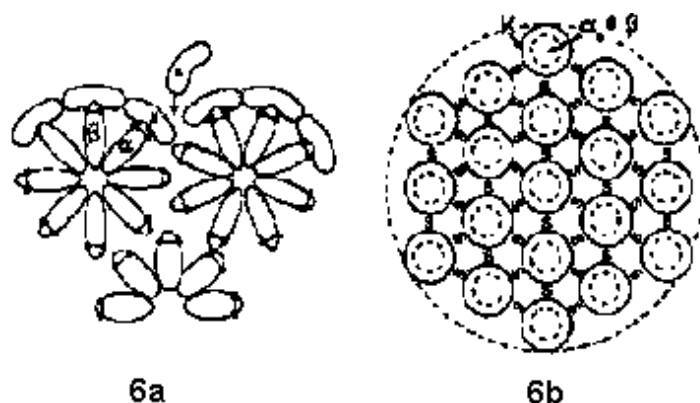
### 1.7.1 - Micelas de Caseína

Cerca de 80-90% de toda caseína do leite está na forma de partículas coloidais aproximadamente esféricas denominadas micelas, medindo de 50-200 nm de diâmetro, com massa molecular de  $10^7$ - $10^9$  daltons.<sup>22</sup>

O conhecimento das micelas de caseína é de grande importância, visto que muitos dos tratamentos em tecnologia do leite influenciam de alguma forma na estabilidade de suas micelas.<sup>23</sup>

Os modelos apresentados para as micelas são puramente hipotéticos, pois não se conhecem bem ainda as suas estruturas. Supõem-se que essas micelas têm a forma mais ou menos esférica, formada por um grande número de sub-unidades unidas entre elas. Estas sub-unidades medem de 10-20 nm de diâmetro e contém de 25-30 moléculas de caseína  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  em proporções similares àquelas apresentadas para o leite desnatado. **(Tabela 5)**<sup>21,22,23</sup>

Uma primeira teoria sugere que as sub-unidades de caseína  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$  formariam núcleos termodinamicamente estáveis em roseta cobertos por camadas periféricas de caseína  $\kappa$  (**Figura 6a**). A segunda apresenta uma estrutura aberta composta de sub-unidades de tamanho uniforme contendo as caseínas  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$  no centro e caseína  $\kappa$  na periferia (**Figura 6b**).<sup>22</sup>



**Figura 6** – Modelos sugeridos para as micelas de  $\alpha$  e  $\beta$  - caseína.<sup>22</sup>

Neste trabalho, e dando continuidade aos estudos que envolvem os métodos de imobilização de enzimas, utilizou-se o filme de caseinato de sódio/glicerol como suporte, conforme citado anteriormente.

Após a imobilização de lipases, o sistema enzima/suporte foi utilizado como biocatalisador em reações de esterificação de ácidos e álcoois alifáticos de cadeias curtas, médias e longas e em meio orgânico.

Deve-se mencionar que neste trabalho houve também a participação efetiva do doutorando Marcelo Alves Moreira.

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a orientação da professora Dra. Maria da Graça Nascimento, visando o cumprimento da disciplina QMC 5510 (Estágio Curricular), com duração de um semestre.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

Utilizar a lipase de *Pseudomonas sp.* (PSL) imobilizada em filmes de caseinato de sódio/glicerol (CS) como catalisador em sínteses de ésteres alquílicos, em meio orgânico.

### 2.2 – Objetivos específicos

Utilizando a lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada em filmes de caseinato de sódio/glicerol (PSL/CS), os principais objetivos específicos deste trabalho são:

1. Avaliar a influência da cadeia alquílica dos álcoois alifáticos na esterificação do ácido oleico;
2. Avaliar a influência da cadeia alquílica dos ácidos na reação com n-propanol;
3. Verificar o efeito da variação da quantidade de lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada na obtenção de ésteres derivados dos ácidos láurico e oleico;
4. Verificar o efeito do tempo na esterificação dos ácidos oleico, láurico e linoleico com o n-propanol.
5. Avaliar a possibilidade de reutilização do sistema PSL/CS na esterificação do ácido oleico com n-propanol, n-pentanol, n-hexanol e ciclohexanol.
6. Verificar a influência da imobilização simultânea da lipase de *Pseudomonas sp.* e da lipase F, na esterificação do ácido oleico com n-pentanol.
7. Quantificar e caracterizar os produtos por técnicas espectroscópicas de IV e RMN<sup>1</sup>H e por ccd.

### 3 – PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 – Reagentes, Enzimas e Solventes Utilizados

↳ Álcoois: - n-propanol (Nuclear);

- n-pentanol e n-dodecanol (Vetec);
- n-hexanol, n-decanol e n-octadecanol (Sigma);
- n-octanol (General Purpose Reagent);
- ciclo hexanol (Riedel-d-Haën AG).

↳ Ácidos: - oleico e láurico (Vetec);

- linoleico, sórbico, 4-pentenóico, esteárico, palmítico e mirístico (Sigma);
- 2-octenóico, decanóico, octanóico e hexanóico (Aldrich).

↳ Solventes: - n-hexano (Vetec);

- acetato de etila (Grupo Química);
- éter etílico (Dinâmica).

↳ Glicerol (Reagem).

↳ Caseinato de Sódio (Tatua CO-OP Dairy Ltda).

↳ Enzimas: Lipase de *Pseudomonas sp.* - PSL ( Amano, 30.000 u/g\*);

Lipase F (Amano 150.000 u/g).

