

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

**ENZIMAS IMOBILIZADAS EM CRISOTILA E ORGANO-
GEL: APLICAÇÃO NA RESOLUÇÃO DE ÁCIDOS
RACÊMICOS**

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

**PAULO CESAR DE JESUS
ORIENTADORA: MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO**

**FLORIANÓPOLIS - BRASIL
17 DE JULHO DE 1998**

**“ENZIMAS IMOBILIZADAS EM CRISOTILA E ORGANO-GEL: APLICAÇÃO
NA RESOLUÇÃO DE ÁCIDOS RACÊMICOS”**

PAULO CESAR DE JESUS

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:

Paulo José Samenho Moran
Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Nelson Eduardo Durán Caballero
Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Ricardo José Nunes
Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Valdir Soldi
Prof. Dr. Valdir Soldi
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Marina Uicará
Prof.ª. Dr.ª. Marina Uicará
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

“O que eu vejo na natureza é uma magnífica estrutura que só compreendemos com muita imperfeição, mas que pode satisfazer uma pessoa com sentimento de humildade”.

Albert Einstein (1879 -1955)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a amiga e professora Dr^a. Maria da Graça Nascimento pela oportunidade de realizar mais este trabalho sob a sua orientação.

Ao professor Paulo José S. Moran do IQ-UNICAMP pelo fornecimento da crisotila.

Ao professor José Tércio B. Ferreira (*in memoriam*) e a Aurélia Reckziegel do DQ-UFSCar pelo fornecimento do ácido (\pm)-2-metil-butanóico.

Ao professor Ademir Morel e a Jane Moreira do DQ-UFSM pelas análises de Cromatografia gasosa.

Ao professor Valdir Soldi e ao Laboratório de Materiais da UFSC pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Miguel B. Caro e a técnica Vanilde F. Geronimo pela ajuda nas análises de ¹H RMN.

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

Aos companheiros de laboratório Pedro, Giovani, Jair, Vanderlei, Milton, Donizete, Elisa, Neide, Sandra, Flávia, Louisiane, Julieta, Chies, Tais, Janaina e Clodoaldo pela contribuição e amizade cultivada nestes quatro anos.

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

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

À minha esposa Santusa Napoleão dos Santos que soube me dar o equilíbrio emocional necessário durante estes quatro anos de trabalho, além da valiosa contribuição na confecção deste manuscrito.

Aos meus pais.

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

Finalizo agradecendo à Jesus Cristo.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Definição de Enzimas	01
1.2 Algumas Considerações Mecanísticas das Enzimas	02
1.3 Determinação da Enantiosseletividade da Enzimas.....	05
1.4 Aplicações de Enzimas em Síntese Orgânica.....	06
1.4.1 Lipases em Síntese Orgânica	07
1.4.2 Aplicação da Lipases em Meio Orgânico	10
1.4.3 Importância da Resolução de Ácidos Racêmicos.....	12
1.5 Imobilização de Enzimas.....	14
1.5.1 Imobilização de Enzimas em Organo-Gel	17
1.5.2 Imobilização de Enzimas em Crisotila	19
1.6 Métodos Analíticos Aplicados na Determinação do Excesso Enantiomérico de Compostos Opticamente Ativos	22
1.7 Justificativa do Trabalho	26
1.8 OBJETIVOS	29
1.8.1 Objetivo Geral	29
1.8.2 Objetivo Específico.....	29

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL	30
2.1 Materiais e Métodos	30
2.2 Caracterização dos Produtos	30
2.3 Enzimas Imobilizadas em Organo-Gel.....	32
2.3.1 Preparação do Organo-Gel	32
2.3.2 Preparação do Meio Reacional	33
2.4 Enzimas Imobilizadas em Crisotila	34
2.4.1 Preparação do Suporte Crisotila	34

2.4.2 Cinética de adsorção da CCL em Crisotila	35
2.4.3 Estudo da Adsorção da CCL em Função da Massa de Crisotila	36
2.4.4 Isoterma de Adsorção da CCL em Crisotila	36
2.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
2.5 Resolução dos Ácidos Racêmicos	38

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
3.1 Estudo da Adsorção da Lipase de <i>Candida cylindracea</i> (CCL) em Crisotila	42
3.1.1 Cinética da Adsorção da CCL em Crisotila	42
3.1.2 Adsorção da CCL em Função da Massa de Crisotila	48
3.1.3 Isotermas de Adsorção da CCL em Crisotila	49
3.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	54
3.2 Resolução de Ácidos Racêmicos	56
3.2.1 Resolução dos Ácidos Racêmicos via Esterificação Catalisada pela Lipase de <i>Candida cylindracea</i> Imobilizada em Crisotila	58
3.2.1.1 Resolução dos ácidos (±)-2 e (±)-3-metil-alcanóicos e (±)-2-etil-hexanóico.....	58
3.2.1.2 Resolução dos ácidos (±)-2-bromo-alcanóicos	69
3.2.1.3 Resolução do ácidos (±)-citronélico, (±)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico, (±)-canforcarboxílico e ácido D,L-mandélico	71

3.2.2 Resolução dos Ácidos Racêmicos via Esterificação Catalisada pela Lipase de <i>Chromobacterium viscosum</i> Imobilizada em Organo-Gel.....	73
3.2.2.1 Resolução dos ácidos (±)-2 e (±)-3-metil-alcanóicos e (±)-2-etil-hexanóico.....	73
3.2.2.2 Resolução dos ácidos (±)-2-bromo-alcanóicos	79
3.2.2.3 Resolução do ácidos (±)-citronélico, (±)-2-(p-clorofenoxi)-propiônico, (±)-canforcarboxílico e ácido D,L-mandélico	79
3.3 Comparação da Resolução dos Ácidos Racêmicos nos Sistemas de CCL/Crisotila e CVL/Organo-Gel com Dados da Literatura	82
3.4 Outro Métodos de Análise Utilizados na Determinação do Excesso Enantiomérico dos Ésteres Obtidos Experimentalmente	84
3.5 Caracterização dos Produtos	86
3.6 CONCLUSÕES	90

CAPÍTULO IV

4. Referências Bibliográficas	92
--	-----------

ANEXOS

Produção Acadêmica nos Anos 1994 - 1998

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estrutura tridimensional da α -quimiotripsina	01
2. Diagrama de energia de reação catalisada vs não catalisada enzimaticamente	03
3. Diagrama de energia para uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima	04
4. Algumas possibilidades de transformações orgânicas utilizando catálise enzimática	07
5. Comportamento catalítico das lipases	09
6. Alguns feromônios sintetizados a partir do ácido (R)-(+)-citronílico	12
7. Técnicas de imobilização de enzimas	16
8. Modelo proposto para a estrutura do organo-gel	18
9. Estrutura da crisotila	19
10. Camada fundamental da estrutura da crisotila	20
11. Número de publicações sobre a utilização de enzimas em solvente orgânico	26
12. Preparação do organo-gel	32
13. Preparação do meio reacional do sistema organo-gel.....	33

14. Estudos realizados com a crisotila	35
15. Sistema de organo-gel e/ou crisotila utilizado para realizar as reações de esterificação	40
16. Dubnoff TE 093 utilizado nas reações	41
17. Quantidade de CCL adsorvida em crisotila em diferentes temperaturas	43
18. Acompanhamento da velocidade de adsorção da CCL em crisotila a 258 nm e 25°C	44
19. Variação de k_{obs} em função da temperatura para a adsorção da CCL em crisotila	45
20. Gráfico de $\ln k_{obs}/T$ versus $1/T$ para a adsorção da CCL em crisotila	47
21. Adsorção da CCL em função da massa de crisotila	48
22. Isoterma de adsorção da lipase de <i>Candida cylindracea</i> (CCL) em crisotila	49
23. Gráfico de Freundlich linearizado para a isoterma de adsorção da CCL em crisotila	52
24. Fotomicrografia da superfície da crisotila tratada sem enzima imobilizada	54
25. Fotomicrografia da superfície da crisotila tratada com CCL imobilizada	55
26. Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com n-pentanol, n-octanol, n-undecanol, catalisada pela CCL imobilizada em crisotila.....	58

27. Espectro de infravermelho do éster (+)-2-metil-pentanoato de n-octila	61
28. Espectro de ^1H RMN do éster (+)-2-metil-pentanoato de n-octila em CDCl_3	62
29. Espectro de ^1H RMN do ácido (+)-2-metil-pentanóico em CDCl_3	62
30. Grau de esterificação em função do tempo para a reação do n-pentanol com os ácidos (\pm)-2-metil-pentanóico, (\pm)-3-metil-pentanóico e 4-metil-pentanóico, catalisada pela CCL imobilizada em crisotila.....	64
31. Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico com n-pentanol, n-octanol, n-undecanol, catalisada pela CCL imobilizada em crisotila.....	65
32. Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-butanóico com n-pentanol, catalisada pela CCL imobilizada em crisotila	68
33. Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-citronélico com n-pentanol catalisada pela CCL imobilizada em crisotila	72
34. Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com n-pentanol, n-octanol, n-undecanol, catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel	73
35. Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico com n-pentanol, n-octanol, n-undecanol, catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel.....	77
36. Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-citronélico com n-pentanol, catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel	80

ÍNDICE DE TABELAS

1. Exemplos de algumas drogas resolvidas via catálise enzimática	11
2. Características da crisotila	21
3. Reagentes de deslocamento quiral de lantanídeos	24
4. Alguns agentes derivatizantes quirais comuns para análise de RMN de ^1H e ^{19}F	25
5. Ácidos racêmicos utilizados no trabalho	38
6. Ácidos racêmicos utilizados no trabalho	39
7. Quantidade de CCL adsorvida em crisotila em diferentes temperaturas	43
8. Efeito da temperatura na constante de velocidade de adsorção da CCL crisotila	44
9. Constantes empíricas de Freundlich para a isoterma de adsorção da CCL em crisotila	53
10. Comportamento dos substratos com relação aos sistemas utilizados	57
11. Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil- pentanóico com diferentes álcoois catalisadas pela CCL imobilizada em crisotila.....	59
12. Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com diferentes álcoois, catalisadas pela CCL imobilizada em crisotila.....	59

13. Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (\pm)-3-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisadas pela CCL imobilizada em crisotila	63
14. Comparação do grau de conversão da reação dos ácidos (\pm)-2-metil-pentanóico (\pm)-3-metil-pentanóico e 4-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisadas pela CCL imobilizada em crisotila	63
15. Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico com diferentes álcoois catalisadas pela CCL imobilizada em crisotila	66
16. Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico com diferentes álcoois catalisadas pela CCL imobilizada em crisotila	66
17. Medidas de rotação óptica e excesso enantiomérico do produto da reação do ácido (\pm)-2-metil-butanóico com n-pentanol catalisada pela CCL imobilizada em crisotila	68
18. Medidas de rotação óptica dos produtos das reações dos ácidos (\pm)-2-bromoalcanóicos com n-pentanol catalisadas pela CCL imobilizada em crisotila	70
19. Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisadas pela CVL imobilizada em organo-gel	74
20. Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisadas pela CVL imobilizada em organo-gel	74

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Asp = ácido aspártico

CVL = lipase de *Chromobacterium viscosum*

CCL = lipase de *Candida cylindracea*

c = concentração em g/100 mL (usada nas determinações polarimétricas)

E_a = energia de ativação

ee_s = excesso enantiomérico do substrato

ee_p = excesso enantiomérico do produto

Enz = enzima

E = razão enantiomérica

Glu = ácido glutâmico

h = constante de Planck

His = histidina

k_{cat} = constante de velocidade de 1ª ordem aparente da enzima

K_M = Constante de Michaelis-Menten

k_{cat}/K_M = constante de velocidade de 2ª ordem aparente para reação enzimática

k_B = constante de Boltzmann

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

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

MEV = microscopia eletrônica de varredura

n_D = índice de refração

PPL = lipase do *Pâncreas do porco*

RMN = ressonância magnética nuclear

R = constante dos gases

Ser = serina

T = temperatura em Kelvin

α = rotação óptica observada

[α]_D^T = rotação óptica específica

ΔG[#] = energia livre de ativação

ΔΔG[#] = diferença de energia livre de ativação

ΔH^\ddagger = entalpia de ativação

ΔS^\ddagger = entropia de ativação

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

RESUMO

Neste trabalho dois suportes diferentes foram avaliados para a imobilização de enzimas: o organo-gel contendo a lipase de *Chromobacterium viscosum* (CVL), e a crisotila contendo a lipase de *Candida cylindracea* (CCL). Estes dois sistemas foram aplicados na resolução de ácidos carboxílicos racêmicos, a 25°C.

Inicialmente foi estudado o comportamento da adsorção da CCL em crisotila. Observou-se que para uma solução aquosa de CCL de concentração 2,0 mg/mL, o máximo de enzima adsorvida em 1g de crisotila foi de 70% nas temperaturas de 21°C e 25°C, com um tempo de saturação do suporte de 120 minutos. Para temperaturas mais elevadas como 30 e 35°C a porcentagem de adsorção foi de 60 e 64%, respectivamente.

Os estudos de isotermas de adsorção demonstraram que a interação entre a CCL e a crisotila não segue a equação de Langmuir e apresenta uma baixa afinidade com a equação de Freundlich. Estes resultados indicaram que a adsorção desta enzima (CCL) é um processo físico.

A CCL imobilizada em crisotila foi aplicada na resolução dos ácidos racêmicos (\pm)-2-metil-alcanóicos, (\pm)-3-metil-pentanóico e (\pm)-2-etil-hexanóico via esterificação enantiosseletiva com diferentes álcoois alifáticos. Esta enzima demonstrou preferência pelo enantiômero com rotação óptica positiva para os ácidos (\pm)-2-metil-alcanóicos. Para o ácido (\pm)-3-metil-pentanóico a esterificação não foi enantiosseletiva, enquanto que para o ácido (\pm)-2-etil-hexanóico a reação não ocorreu. Quando os ácidos (\pm)-2-bromo-alcanóicos foram esterificados com n-pentanol via CCL imobilizada em crisotila, esta não foi seletiva para os ácidos com cadeia carbônica com 6 átomos de carbono ou menos, tais como o (\pm)-2-bromo-pentanóico e hexanóico. Para a esterificação do ácido (\pm)-2-bromo-octanóico com n-pentanol a CCL imobilizada apresentou uma boa seletividade, mostrando preferência pelo enantiômero com rotação óptica negativa, ao contrário dos resultados obtidos para a resolução dos ácidos (\pm)-2-metil-alcanóicos.

Os valores de enantiosseletividade (E) foram baixos (<11), sendo que obteve-se os melhores resultados de excessos enantioméricos para a resolução do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico (ee_p entre 75 a 85%).

Utilizando ácidos mais complexos como (\pm)-citronélico, (\pm)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico, (\pm)-canforcarboxílico e o D,L-mandélico, foi observada uma baixa formação de produto apenas para o ácido (\pm)-citronélico (3,19%) com rotação óptica zero. Para os demais ácidos não foi observada a formação de éster.

A lipase de *Chromobacterium viscosum* (CVL) imobilizada em organo-gel demonstrou também preferência pelo enantiômero com rotação óptica positiva no caso das reações de esterificação enantiosseletivas dos ácidos (\pm)-2-metil-alcanóicos com vários álcoois alifáticos. Os valores de excessos enantioméricos para os produtos obtidos ficaram entre 54 e 75%. A esterificação do ácido (\pm)-3-metil-pentanóico com os álcoois alifáticos não foi enantiosseletiva. Quando utilizou-se os ácidos (\pm)-2-etil-hexanóico, (\pm)-2-bromo-alcanóicos, (\pm)-canforcarboxílico e D,L-mandélico e n-pentanol não foi observada a reação de esterificação. Na reação do ácido (\pm)-citronélico com n-pentanol, foi observada preferência pelo enantiômero com rotação óptica positiva na formação do éster, sendo os valores de excesso enantioméricos para o enantiômero não reativo e o produto de 29 e 48%, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram que tanto a crisotila bem como o organo-gel podem ser utilizados, com sucesso, como suportes para a imobilização de enzimas com posterior aplicações destes biocatalisadores em diversas reações em meio orgânico.

ABSTRACT

In this work, two different supports were evaluated for enzyme immobilization: the organo-gel with *Chromobacterium viscosum* lipase (CVL), and chrysotile with *Candida cylindracea* lipase (CCL). These two systems were applied for the resolution of racemic carboxylic acids, at 25°C.

Firstly, the behaviour of CCL adsorption in chrysotile was studied. It was observed that for an aqueous solution of CCL with concentration of 2.0 mg/mL, the maximum of adsorbed enzyme in 1g of chrysotile was 70% in the temperatures of 21°C and 25°C, with the time of support saturation being of 120 minutes. For higher temperatures such as 30°C and 35°C, the adsorption percentages were 60 and 64%, respectively.

The studies of adsorption isotherms demonstrated that the interaction between CCL and chrysotile does not follow Langmuir's equation. In addition, it shows a low affinity with Freundlich's equation. These results indicated that the adsorption of this enzyme (CCL) is a physical process.

CCL immobilized in chrysotile was used for resolution of the racemic acids (\pm)-2-methylalkanoic, (\pm)-3-methylalkanoic and (\pm)-2-ethylhexanoic by enantioselective esterification with various aliphatic alcohols. This enzyme showed preference for the enantiomer with positive optical rotation for (\pm)-2-methylalkanoic acids. For (\pm)-3-methylpentanoic acid, the esterification was not enantioselective meanwhile for the (\pm)-2-ethylhexanoic acid no reaction was observed. When (\pm)-2-bromoalkanoic acids were esterified with n-pentanol by immobilized CCL in chrysotile, this reaction was not selective for acids with carbonic chain with six carbons fewer, such as (\pm)-2-bromopentanoic and hexanoic acids. For the esterification of (\pm)-2-bromooctanoic acid with n-pentanol, immobilized CCL had a good selectivity, showing preference for the enantiomer with negative optical rotation, unlike the obtained results for the (\pm)-2-methylalkanoic acids resolution.

The enantioselectivity values (E) were low (<11), and the best results for enantiomeric excesses were obtained for (\pm)-2-methylpentanoic acid resolution (ee_p between 75 to 85%).

Using more complex acids such as (\pm)-citronellic, (\pm)-2-(p-chlorophenoxy) propionic, (\pm)-camphoric and D,L-mandelic, a low product formation was only observed

for the (\pm)-citronellic acid (3,19%) with zero value of optical rotation. For the other acids no éster formation was observed.

Chromobacterium viscosum lipase (CVL) immobilized in organo-gel also demonstrated preference for the enantiomer with positive optical rotation in the enantioselective esterification reactions of (\pm)-2-methylalkanoic acids with various aliphatic alcohols. The enantiomeric excesses values were in the range of 54 to 75%. The esterification of (\pm)-3-methylpentanoic acid with n-pentanol was not enantioselective. When (\pm)-2-ethylhexanoic, (\pm)-2-bromoalkanoic, (\pm)-camphoric and D,L-mandelic acids were used, no esterification reaction was observed. In the reaction of (\pm)-citronellic acid with n-pentanol, it was observed preference for enantiomer with positive optical rotation for the ester formation. The enantiomeric excesses values for non-reactive enantiomer and product were 29 and 48%; respectively.