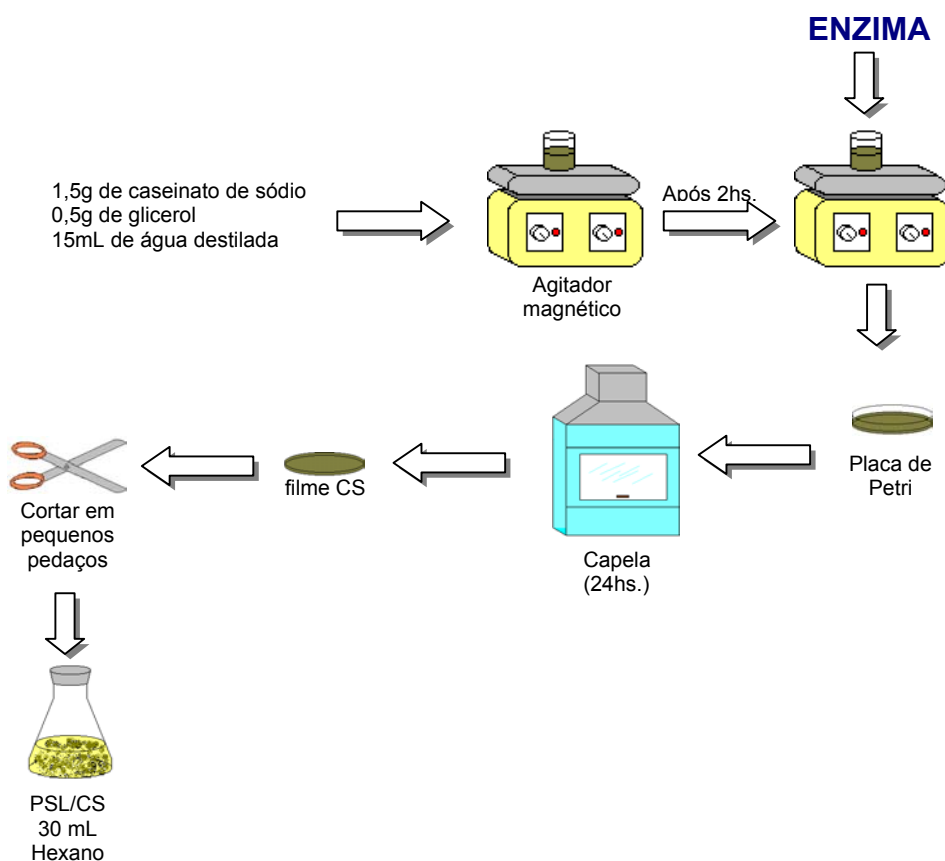
↳ Sílica gel (60 HF 254 da Merck).

\* u/g é uma unidade da atividade lipolítica da enzima, sendo definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de ácido graxo por um minuto. <sup>24</sup>

## 3.2 – Métodos Experimentais

### 3.2.1 - Preparação dos filmes de caseinato de sódio

Os filmes de caseinato de sódio foram preparados pesando-se 1,5 g deste sal e 0,5 g de glicerol, em um béquer de 50 mL. Adicionou-se 15 mL de água destilada e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 2 horas. A seguir adicionou-se quantidades variadas de enzima (5-50 mg). O sistema foi agitado por mais 10 min. A mistura foi transferida para uma placa de Petri e evaporado o solvente em estufa, assim obtendo os filmes com a enzima imobilizada. Estes então foram cortados em pedaços de mesmo tamanho e transferidos para um erlenmeyer. (Figura 7)



**Figura 7** – Preparação dos filmes de CS e imobilização da PSL.

### 3.2.2 - Preparação do meio reacional

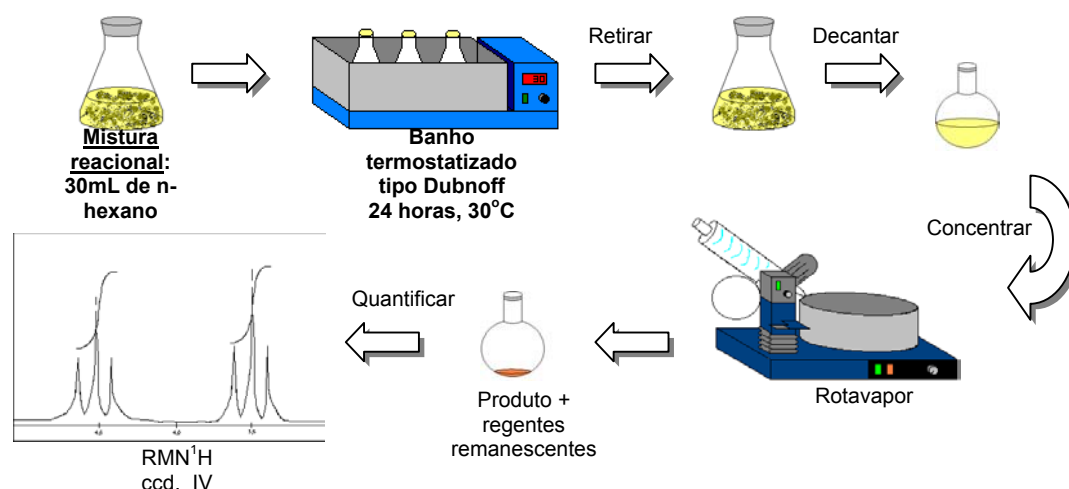
Aos erlenmeyers contendo a enzima imobilizada foram adicionados os substratos (5 mmol do ácido e 5 mmol do álcool). Deixou-se então a mistura reacional, na temperatura de 30°C, agitando por 24 horas (exceto quando foram realizados os estudos de tempo de reação) em agitador termostatzado do tipo Dubnoff.

A formação dos ésteres foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd) utilizando como eluente n-hexano:acetato de etila (9:1).

Após o tempo estipulado para cada reação, a mistura reacional foi decantada, e o filme foi lavado com 20 mL de n-hexano por 24 horas, quantas vezes fossem necessárias, até que todos reagentes e produtos fossem retirados do filme. Cessadas as lavagens o solvente foi evaporado no rota- evaporador e o grau de conversão em produto foi obtido por análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H), por comparação da área do pico referente ao álcool (~ 3,5 ppm) com a do referente ao éster (~ 4,1 ppm). **(Figura 8)**

Os espectros de RMN<sup>1</sup>H foram obtidos em um espectrômetro BRUKER AC 200 MHz, usando tetrametil silano (TMS) como referência interna.

Alguns ésteres foram identificados pela análise de Espectroscopia de Infra-Vermelho (IV) em um espectrofotômetro PERKIN ELMER FTIR 16PC.

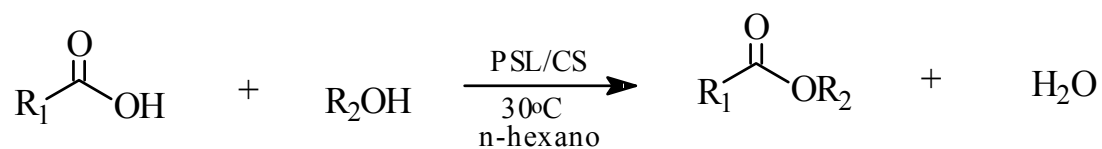


**Figura 8** – Preparação do meio reacional e análise dos produtos.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho visa essencialmente a otimização da reutilização do sistema lipase de *Pseudomonas sp.* (PSL) imobilizada em filmes de caseinato de sódio/glicerol (CS) na biocatálise de reações de esterificação para uma variedade de ácidos carboxílicos e álcoois alifáticos.

A **Equação 4** representa a reação de esterificação catalisada por PSL/CS utilizada neste trabalho.

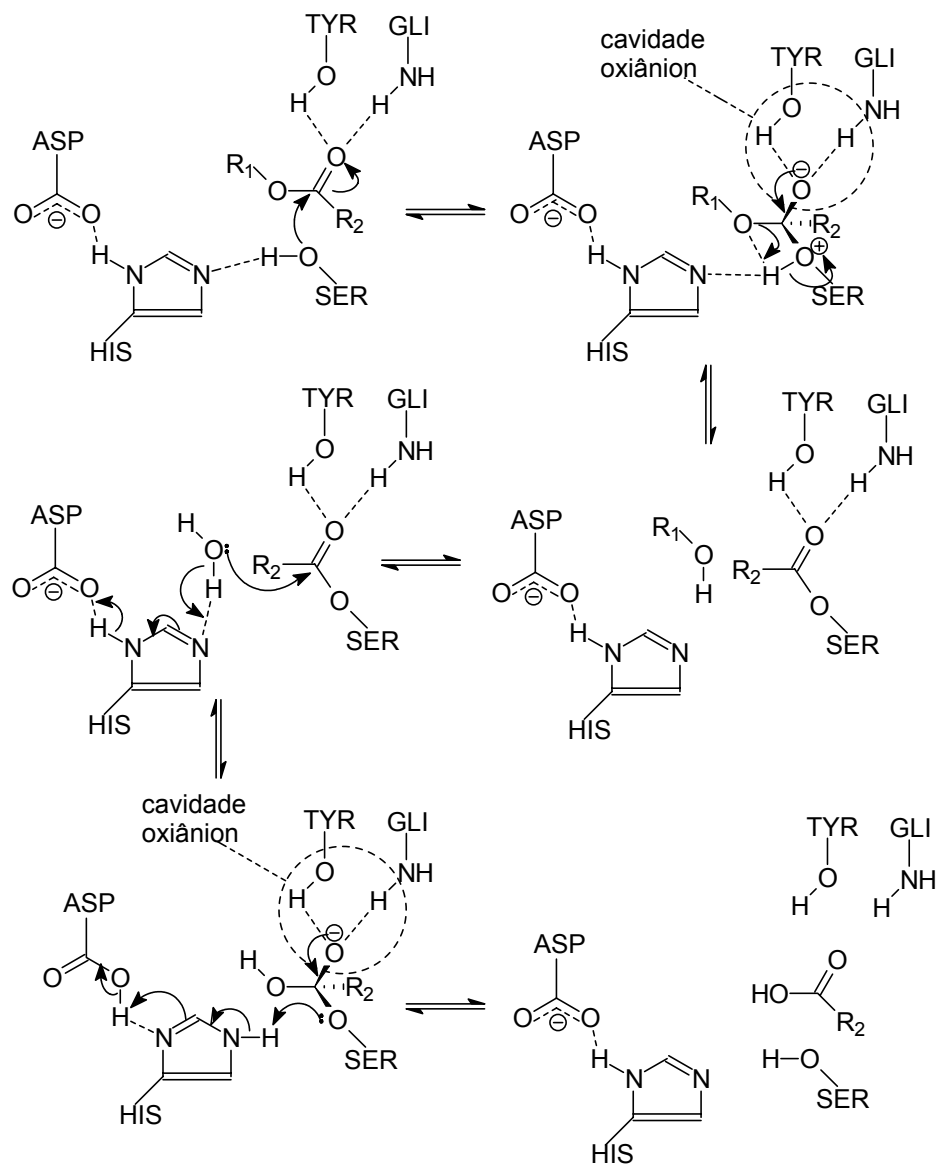


R<sub>1</sub> = -H; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>;  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>; -CH=CHCH=CHCH<sub>3</sub>; -CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>;  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>.

R<sub>2</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>;  
 -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>; ciclo -C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>

**Equação 4** – Reação de esterificação catalisada pela lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada em filmes de caseinato de sódio/glicerol.

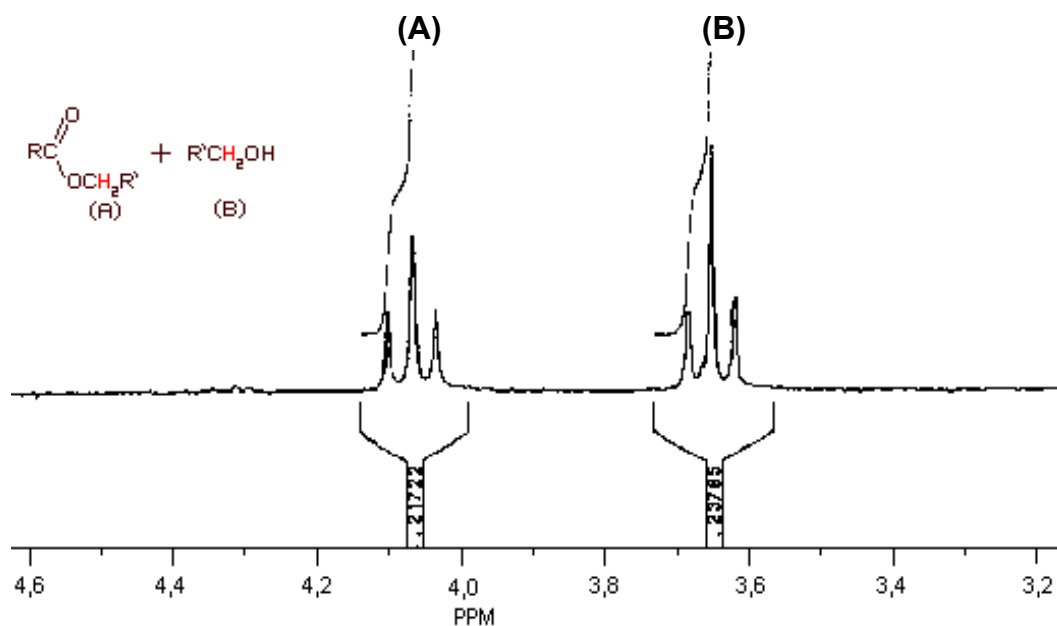
O mecanismo da reação de hidrólise (ou de formação) da ligação éster, catalisada pela lipase de *Pseudomonas sp.* está mostrado na **Figura 9**.<sup>25</sup>



**Figura 9** – Mecanismo proposto para hidrólise (ou esterificação) de éster catalisada por lipases.<sup>25</sup>



Os rendimentos dos produtos obtidos, foram quantificados pelos espectros de RMN<sup>1</sup>H. Estes foram estimados pela comparação do triplete metilênico do éster formado (R-COO-CH<sub>2</sub>-R', centrado em ~ 4,1 ppm) com a integração do triplete metilênico do álcool correspondente (HO-CH<sub>2</sub>-R', centrado em ~ 3,5 ppm). (**Figura 10**)