The obtained results showed that chrysotile and organo-gels can be used, with success, as supports for enzyme immobilization with applications of these biocatalysts in various reactions in organic media.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição de Enzimas

Por definição enzimas são catalisadores de reações bioquímicas com alta especificidade de reação.¹ São formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, possuindo em suas estruturas grupos polares tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂, que podem promover catálise. Sua atividade e estrutura mais estável são mantidas em meio aquoso. As enzimas possuem estruturas complexas de cadeias polipeptídicas, sendo que poucas tem sua estrutura tridimensional definida na literatura, um exemplo é a α -quimiotripsina (Figura 1).²

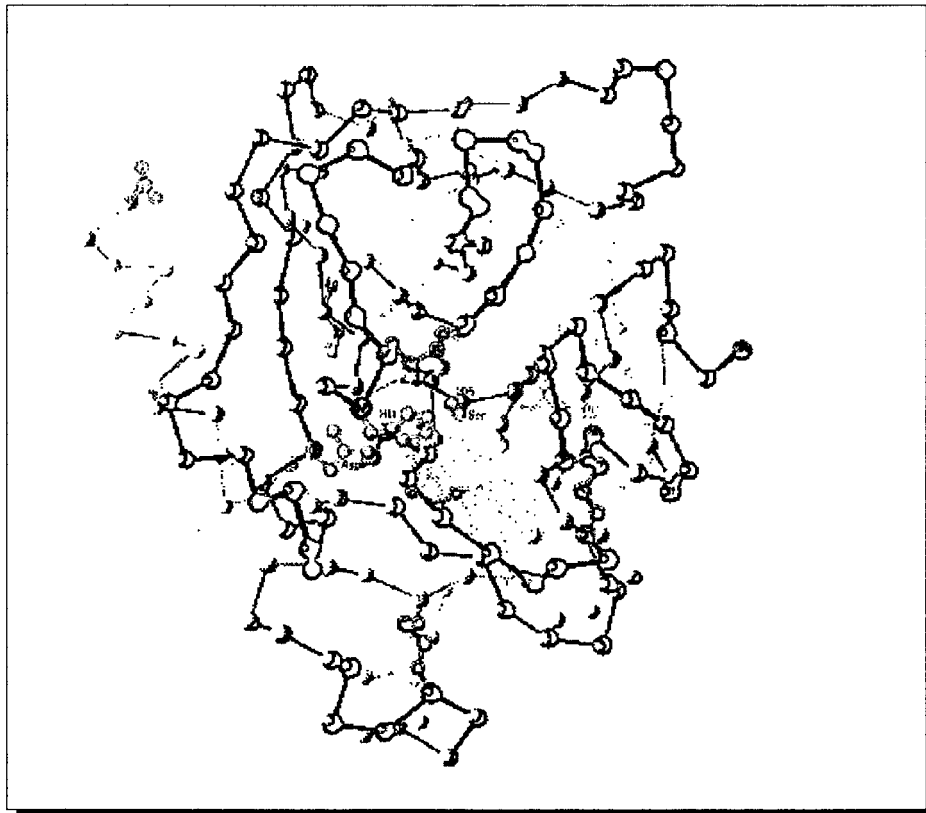


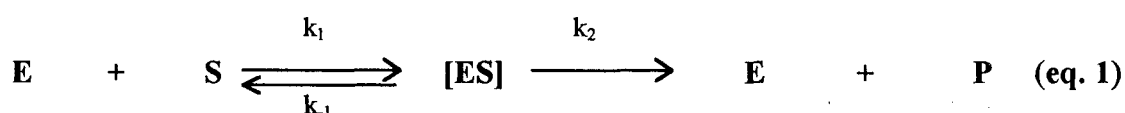
Figura 1 - Estrutura tridimensional da α -quimiotripsina

As enzimas são catalisadores extremamente versáteis, existindo um processo enzimático equivalente com vários tipos de reações orgânicas.³ As reações catalisadas por enzimas ocorrem sob condições suaves, 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. Elas são catalisadores altamente eficientes, sendo que as velocidades das reações catalisadas por enzimas podem ser até 10^{12} vezes mais rápidas do que as reações correspondentes não catalisadas. São geralmente muito seletivas em termos dos tipos de reações catalisadas, com relação à estrutura e estereoquímica do substrato e do produto. Esta propriedade constitui a especificidade de uma enzima, sendo seu aspecto mais importante para a exploração e uso na síntese orgânica.³

1.2 Algumas Considerações Mecanísticas das Enzimas⁴

As enzimas reagem via a formação de um complexo enzima-substrato para posteriormente formar produtos (**Equação 1**).



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

Como toda reação catalítica, uma enzima acelera a velocidade de reação diminuindo a barreira energética entre reagentes e produtos (**Figura 2**). Grande parte de seu poder catalítico ocorre por elas aproximarem os substratos em orientações favoráveis no complexo enzima - substrato (ES).

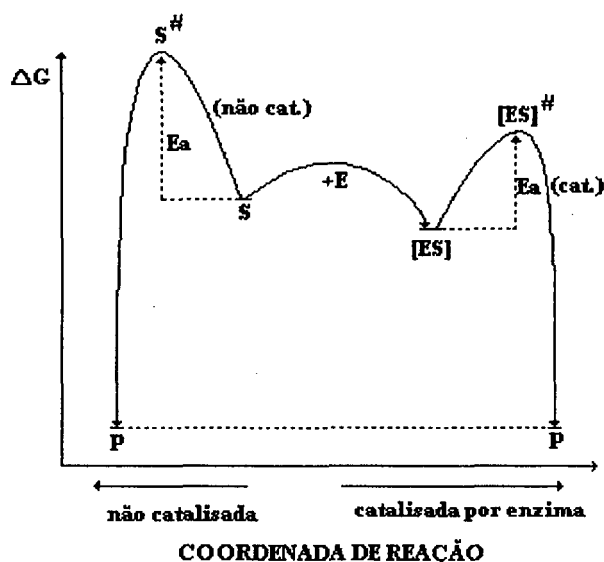


Figura 2 - Diagrama de energia de reação catalisada vs não catalisada enzimaticamente.

S= substrato, P = produto, E = enzima, [ES] = complexo enzima-substrato,

denota estado de transição, E_a = energia de ativação.

Muitas são as vantagens de utilizar enzimas em métodos sintéticos, mas três características são as mais importantes:⁴

- 1) **Quimiosseletividade**. Uma vez que o propósito de uma enzima é atuar em um único tipo de grupo funcional, outras funcionalizações sensíveis, que deveriam reagir normalmente com um certo grau sob catálise química, são preservadas.
- 2) **Regiosseletividade**. Devido a sua complexa estrutura tridimensional, enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em regiões diferentes no mesmo substrato.
- 3) **Enantiosseletividade**. Toda enzima é feita de L-aminoácidos e assim são catalisadores quirais. Como consequência, algum tipo de quiralidade presente no substrato é reconhecida. Assim, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo, e ambos enantiômeros de um substrato podem reagir à diferentes velocidades, dispondo de uma resolução cinética.

Toda estereosseletividade das enzimas origina-se da diferença de energia do complexo enzima-substrato no estado de transição $[ES]^\ddagger$. Supondo uma reação enantiosseletiva com ambos substratos enantioméricos A e B (Equação 2).

Devido ao envolvimento quiral do sítio ativo da enzima, os complexos enzima-substrato diastereoméricos formados são $[EA]$ 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 em energia de ativação para ambos substratos enantioméricos respectivamente, e como consequência, um enantiômero será transformado mais rapidamente que o outro (Figura 3). O valor da diferença em energia livre, expressada como $\Delta\Delta G^\ddagger$, fornece uma medida direta da seletividade da reação.

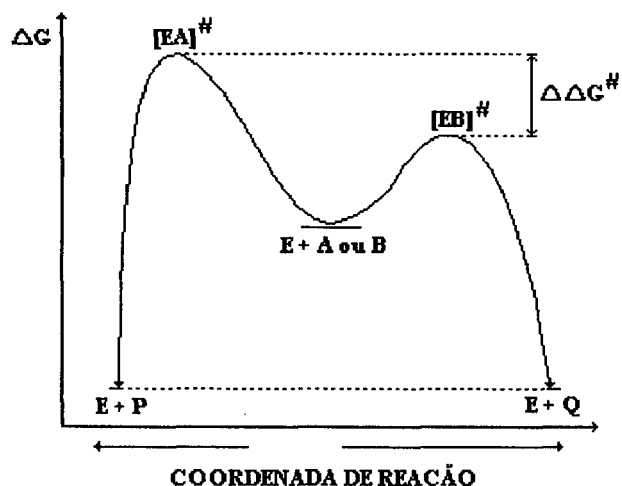
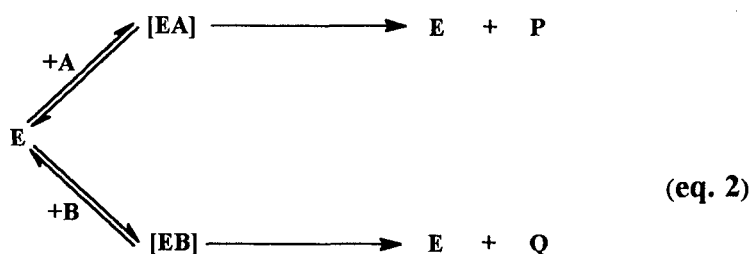


Figura 3 - Diagrama de energia para uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima. E = enzima, A e B = substratos enantioméricos, P e Q = produtos enantioméricos, ‡ denota estado de transição, $\Delta\Delta G^\ddagger$ = diferença em energia livre.

1.3 - Determinação da Enantiosseletividade das Enzimas

Resolução de racematos é um dos caminhos mais importantes para obtenção de intermediários opticamente ativos, utilizados na síntese de produtos farmacêuticos, entre outros. Chen e col.⁵, sentindo a necessidade de um método mais adequado para o tratamento quantitativo de dados bioquímicos que permitam a químicos sintéticos fazer previsões úteis em seus trabalhos, tem descrito a formulação de expressões efetivas para descrever três parâmetros chaves: A extensão de conversão de substratos racêmicos (c), a pureza óptica, expressa como excesso enantiomérico (ee) do produto ou do substrato que permanece sem reagir e a razão enantiomérica (E). O rendimento químico máximo de uma resolução cinética biocatalítica é 50% de 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), do substrato que não reagiu (ee_s), sendo o rendimento fornecido pelo grau de conversão da reação (c).⁶

Um parâmetro que inclui ambos, o excesso enantiomérico e o grau de conversão e, assim, o rendimento, é a razão enantiomérica (E). Em resolução biocatalítica ela é definida como a razão de k_{cat}/K_M (constante de velocidade de 2ª ordem aparente para reação enzimática) para dois enantiômeros. Enquanto o excesso enantiomérico é uma propriedade do produto, a razão enantiomérica é característica do processo. A razão enantiomérica (E) descreve a enantiosseletividade ou melhor a enantioespecificidade de um certo substrato e uma enzima específica, sobre 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 3, 4 e 5.^{7,8}

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (\text{eq. 3})$$

$$E = \frac{\ln [(1-c)(1-ee_s)]}{\ln [(1-c)(1+ee_s)]} \quad (\text{eq. 4})$$

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

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

1.4 Aplicação de Enzimas em Síntese Orgânica

Nos últimos anos, tem-se tornado aparente que catálise enzimática pode oferecer significantes vantagens sobre métodos químicos clássicos na síntese de compostos opticamente ativos.