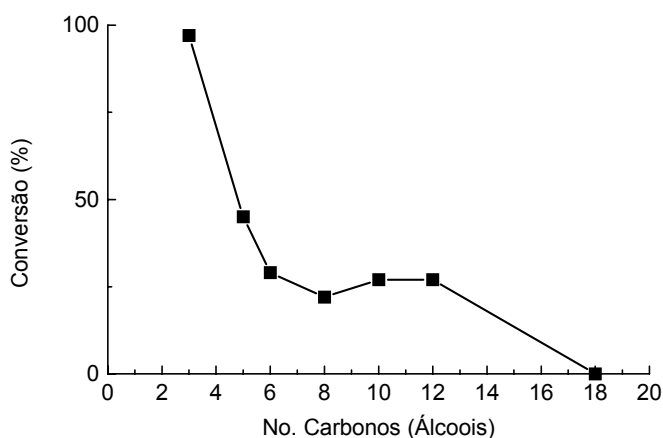


**Figura 10** – Região do espectro de RMN-<sup>1</sup>H dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metínicos utilizados para os cálculos de rendimentos.

Através do espectro apresentado na **Figura 10**, pôde-se calcular o rendimento para a reação de esterificação do ácido oleico com n-pentanol, catalisada pela lipase PSL imobilizada em filmes de CS, à 30°C, em n-hexano, com 24 horas de reação, que foi de 48%.

#### 4.1 – Esterificação de Ácidos Carboxílicos Saturados e Insaturados com Álcoois Alifáticos

Primeiramente, efetuaram-se estudos da esterificação do ácido oleico (5mmol), que contém 18 carbonos e uma insaturação na posição 9-cis, com diversos álcoois primários (5mmol). A **Figura 11** mostra a variação da porcentagem de conversão em função do número de carbonos da cadeia alquílica.

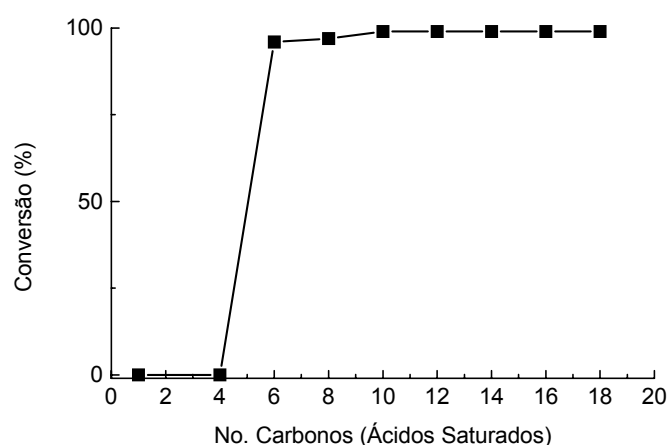


**Figura 11** – Variação na conversão (%) em função do n<sup>o</sup> de carbonos da cadeia alquílica do álcool. [50mg PSL/1,5g filme CS, em hexano, 30°C, 24h]

A maior conversão em éster (97%) foi obtida quando o 1-propanol foi utilizado. Com álcoois primários a partir de cinco carbonos, as conversões foram menores que 50%, evidenciando a influência dos efeitos estéreos nas reações biocatalisadas e que estas dependem da formação do complexo acil-enzima, primeira etapa do mecanismo de esterificação mostrado na **Figura 9** (para a hidrólise de um éster).<sup>2,18</sup>

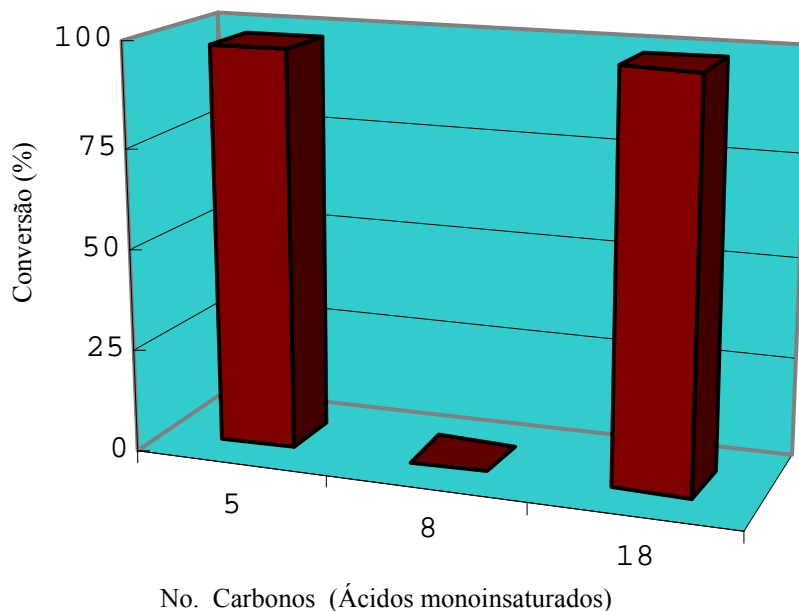
Considerando o alto grau de conversão na esterificação do ácido oleico com o 1-propanol, estudou-se a reação de diversos ácidos (5mmol) saturados e insaturados com este álcool (5mmol).

Os resultados mostrados na **Figura 12** referem-se a esterificação dos ácidos saturados com a cadeia alquílica variando de 1 a 18 carbonos. Verificou-se que a partir de três carbonos os ésteres foram obtidos em rendimentos quantitativos (~100%), e que apenas ácidos de cadeia pequena alteraram a atividade da PSL imobilizada. Estes resultados sugerem que os ácidos menores não se ligam efetivamente à enzima, não havendo a formação favorável do complexo acil-enzima, e conseqüentemente não ocorre a esterificação (conversão ~ 0%).



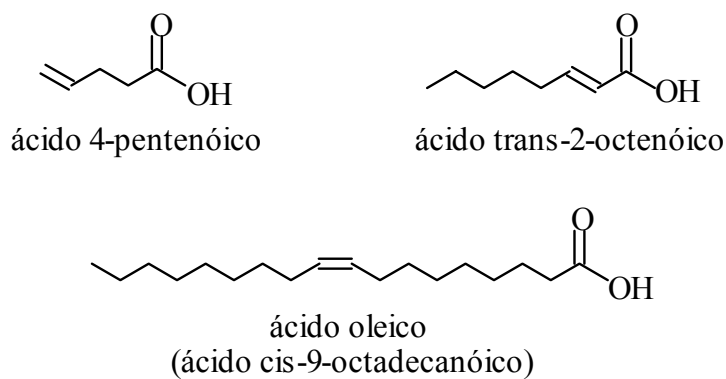
**Figura 12** – Variação na conversão (%) em alcenoatos de n-propila em função do nº de carbonos da cadeia alquílica do ácido. [50mg PSL/1,5g filme CS, em hexano, 30°C, 24h]

Para a esterificação biocatalisada dos ácidos de cadeia monoinsaturada com n-propanol, os valores de porcentagem de conversão estão mostrados na **Figura 13**, onde pode-se observar que para os ácidos oleico e 4-pentenóico os graus de conversão foram maiores que 98%, enquanto que com o ácido trans-2-octenóico não houve formação de produto. É possível que a dupla ligação próxima ao grupo carboxila esteja desfavorecendo a formação do complexo acil-enzima, devido a efeitos estéreos fazendo com que a reação não ocorra, e/ou que a dupla ligação conjugada diminua a reatividade da carboxila por efeitos eletrônicos.



**Figura 13** – Variação na conversão em alcanóatos de n-propilas para os ácidos 4-pentenóico, 2-octenóico e oleico. [50mg PSL/1,5g filme CS, em hexano, 30°C, 24h]

As estruturas dos ácidos oleico, trans-2-octenóico e 4-pentenóico são mostradas na **Figura 14**.

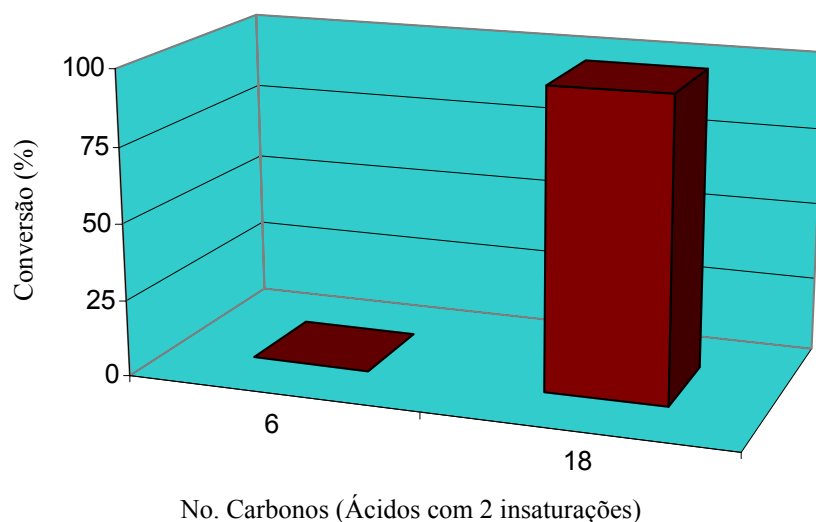


**Figura 14** – Estrutura dos ácidos monoinsaturados oleico, 4-pentenóico e trans-2-octenóico.

No estudo da esterificação biocatalisada dos ácidos com duas duplas ligações com n-propanol, novamente observou-se a influência da insaturação quando está próxima ao grupo carboxila. Utilizando o ácido sórbico (6 carbonos e insaturado nas posições 2 e 4) não houve formação de produto, enquanto quando utilizou-se o ácido linoleico (18 carbonos e insaturado nas posições 9 e 12) a conversão foi quantitativa (~ 100%).

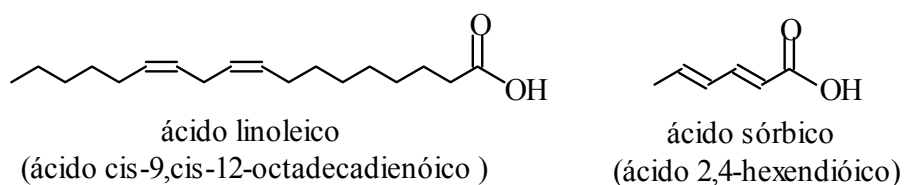
Conforme já discutido anteriormente (**Figura 12**), a reação de esterificação do ácido hexanóico com n-propanol, nas condições utilizadas, formou o produto com 100% de conversão

A **Figura 15** mostra os resultados de porcentagem de conversão na esterificação dos ácidos sórbico e linoleico com n-propanol.



**Figura 15** - Influência da posição da dupla ligação na reação de esterificação dos ácidos com 2 insaturações. [50mg PSL/1,5g filme CS, em hexano, 30°C, 24h]

Na **Figura 16** estão as estruturas dos ácidos sórbico e linoleico.



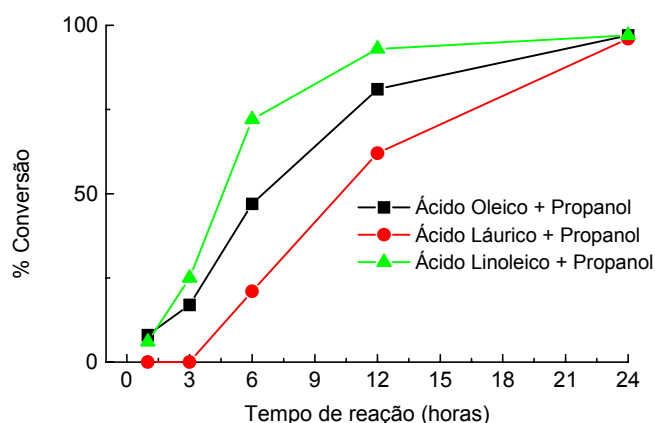
**Figura 16** – Estruturas dos ácidos com 2 insaturações, sórbico e linoleico.

Estes resultados, novamente evidenciam a influência dos efeitos estéreos e/ou eletrônicos nas reações biocatalisadas.

#### **4.2 – Efeito do tempo na esterificação dos ácidos oleico, láurico e linoleico com n-propanol**

O sistema PSL/CS foi utilizado na esterificação de 5 mmol dos ácidos oleico, láurico e linoleico, com o intuito de se verificar se o tempo de reação influencia nas respectivas porcentagens de conversão. Nos tempos de 1, 3, 6, 12 e 24 horas, foram retiradas alíquotas do meio reacional, e estas foram submetidas à análise de RMN<sup>1</sup>H para determinação da porcentagem de conversão.

Os valores de conversão obtidos nos intervalos de tempo estudados estão mostrados na **Figura 17**.



**Figura 17** – Efeito do tempo na esterificação catalisada pela lipase *Pseudomonas sp.*, dos ácidos oleico, láurico e linoleico com n-propanol. [50mg PS/1,5g filme CS, em hexano, 30°C]

Pode-se observar que entre 3 e 12 horas de reação, as maiores porcentagens de conversão foram alcançadas quando o ácido linoleico foi utilizado. Estes resultados mostram que quando as ligações duplas estão afastadas do centro reacional não há influência na conversão em produto

Após 24 horas de reação as conversões foram superiores a 96% para os três ácidos utilizados, o que sugeriu que, para esta quantidade de enzima o tempo necessário para converter estes ácidos nos respectivos ésteres pode ser inferior a 24 horas de reação.