Klibanov⁹ admite que a habilidade das enzimas para atuarem como catalisadores em síntese orgânica já está bem documentada. Apesar disso, químicos orgânicos relutaram em usá-las em seus métodos sintéticos. 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 cinco 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 como por exemplo: síntese de intermediários quirais;¹⁰ transformação de açúcares;¹¹ síntese de compostos importantes no metabolismo e análogos destes metabólitos (aminoácidos, açúcares e seus fosfatos, etc...); síntese de peptídeos e proteínas;¹² bem como outras transformações nas quais o emprego da metodologia da química clássica é dificultada. Portanto, enzimas representam uma classe de catalisadores

quirais potencialmente ativos e úteis para uma ampla faixa de transformações orgânicas, como exemplificados na **Figura 4**.⁴

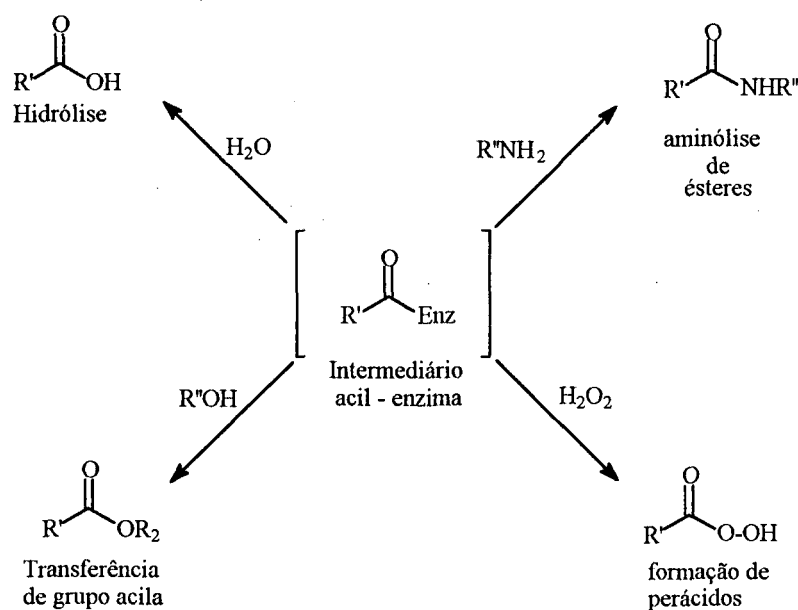


Figura 4 - Algumas possibilidades de transformações orgânicas utilizando catálise enzimática.

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 as lipases.

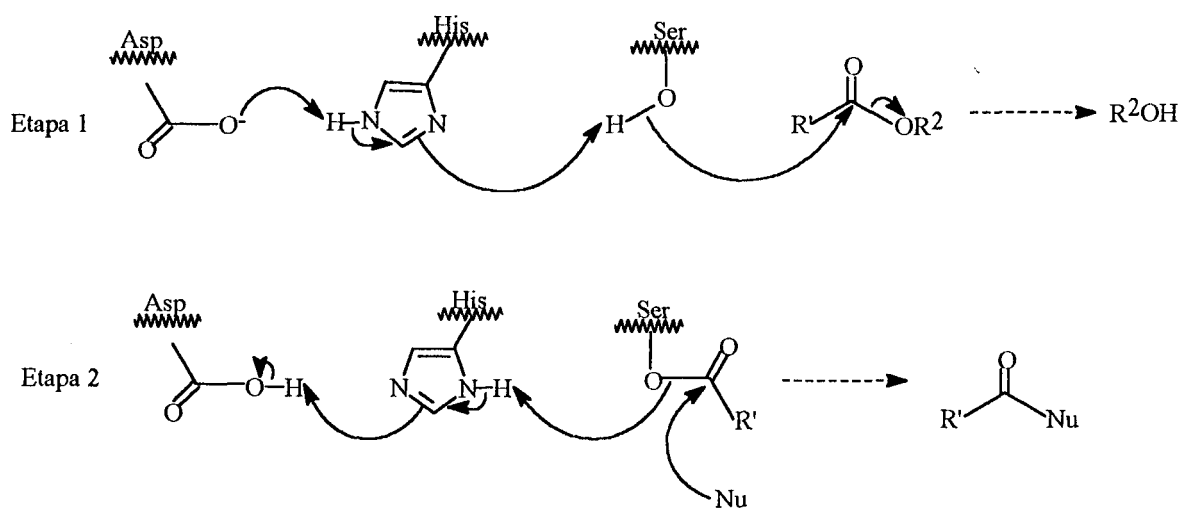
Devido à grande aplicabilidade destas enzimas em síntese orgânica, torna-se necessário explicar um pouco sobre a sua utilização, importância e usos recentes.

1.4.1 Lipases em Síntese Orgânica

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que hidrolisam triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol. Estão presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Elas têm atraído a atenção de químicos orgânicos sintéticos principalmente por suas propriedades enantiosseletivas. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica, devido à sua versatilidade catalítica,

disponibilidade comercial, baixo custo além de não requererem cofatores.^{3,9,13,14} Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores. Dependendo do tipo do doador de acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificações e transesterificações,¹⁵⁻¹⁹ amidação,²⁰⁻²⁴ síntese de peptídeos,^{25,26} e formação de lactonas macrocíclicas.^{27,28} Destas possibilidades, a síntese e/ou transesterificação enantiosseletiva de ésteres são de interesse porque fornecem aos químicos orgânicos sintéticos 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 químicas clássicas correspondentes, mas os princípios que governam a especificidade e estereoquímica das reações são diferentes e assim justifica a sua utilização.⁸

O mecanismo das hidrolases que tem sido elucidado em detalhes é o da serina-hidrolase (Esquema I)⁴.



Esquema I

Embora as lipases possam hidrolisar e formar ésteres como as proteases e esterases, seu mecanismo molecular é diferente. A diferença mais importante entre lipases e esterases é a interação físico-química com seus substratos. Em comparação com as esterases que

mostram uma atividade “normal” segundo Michaelis-Menten, um aumento de [S] conduz a um aumento na atividade. As lipases não mostram atividade quando a concentração de substrato é baixa. Quando a concentração é gradualmente aumentada acima de sua solubilidade limite, é observado um aumento repentino na sua atividade (Figura 5).²⁹

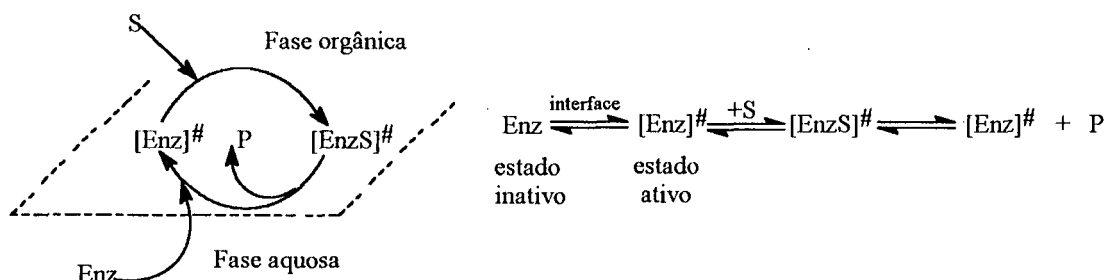
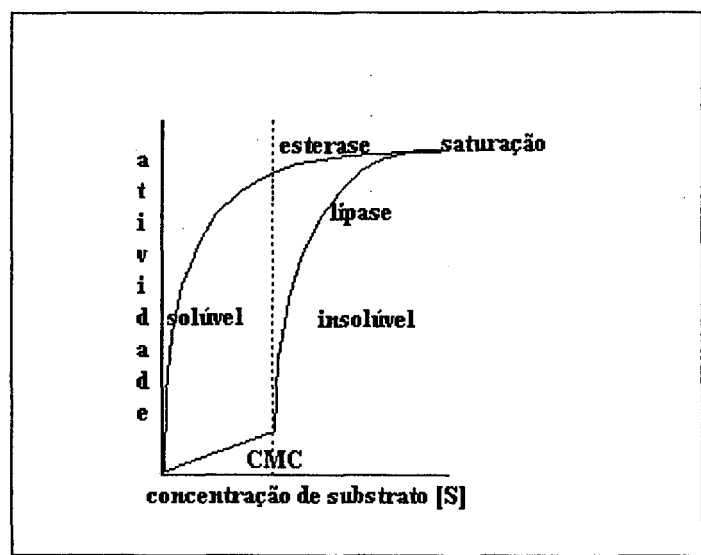


Figura 5 - Comportamento catalítico das lipases

O fato de que lipases não hidrolisam substratos abaixo da concentração micelar crítica (CMC), mas exibe uma alta atividade acima dela tem sido chamada de ‘ativação interfacial’⁴.