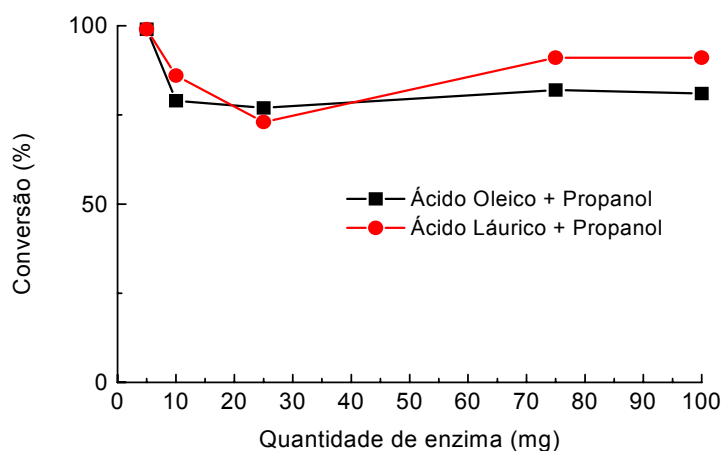
A partir destes resultados optou-se por realizar um estudo da variação da quantidade de enzima após 6 horas de reação.

### 4.3 – Efeito da variação da quantidade de lipase PS na obtenção de ésteres derivados dos ácidos oleico e láurico

Foram preparados filmes de caseinato de sódio contendo 5, 10, 25, 75 e 100 mg de lipase de *Pseudomonas sp.*, para verificar se a quantidade de enzima influenciava nas percentagens de conversão em laurato e oleato de n-propila, em 6 horas de reação a 30°C.

Os resultados estão apresentados na **Figura 18**. Pode-se observar que para ambos ácidos a quantidade de lipase imobilizada não influenciou significativamente na conversão em ésteres. Deve-se entretanto confirmar o resultado obtido na utilização 5 mg de lipase imobilizada, pois para esta quantidade e para os dois ácidos, obteve-se um valor de conversão acima dos determinados com uma maior quantidade desta enzima (~100%).

A partir destes dados, verificou-se que a quantidade de lipase PS utilizada nestes sistemas pode ser menor que 50 mg, evidenciando o seu papel catalítico.



**Figura 18** - Influência da variação da quantidade de lipase de *Pseudomonas sp.* na conversão em oleatos e lauratos de n-propila. [5, 10, 25, 75 e 50mg PS/1,5g filme CS, em hexano, 30°C, 6h]



#### 4.4 – Estudo da reutilização do sistema PSL/CS na esterificação do ácido oleico com diversos álcoois

Os resultados obtidos na reutilização do sistema filme CS/ PSL em reações de esterificação do ácido oleico com n-propanol, n-pentanol, n-hexanol e ciclo-hexanol estão na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Reutilizações do sistema filme PSL/CS em reações de esterificação do ácido oleico.

Álcoois	<b>Reutilizações</b>									
	1 <sup>o</sup> uso	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>
n-propanol	97	99	99	99	99	99	99	97	89	99
n-pentanol	45	47	49	44	45	44	42	47	35	48
n-hexanol	29	28	30	24	22	20	20	19	-	-
ciclo-hexanol	6	7	6	3	3	3	9	-	-	-

<sup>a</sup> Determinada por RMN-<sup>1</sup>H. [ 50mg filme CS, em hexano, 30°C, 24h.PSL/1,5g]

Através dos valores de conversão apresentados na **Tabela 6** observou-se que o sistema CS/PSL pode ser reutilizado com sucesso, já que estes valores se mantiveram praticamente constantes durante todas as reutilizações a que foram submetidas.

Pôde-se observar também que a porcentagem de conversão depende da estrutura do álcool, como visto no item 4.1 deste trabalho. Para o ciclo-hexanol os valores de conversão em éster foram baixos (~ 7%) quando comparados com os demais álcoois, evidenciando novamente a influência dos efeitos estéreos para estes álcoois.

#### 4.5 – Estudos preliminares do efeito da imobilização simultânea das lipases PSL e F na esterificação do ácido oleico com n-pentanol

As lipases PSL e F (ambas da Amano) foram imobilizadas em um mesmo filme de caseinato de sódio para a realização do estudo da influência deste método, também chamado de “coquetel enzimático”, na esterificação do ácido oleico com n-pentanol.

O valor de porcentagem de conversão utilizando o “coquetel enzimático” foi comparado aos obtidos para cada enzima separadamente, e os valores estão registrados na **Tabela 7**.

**Tabela 7** – Valores de conversão (%) para a reação de esterificação<sup>a</sup> do ácido oleico com n-propanol, utilizando as enzimas imobilizadas simultânea e separadamente.

Lipases imobilizadas	quantidade (mg)	Conversão (%)
PSL + F	25 + 25	52
PSL	50	45
F	50	35

<sup>a</sup> Ácido oleico (5mmol), n-propano (5mmol), 24h., 30°C, em n-hexano.

Aparentemente houve um aumento no grau de conversão quando o “coquetel enzimático” foi usado como catalisador, o que é um resultado interessante. Porém, deve-se salientar que estes dados são apenas preliminares, e devem ser mais estudados e otimizados futuramente.