Atualmente, já se conhece a estrutura de algumas lipases. A lipase do fungo da *Rhizomucor (mucor) miehei* foi uma das primeiras a ter desvendada a sua estrutura, através de técnicas de cristalografia de raio X.³⁰ É conhecida comercialmente como lipase da *Mucor miehei*, e sua estrutura é composta de 269 resíduos de aminoácidos, sendo que

seu sítio ativo é constituído pelos resíduos Asp.203, His.257 e Ser.144. A lipase *Pancreatica* possui resíduos de serina, histidina e um grupo carboxilato para sua atividade catalítica. Enquanto que a lipase *da Humicola Lanuginosa* requer histidina, tirosina e um grupo carboxilato para a sua atividade, a lipase de *Geontrium candidum* não apresenta nenhum resíduo de serina reativo.³¹

A estrutura cristalina da maioria das lipases conhecidas tem revelado a presença de uma triade de Ser-His-Asp ou Ser-His-Glu no sítio catalítico. Lang e col.³² em estudos recentes mostraram que a lipase de *Chromobacterium viscosum* (CVL) exibe seletividade 1,3 para trioleínas, sendo altamente ativa sobre ampla faixa de pH (4-11) e temperatura (25 - 70°C). Devido à esta extraordinária estabilidade, a CVL é utilizada como biocatalisador para óleos e gorduras industriais. A enzima consiste de 319 resíduos de aminoácidos com apenas uma ponte de dissulfeto.

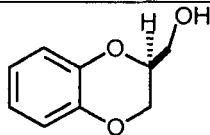
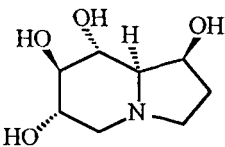
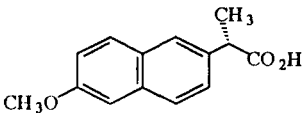
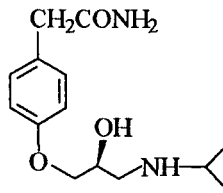
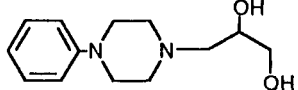
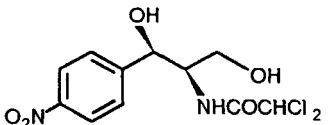
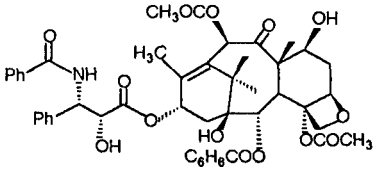
1.4.2. Aplicações de Lipases em Meio Orgânico

Muitos dos estudos para a utilização de lipases em síntese orgânica tem envolvido conversão assimétrica, um dos temas centrais da síntese orgânica moderna.⁹ A indústria farmacêutica tem demonstrado grande interesse nesta área, visto que a atividade biológica de muitas drogas racêmicas muitas vezes reside em um único enantiômero. Sintetizar tais drogas em sua forma enantiomericamente pura, está se tornando um caminho importante na química da biotransformação. A **Tabela 1** mostra exemplos de algumas drogas que tem sido resolvidas por catálise enzimática.³³⁻³⁹

Álcoois e ácidos carboxílicos quirais são excelentes compostos para serem utilizados em síntese orgânica por causa de sua versatilidade química e facilidade de conversão para outra classe de compostos.

A resolução de álcoois racêmicos tem sido feita explorando as propriedades enantiosseletivas de enzimas hidrolíticas.^{40,41} Os álcoois opticamente ativos podem ser obtidos em soluções aquosas por hidrólises estereosseletivas dos correspondentes ésteres racêmicos,⁴²⁻⁴⁶ por esterificações em solvente orgânico⁴⁷⁻⁵¹ e por transesterificações dos

Tabela 1 - Exemplos de algumas drogas resolvidas via catálise enzimática

Compostos	Aplicação	Ref.
 <p>1,4-benzodioxano</p>	agente cardiovascular	(33)
 <p>Castanospermina</p>	combate ao câncer inibidor do virus HIV	(34)
 <p>Naproxen</p>	agente anti-inflamatório	(35)
 <p>Atenolol</p>	tratamento da hipertensão e angina	(36)
 <p>Dropropizina</p>	agente anti-tussígeno	(37)
 <p>Cloranfenicol</p>	agente anti-microbial	(38)
 <p>Taxol</p>	combate ao câncer	(39)

correspondentes álcoois racêmicos.⁵¹⁻⁵⁷ 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.

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.⁵⁸⁻⁶⁵

1.4.3 Importância da Resolução de Ácidos Racêmicos

Muitos ácidos orgânicos opticamente ativos possuem propriedades de grande interesse industrial como o ácido (R)-2-cloropropiônico devido ao seu grande valor como intermediário na síntese de vários herbicidas importantes comercialmente.⁶⁶

Ácidos terpênicos quirais são materiais de partida comuns para a síntese de feromônios com substituintes tais como metil, isopropil e isopropenil. A Figura 6 mostra alguns feromônios que podem ser obtidos a partir do ácido (R) - (+) - citronílico.⁶⁷

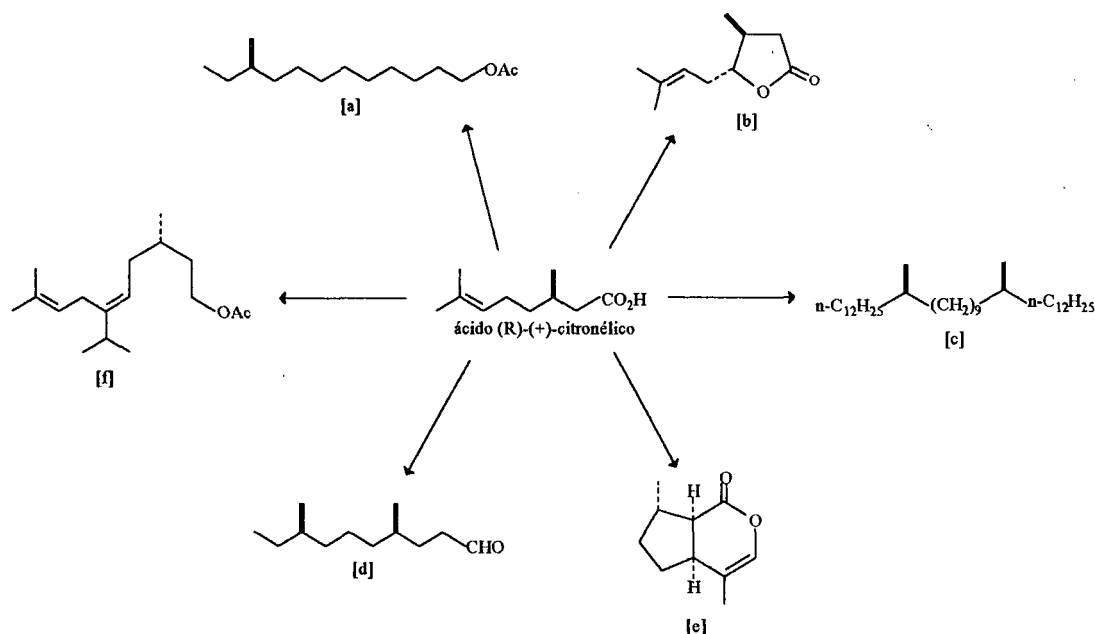
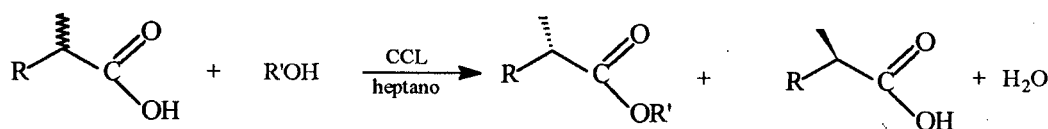


Figura 6 - Alguns feromônios sintetizados a partir do ácido (R)-(+)-citronílico. [a] componente do feromônio de *Adoxophyes sp*, [b] componente do feromônio de *Eldana saccharina*, [c] feromônio sexual da mosca *Glossina palladipes*, [d] feromônio de agregação produzido pelo besouro, *Tribolium castaneum*, [e] componente do feromônio de *Megoura viciae*, [f] feromônio sexual da *Aonidiella citrina*.

Ácidos 2-metil-alcanóicos e seus derivados de alta pureza enantiomérica tem sido utilizados como intermediários sintéticos na presença de, entre outros compostos, um grande número de feromônios estereoquimicamente puros. A presença de uma pequena quantidade do outro enantiômero, em alguns feromônios, pode causar um efeito inibitório pronunciado.⁶⁷ Ácidos 2-metil-alcanóicos de cadeia curta e seus ésteres também ocorrem naturalmente em vários alimentos contribuindo significativamente para o seu aroma.⁶⁸

Engel⁶⁸ tem dado ênfase à importância da esterificação enantiosseletiva, catalisada por lipases, dos ácidos 2-metil-alcanóicos nos últimos anos, devido à sua utilidade na síntese de compostos biologicamente ativos. Segundo Engel, a necessidade para obtenção de ácidos 2-metil-alcanóicos com alta pureza enantiomérica é refletida pelas várias tentativas de suas síntese assimétricas. A resolução cinética dos ácidos racêmicos e ésteres, respectivamente, por método de reações enantiosseletivas catalisada por lipases, pode ser uma alternativa útil para a sua produção (**Esquema II**).



CCL = Lipase de *Candida cylindracea*

Esquema II

Gu e col.³⁵ tem demonstrado a importância dos ácidos 2-aryl-propiónicos como uma classe de drogas anti-inflamatória não esteroidais utilizadas no tratamento de artrite e doenças do tecido conectivo. No caso do naproxen, o isômero S(+) mostrou ser 28 vezes mais reativo do que o isômero R(-). A atividade antiinflamatória dessas drogas está geralmente associada com o enantiômero S, que é obtido via método de resolução. Recentemente, um processo de resolução foi desenvolvido para a preparação de ácidos α -metil-arylacético opticamente ativos utilizando a lipase de *Candida cylindracea*. A enzima tem enantiosseletividade S e pode tolerar altas concentrações de substratos e produtos.

Senanayake e col.⁶⁹ tem estudado a resolução de ácidos 2-aril-propiónicos via hidrólise enzimática utilizando a esterase do *figado de coelho* associada ao Triton X-100 (um surfactante não iônico que é usado para solubilizar o éster parcialmente), obtendo ambos enantiômeros com bons excessos enantioméricos. A resolução de outros ácidos via catálise enzimática, também tem sido descrita na literatura.⁷⁰⁻⁷²

As lipases tem sido amplamente utilizadas na preparação e resolução de diferentes aminas em meio orgânico.^{21,23,24}

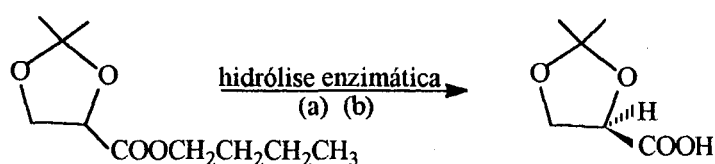
Portanto a utilização de lipase em síntese orgânica vem sendo de grande importância. Porém, a grande dificuldade ainda está em estabilizar estes catalisadores em meio orgânico para repetidos usos, uma vez que as enzimas dependendo do tipo, fonte, pureza e reações a serem utilizadas, podem se tornar um catalisador de custo elevado ao processo. A busca de uma metodologia que melhore sua estabilidade em meio orgânico faz-se necessário para que a síntese de compostos complexos que exigem vários passos possa ser otimizada.

1.5 Imobilização de Enzimas

As enzimas estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Há assim, uma necessidade de estabilizar a enzima contra inativação para utilizá-la em meio orgânico. Faz-se então necessário o emprego de um método para que a mesma não perca sua atividade catalítica e sua estereosseletividade. Frente a este problema, novas técnicas vem sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização.

A imobilização de enzimas em diferentes suportes é uma das técnicas mais importantes que vem sendo utilizada na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos.^{4,29,13,73} Por razões prática e econômica, é muitas vezes vantajoso usar enzimas imobilizadas visto que, com poucas exceções, elas são insolúveis em solventes orgânicos.⁷⁴ Uma das grandes vantagens da imobilização é poder utilizar o catalisador repetidamente sem considerável perda da atividade catalítica.⁴ Considerando a compatibilidade com a enzima, géis hidrofílicos tem sido freqüentemente empregados

como suportes enzimáticos, e as vezes a enantiosseletividade é aumentada. Um exemplo é o trabalho de Pottie e col.⁷⁵ que mostra a reação de hidrólise enzimática do (R,S) 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de n-butila utilizando a lipase do *Pâncreas do porco* (PPL) em meio orgânico (suspensão) e imobilizada em celite. O resultado final foi um aumento de 21% no excesso enantiomérico do produto de hidrólise, o ácido (R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxílico, quando a PPL esta imobilizada em celite em relação a PPL em suspensão (**Esquema III**).



(a) PPL em suspensão % ee = 50

(b) PPL em Celite % ee = 71

PPL = Lipase do *Pâncreas do porco*

Esquema III

Alguns sistemas que já foram utilizados para imobilizar enzimas são Eupergit C,⁷⁶ celite,⁷⁷ quitosana e quitina,⁷⁴ Chromosorb e Sepharose.⁷⁸⁻⁸⁰

A **Figura 7** mostra alguns procedimentos que vem sendo utilizados nos últimos anos para imobilizar enzimas.

A modificação de enzimas com polietilenoglicol que resulta em um pó solúvel em benzeno ou em hidrocarbonetos clorados, também tem sido empregada.⁸¹⁻⁸⁵ Outras técnicas que superam os problemas da baixa solubilidade dos substratos, é o uso de surfactantes e micelas reversas.⁸⁶⁻⁹⁴

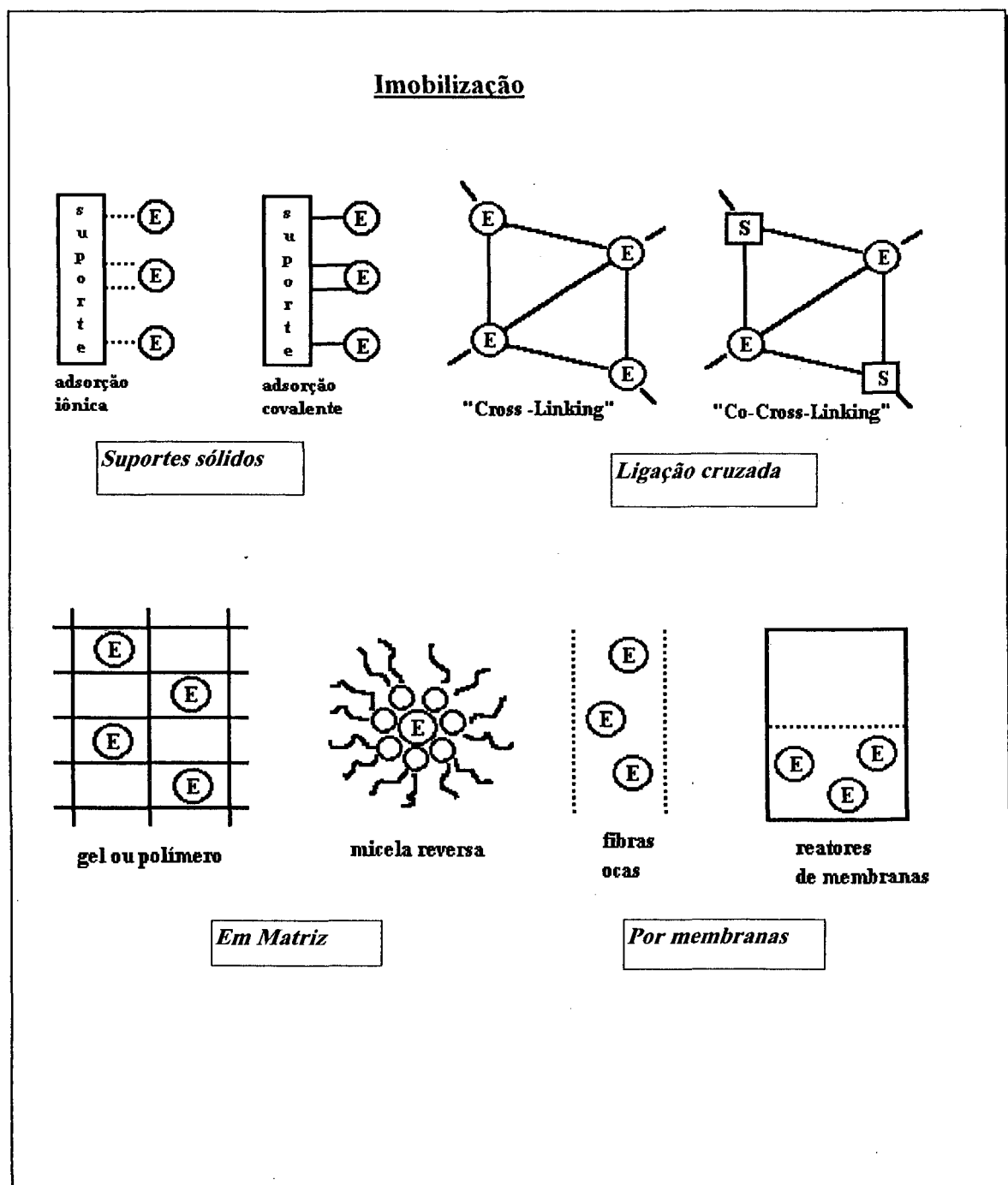


Figura 7 - Técnicas de imobilização de enzimas. E = enzima, S = suporte [ref. 4]

1.5.1 Imobilização de Enzimas em Organo-Gel

Na última década muitos estudos têm se voltado na utilização de microemulsões para a imobilização de enzimas.⁹⁵⁻¹⁰² Uma microemulsão é uma dispersão isotrópica e opticamente transparente de óleo em água (O/W) ou da água em óleo (W/O), onde o óleo é um solvente orgânico (hexano, heptano). 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.^{103,104} Como as microemulsões são sistemas organizados, elas são fáceis de serem preparadas. A estabilidade da microemulsão depende da razão da concentração de água pelo surfactante adicionado ao meio, representado por W_o , onde:

$$W_o = [H_2O] / [\text{surfactante}]$$

A gota de microemulsão pode ser efetivamente considerada como um microreator. B. H. Robinson, estudando as propriedades das microemulsões, concluiu que a sua estabilidade depende da concentração de óleo, água e surfactante presentes no meio.¹⁰¹

Haering e Luisi,¹⁰⁰ Quillet e col.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹, descreveram o efeito da solubilização de gelatina em uma microemulsão água / óleo (W/O) na formação do gel. Este foi obtido pelo resfriamento de uma solução previamente aquecida a 55°C de Aerosol-OT (sulfossuccinato sódico de bis-2-etilhexila) 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.¹¹⁰⁻¹¹⁵ A estrutura proposta para o sistema de organo-gel ou MBG (do inglês, “microemulsion-based gels”) está representada na **Figura 8**, e consiste de gotas de microemulsão aquosas em equilíbrio com uma estrutura de gelatina e água, rodeada pelo surfactante Aerosol-OT.^{112,116}