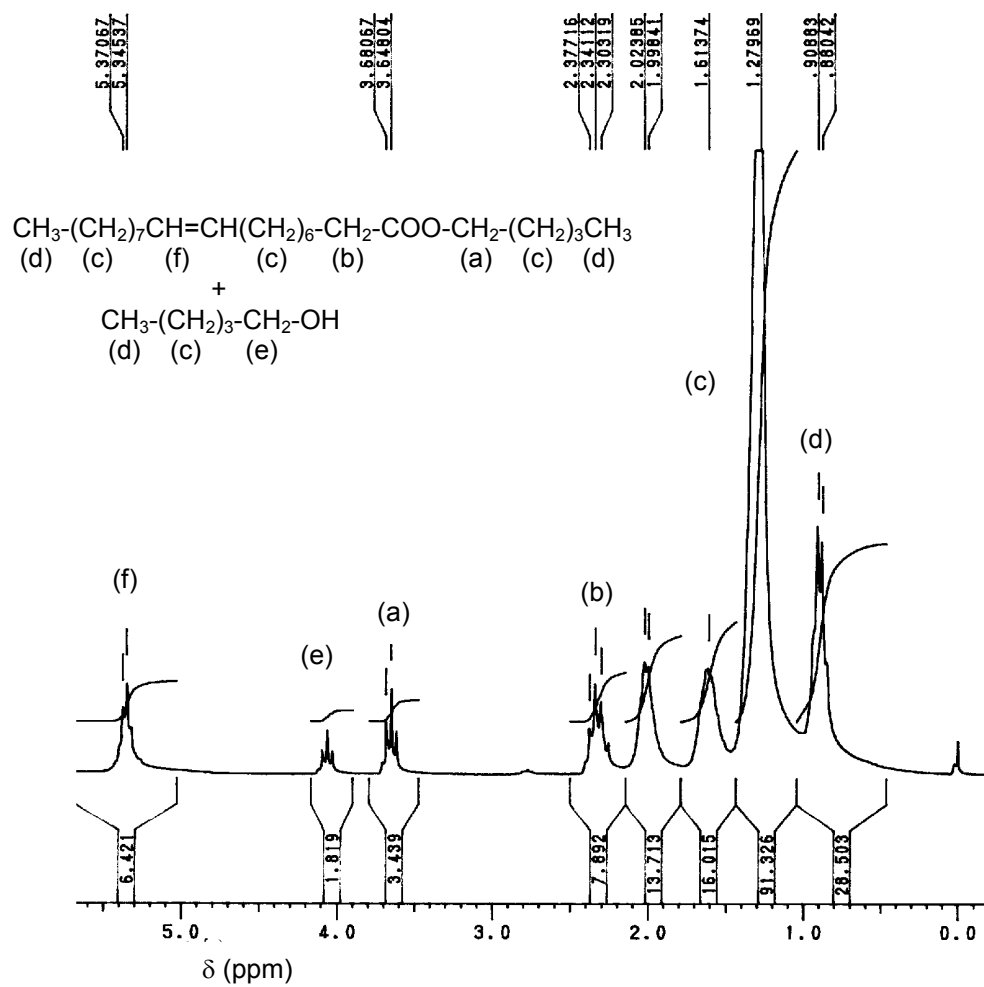
## 4.6 – Identificação dos produtos

Conforme mencionado no **item 3.2.2**, a formação dos produtos foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (ccd) durante o decorrer das reações. Utilizou-se sílica gel como fase estacionária e uma mistura de n-hexano:acetato de etila (9:1) como eluente. Os valores de Rf para as manchas correspondentes aos ésteres formados foram todos entre 0,60 e 0,80.

Os ésteres foram analisados por RMN<sup>1</sup>H e IV. Como exemplo pode-se citar a caracterização do oleato de n-pentila por RMN<sup>1</sup>H e IV.

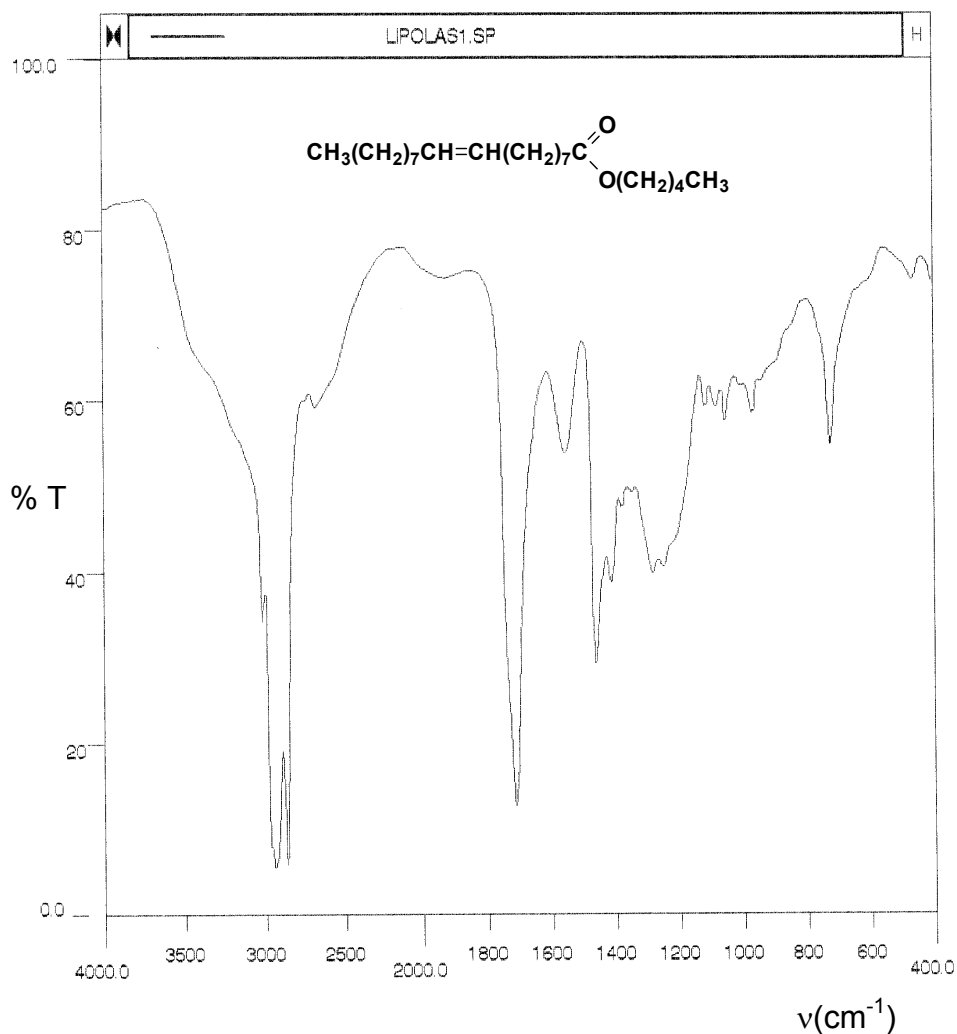
A **Figura 19**, mostra o espectro de RMN<sup>1</sup>H do oleato de n-pentila obtido via enzimática, não purificado.

Na região de 4,1 ppm observa-se um triplete (a), referente aos hidrogênios do carbono ligado ao oxigênio do grupo carboxila no éster. Os hidrogênios (e) do carbono ligado ao oxigênio do álcool aparecem em 3,6 ppm, também como triplete. O triplete (b) referente aos hidrogênios do carbono ligado diretamente ao carbono carboxílico aparece na região de 2,3 ppm. Os hidrogênios das metilas terminais tanto do éster quanto do álcool aparecem como um triplete em 0,8 ppm. O multiplete (c) refere-se aos hidrogênios dos grupos -CH<sub>2</sub> que aparecem ao longo da cadeia do éster. Os picos (f) referentes aos hidrogênios alílicos do éster, aparecem como um multiplete na região de 5,4 ppm.



**Figura 19** – Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz) do oleato de n-pentila (não purificado), em CDCl<sub>3</sub>.