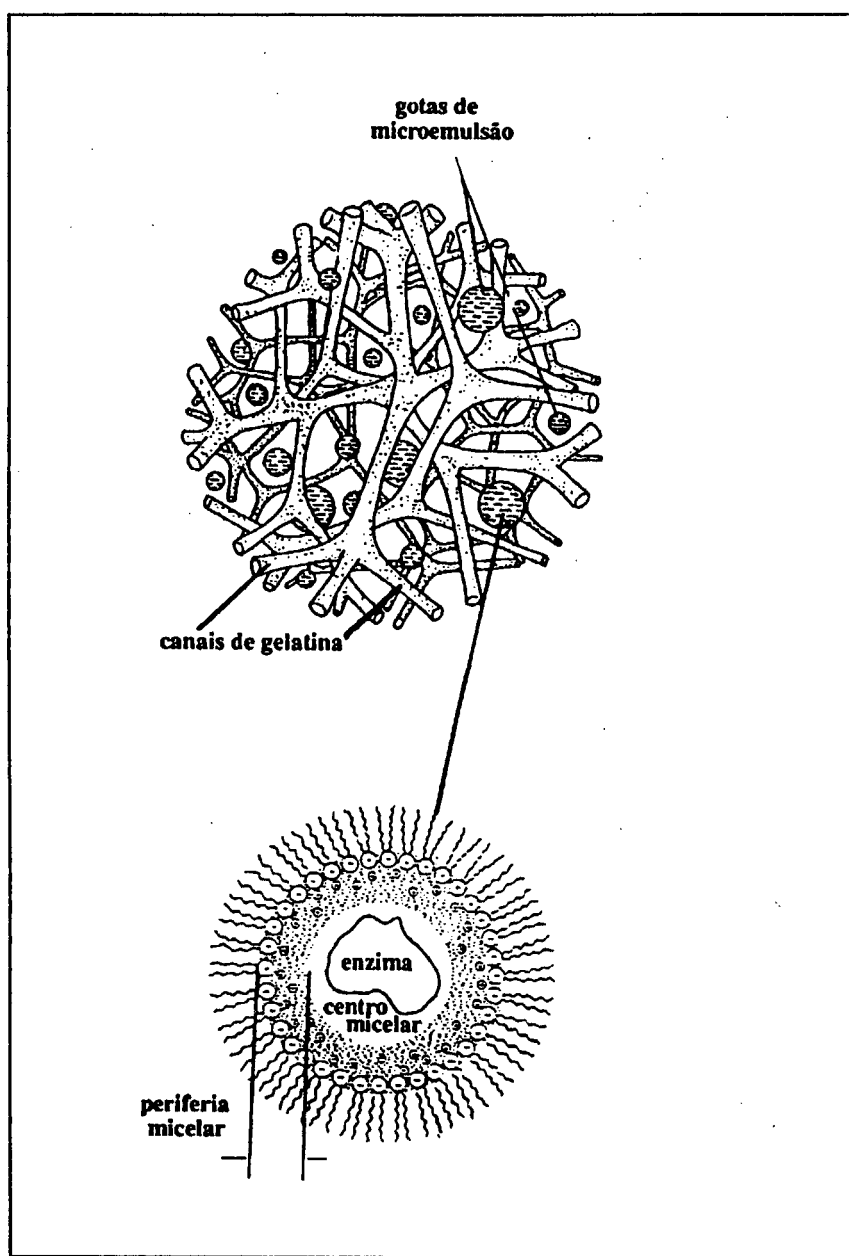


Figura 8 - Modelo proposto para a estrutura do organo-gel

Recentemente, foi demonstrado que enzimas podem ser imobilizadas no organo-gel (MBG), e utilizadas para catálise enzimática em meio orgânico.¹¹⁷⁻¹²³

O uso do sistema de organo-gel (MBG), consiste de uma nova alternativa para a imobilização de enzimas, bem como sua utilização na catálise enzimática em meio

orgânico. Neste sistema a enzima está localizada no centro micelar (centro aquoso) da microemulsão água/óleo (W/O), eliminando o tradicional problema de sua estabilização contra inativação por um solvente não-aquoso. Assim, em contraste com outros processos comumente usados, o de microemulsão gelificada (MBG) apresenta um baixo conteúdo de água e tem a vantagem de ser reprodutível, termodinamicamente estável, transparente e permitir a utilização de baixa concentração de enzima bem como a sua reutilização.

1.5.2 Imobilização de Enzimas em Crisotila

Matéria prima barata e abundante no Brasil, a crisotila, uma das principais fontes de asbesto, surge como um novo suporte de biocatalisadores. É massivamente usada na construção civil, nas indústrias de confecção de roupas e de bebidas, e tem se mostrado um excelente adsorvedor devida à uniformidade estrutural em suas fibras.

A crisotila é um silicato magnesiano hidratado do grupo das serpentinas, apresentando como fórmula molecular $Mg_3(Si_2O_5)(OH)_4$, que possui 43% de MgO, 44,1% de SiO_2 , 12,9 % de H_2O . A **Figura 9** mostra um modelo para a estrutura da crisotila.¹²⁴

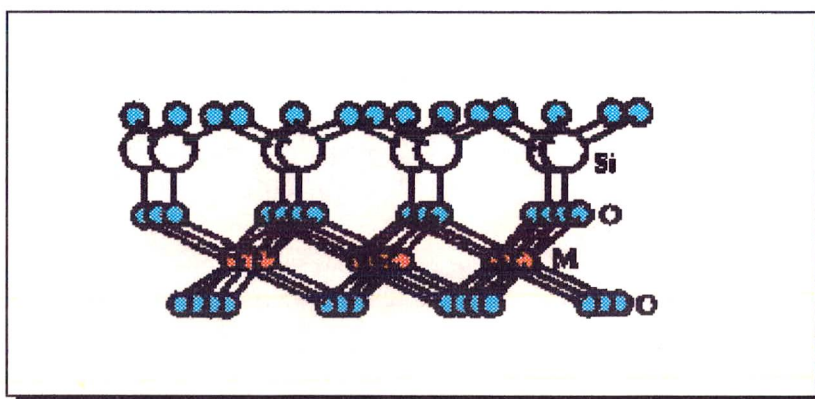


Figura 9 - Estrutura da crisotila

A estrutura da crisotila consiste de uma camada de sílica tetraédrica que é coberta com uma camada de hidróxido de magnésio (brucita). A brucita é ligada à camada de sílica

por dois dos três grupos MgO. O resultado é uma estrutura em camada como ilustrado na **Figura 10**.¹²⁵

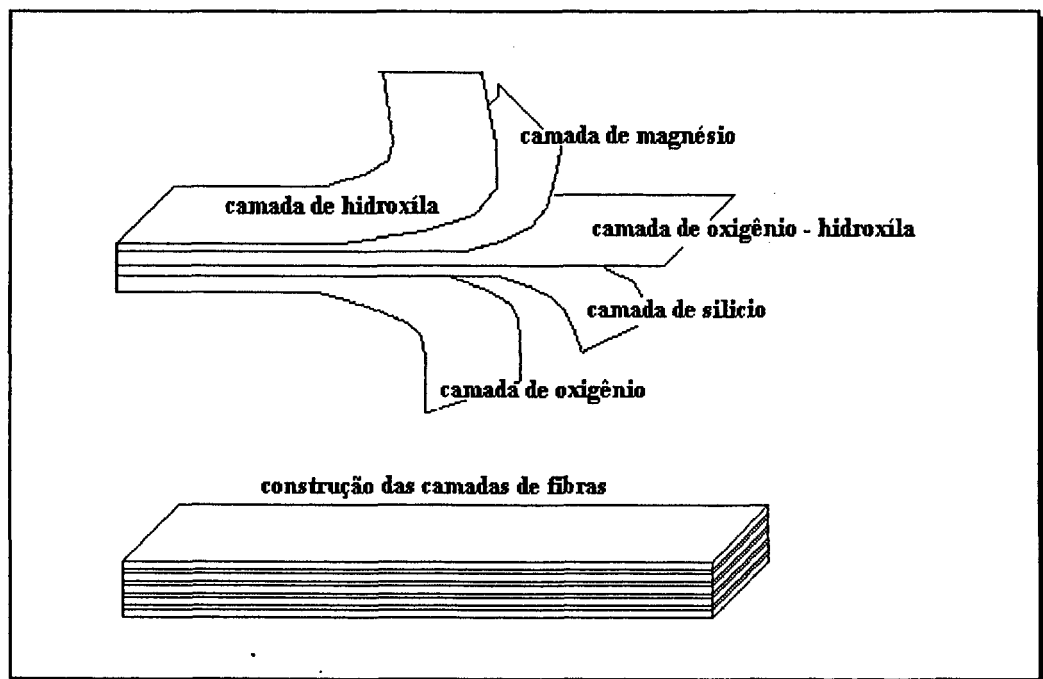


Figura 10 - Camada fundamental da estrutura da crisotila.

A crisotila por ser um silicato hidratado, está sujeita a decomposição térmica a elevadas temperaturas. Esta decomposição térmica é uma reação em dois passos, consistindo primeiro de uma fase de desidratação e em seguida uma fase de mudança estrutural. A desidratação ocorre entre 600 -780°C.¹²⁵

A **Tabela 2** mostra algumas das características mais importantes da crisotila.

Tabela 2 - Características da crisotila¹²⁶

Estrutura	Veios cross ou slip no serpentinito
Fórmula química	3MgO.2SiO ₂ .2H ₂ O
Composição	Silicato de magnésio hidratado
Hábito	Fibroso asbestiforme
Sistema cristalino	Monoclínico
Cor	Branco, esverdeado, cinza amarelado
Brilho	Sedoso
Densidade	2,4 a 2,6 (g/cm ³)
Flexibilidade	Elevada
Comprimento	Desde muito curta até aproxim. 5 cm
Tensão à tração	Alta, aproxim. 5841 Kg/cm ²
Resistência a álcalis e ácidos	Baixa
Impurezas	Ferro, cromo, níquel, cádmio
Resistência ao calor	Boa, friável a altas temperaturas

Atualmente tem-se estudado a utilização da crisotila como novo suporte para adsorção de proteínas, analisando os possíveis efeitos biológicos induzidos por estas fibras. Comerlato e col.¹²⁶ estudaram o comportamento da urease e invertase quando adsorvidas neste suporte obtendo bons resultados quanto a sua utilização como suporte.

Moran e col.¹²⁷ tem estudado a imobilização de fermento de pão em crisotila e sua aplicação na redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos como as azido-propiofenonas, obtendo-se os azido-álcoois *syn* e *anti* com bons rendimentos e excessos enantioméricos. Outros trabalhos que foram realizados utilizando fermento de pão imobilizado em crisotila são, a redução de fenilcetonas,¹²⁸ redução de α -haloacetofenonas,^{129,130} e a síntese enantiosseletiva de (R)-(-)1-fenil-etanolaminas.¹³¹

Nascimento e col.¹³² tem utilizado a crisotila na imobilização de lipases, e utilizado este suporte na esterificação de álcoois alifáticos em meio orgânico com sucesso. Portanto,

a crisotila é um suporte viável para o desenvolvimento de estudos de imobilização de biocatalisadores e sua aplicação em síntese orgânica.