A **Figura 20**, mostra o espectro de Infra-vermelho obtido para o oleato de n-pentila, em filme de Nujol.



**Figura 20** – Espectro de infravermelho do oleato de n- pentila, em filme de nujol.

As bandas características da carbonila de éster estão em  $1736 \text{ cm}^{-1}$ , de CO em  $1282 \text{ cm}^{-1}$ , e de grupos metila e metilênicos em  $2924 \text{ cm}^{-1}$ . A banda larga presente em  $3000 \text{ cm}^{-1}$  pode ser referente a presença de reagentes (álcool e/ou ácido) e/ou água.

## 5 – CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, as principais conclusões são:

1. Os valores de conversão percentual em éster nas reações de esterificação catalisadas por PSL/CS, dependeram de alguns fatores tais como o tamanho da cadeia alquílica dos álcoois e dos ácidos e da posição da dupla ligação dos ácidos insaturados, evidenciando assim efeitos estéreos e/ou eletrônicos.
2. Os tempos de reação influenciaram nos valores de conversão percentual em éster nas esterificações dos ácidos oleico, láurico e linoleico com n-propanol catalisadas por PSL/CS nas condições aqui estudadas.
3. Nas reações de esterificação dos ácidos oleico e láurico com n-propanol, catalisadas pela PSL imobilizada em CS, houveram formações quantitativas dos produtos (99% em éster) mesmo quando a lipase foi utilizada em pequenas quantidades (5 mg).
4. O sistema PSL/CS pode ser reutilizado pelo menos nove vezes sem perda considerável da atividade do mesmo.
5. Os estudos preliminares da imobilização simultânea das lipases PSL e F demonstraram que este “coquetel enzimático” pode se tornar uma ferramenta útil quando empregado como catalisador em reações de esterificação, para isto se faz necessário um estudo mais aprofundado deste experimento.

## 6 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Para continuar este trabalho, propõe-se:

- 1 – Estudar o efeito do solvente orgânico nestas reações de esterificação.
- 2 – Avaliar, para outras lipases, a influência do tempo e da quantidade de enzima.
- 3 - Utilizar as enzimas imobilizadas para efetuar a resolução de álcoois secundários racêmicos e produtos de adição de Bayllis-Hillman (importantes intermediários na obtenção de feromônios).
- 4 – Explorar a potencialidade dos “coquetéis enzimáticos” (duas ou mais enzimas imobilizadas no mesmo suporte).
- 5 – Caracterizar a morfologia dos filmes por espectroscopia eletrônica de varredura (MEV).

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 1 - Solomons, T. W. G.; **Química Orgânica**, LTC, RJ, cap. 24, p.487-488,1996.
- 2 - Nelson D. L.; Cox, M. M.; **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 3<sup>a</sup> ed., Worth Publishers, cap.8, 2000.
- 3 - Campbell, M. K.; **Biochemistry**, Saunders College Publishing, 2<sup>a</sup> ed., p.137,1995.
- 4 - Voet, D.; Voet, J. G.; **Biochemistry**, 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons Inc., New York, p.141-190, 1994.
- 5 - **Swiss Protein Data Bank Viewer**, ([www.expasy.ch/spdbv/text/getpc.htm](http://www.expasy.ch/spdbv/text/getpc.htm)), acessado em 30/06/2003.
- 6 - Wong, C.; Whitesides, M.; **Enzymes in Synthetic Organic Chemistry**, Pergamon, v.12, cap.1-2, p.1-130, 1994.
- 7 - Thorleif A.; Elisabeth E. J. ; et al. ; **Enantioselective enzymatic preparation of chiral glutaric monocarboxylic acids and amides**; J. Mol. Catalysis B: Enzymatic v.2, p. 55-58, 2003.
- 8 - Carvalho, P. O.; et al. ; **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados**, Química Nova, v. 26, no. 1, p. 75-80, 2003.
- 9 - **Biotimes** - Revista Bioindustrial Trimestral da Novozymes, 1998-2002.
- 10 - Moreira, M. A.; **Utilização de Lipases em Reações de Epoxidação Quimio-Enzimática**; Dissertação de Mestrado, UFSC, 2003.
- 11 - Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; **Pseudomonas sp. Lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate**, Tet. Lett., v. 43, p.5225-5227, 2002.
- 12 - Nascimento, M. G.; Neto, P. R. C.; Mazzuco, L. M.; **Biotransformação de óleos e gorduras**, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, ano III, n.19, p.28-31, 2001.
- 13 - Sebrão, D.; Moreira, M. A.; Soldi, V.; Vecchia, R. D.; Nascimento, M. G.; **Aplicações Sintéticas de Lipases Suportadas em Biopolímeros**, Livro de Resumos do X Encontro de Química da Região Sul, p. 341, 2002.



- 
- 14 - Goswanmi P. ; Lambit, K. ; **Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrat and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilized lipase**, Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 727-735, 2002.
- 15 - Munjal, N. ; Sawheney, S. K. ; **Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels**, Enzy. Microb. Techn., v. 30, p. 613-619, 2002.
- 16 - Kamal, A. ; Khanna, G. B. R. ; et al. ; **Chemoenzymatic syntesis of duloxetine and its enantiomer**, Tet. Lett., v. 44, p. 4783-4787, 2003.
- 17 - Macedo, G. A. ; Pastore, G. M. ; **Lipases Microbianas na Produção de Ésteres Formadores de Aroma**; Revista Ciência Tecnol. Aliment., v. 17, p. 115-119, 1997.
- 18 - Faber, K. ; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3<sup>a</sup> ed., Springer-Verlag, New york, 1997.
- 19 - Arica, M. Y. ; et al. ; **Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic, group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrofilic membrane matrix**, J. Food Eng., v.52, p. 367-374, 2002.
- 20 - Amorim, R. V. S. ; et al. ; **Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization**, Biores. Technol., v. 89, p. 35-39, 2003.
- 21 - Coultate, T. P. ; **Food – The Chemistry of its components**, Royal Society of Chemistry Paperbacks, p.81-87, London, 1988.
- 22 - Sgarbieri, V. C. ; **Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações**, Livraria Varela Ltda, cap. II, p.139-148, São Paulo-SP, 1996.
- 23 - Amiot, J.; **Ciencia y Tecnologia de la Leche**, Ed. Acribia S.A..
- 24 - Amano Enzyme U.S.A. Co., Ltda; **Ficha Técnica da Lipase de *Pseudomonas sp.***; USA, 1997.
- 25 - Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R.; **Anatomy of Lipase Binding Sites: The Scissile Fatty Acid Binding Site**, Chemistry and Physics of Lipids, 68-79, 1998.