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

O método mais utilizado na determinação da pureza enantiomérica de uma substância química é a rotação óptica medida num simples comprimento de onda do sódio, Hg ou outra fonte de luz, sendo esta uma propriedade física importante para o estudo de um sistema quiral, porque permite-nos fazer referência a um número comparável de dados acumulados na literatura desde 1800.¹³³ A polarimetria, assim chamada quando a identificação de um estereoisômero particular faz uso da luz polarizada, é um dos métodos clássicos espectrais para a determinação do excesso enantiomérico ou pureza óptica de uma amostra. Utilizando-se um polarímetro, determina-se o ângulo de rotação da luz polarizada provocada por uma amostra. Uma vez determinada a rotação óptica experimental, esta é convertida para rotação óptica específica pela **Equação 6**.^{133,134}

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad (\text{eq.6})$$

$[\alpha]_D^T$ = 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)

Pela rotação óptica específica da amostra, pode-se determinar a pureza ótica através da relação entre a calculada, determinada experimentalmente, e a do enantiômero puro encontrado na literatura.¹³⁴ A pureza óptica descreve a razão da mistura de

enantiômeros para aquele do enantiômero puro e é usualmente a mesma que o excesso enantiomérico, que descreve a verdadeira composição.

Um método altamente atrativo para a análise de reações assimétricas é baseada na resolução de misturas enantioméricas por cromatografia gasosa.¹³³ A comparação relativa da área dos picos fornece uma medida precisa da composição enantiomérica (ee). O método, com o qual se pode trabalhar adequadamente com quantidades de amostras pequenas, é independente da magnitude da potência rotatória óptica e não é afetada por impurezas. Os méritos da cromatografia gasosa, em geral, são rapidez, sensibilidade e simplicidade. Para a resolução de enantiômeros em particular, são a alta resolução, precisão e reprodutibilidade. Os pré-requisitos do uso de cromatografia gasosa como uma ferramenta analítica em síntese assimétrica são volatilidade dos substratos, estabilidade térmica e boa resolução, restringindo seu uso geral.^{133,135,136,137}

A resolução de misturas enantioméricas por cromatografia gasosa pode ser realizada de dois modos:¹³³

- a) Pela conversão dos enantiômeros em derivados diastereoisoméricos pela reação química com um agente de resolução quiral auxiliar, enantiomericamente puro, e subsequente separação por cromatografia gasosa dos diastereoisômeros resultantes em uma fase estacionária aquiral.
- b) Resolução direta dos enantiômeros em uma fase estacionária quiral contendo um agente de resolução auxiliar de alta pureza enantiomérica.

Esses métodos são realmente nada mais que variações da aproximação clássica de Pasteur para a resolução via cristalização de sais diastereoisoméricos.¹³³

Além da cromatografia, o método de RMN também tem sido muito utilizado atualmente na determinação da razão enantiomérica.¹³⁸⁻¹⁴² No método de RMN os parâmetros são as mudanças não equivalentes de sinais selecionados de grupos diastereotópicos e a relativa intensidade desses sinais. Para discriminar entre grupos enantiotópicos em misturas enantioméricas eles devem ser transformados externamente em diastereotópicos por exemplo, pelo uso de reagentes de mudança quiral lantanídeos ou solventes quirais. Alternativamente, uma mistura enantiomérica é convertida para um par de diastereoisômeros com um reagente derivatizante quiral apropriado, e então os grupos

enantiotópicos na amostra original são observados como grupos diastereotópicos por comparação interna.¹⁴²

Portanto, determinação da pureza enantiomérica usando RMN, requer o uso de um auxiliar quiral que converta a mistura de enantiômeros em uma mistura de diastereoisômeros.

Existem três classes de auxiliares quirais:

a) Reagentes de deslocamento quiral de Lantanídeos: A resolução ocorre via a formação de um complexo fraco heptacoordenado. A **Tabela 3** mostra alguns dos reagentes de deslocamento quiral de lantanídeos mais utilizados.^{133,142}

Tabela 3 - Reagentes de deslocamento quiral de lantanídeos.

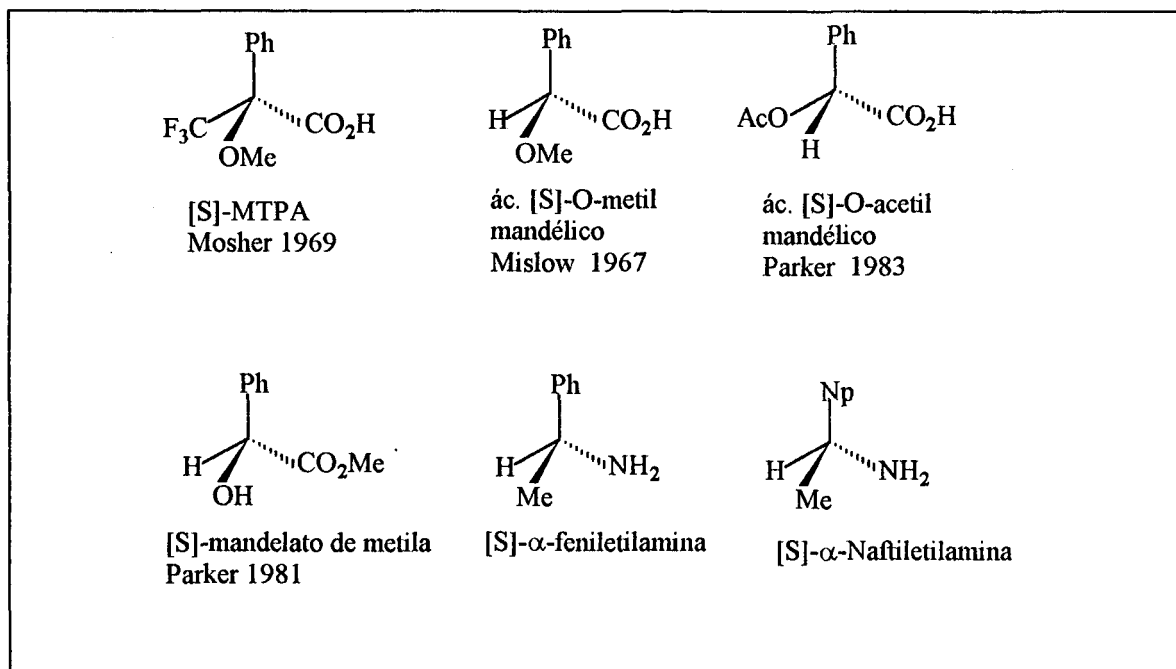
estrutura de L em LnL ₃	Lantanídeos	abreviação ^a
	Eu	Eu[pvc] ₃
	$\left[\begin{array}{l} \text{Eu} \\ \text{Pr} \\ \text{Yb} \end{array} \right.$	$\left[\begin{array}{l} \text{Eu}[\text{tfc}]_3 \\ \text{Pr}[\text{tfc}]_3 \\ \text{Yb}[\text{tfc}]_3 \end{array} \right.$
	Eu	Eu[hfc] ₃
	$\left[\begin{array}{l} \text{Pr} \\ \text{Yb} \end{array} \right.$	$\left[\begin{array}{l} \text{Pr}[\text{hfc}]_3 \\ \text{Yb}[\text{hfc}]_3 \end{array} \right.$
	Eu	Eu[dcn] ₃

(a) pvc = pivaloil-d-canforato; tcf = trifluorohidroximetileno-de-canforato; hfc = heptafluorohidroximetileno-d-canforato; dcm = dicamfoil-d-metanato.

b) Agentes solvatantes quirais: Formam complexos de solvatação distereoisoméricos *in situ* com substratos enantioméricos via equilíbrio rápido e reversível em competição com o solvente. São exemplos a α - metilbenzilamina e a α - naftiletilamina. Somente uma faixa limitada de cosolventes podem ser usados. Solventes não polares (CDCl_3 , CCl_4 , C_6D_6) tendem a maximizar as diferenças entre complexos diastereoisoméricos, enquanto solventes polares solvatarão preferencialmente o soluto, e $\Delta\delta$ cai para zero.¹⁴⁰

c) Agentes derivatizantes quirais: Consiste na reação de enantiômeros com compostos enantiomericamente puros. Esta técnica é a mais amplamente utilizada para a determinação de pureza enantiomérica por RMN. A **Tabela 4** ilustra alguns dos reagentes mais utilizados como agentes derivatizantes quirais.¹⁴²

Tabela 4 - Alguns agentes derivatizantes quirais comuns para análise de RMN de ^1H e ^{19}F .



O método de RMN para a determinação da composição enantiomérica é um método absoluto, e não requer que o composto em análise seja previamente resolvido.

1.7 Justificativa do Trabalho

Uma das grandes dificuldades e desafio no campo da química moderna é a produção de compostos opticamente ativos. A importância desta área tem crescido nos últimos anos porque compostos quirais estão sendo comercialmente mais úteis, onde somente um dos enantiômeros é biologicamente ativo. Uma ferramenta poderosa para a preparação de moléculas orgânicas complexas é o uso de enzimas. Enzimas como catalisadores tem notáveis propriedades mas uma característica faz delas especialmente valiosas para síntese orgânica: elas são seletivas.³⁴

Klibanov e col.¹⁴³ demonstraram o aumento do emprego de enzimas em solventes orgânicos. Isto é refletido nas publicações recentes no período entre 1967 a 1991, indo de uma média de 10 publicações/ano para 180 publicações/ano. Este número crescente de publicações é um reflexo da necessidade de explorar enzimas como catalisadores em síntese orgânica (**Figura 11**). Atualmente percebe-se que o número de publicações/ano já ultrapassou a casa das 200.

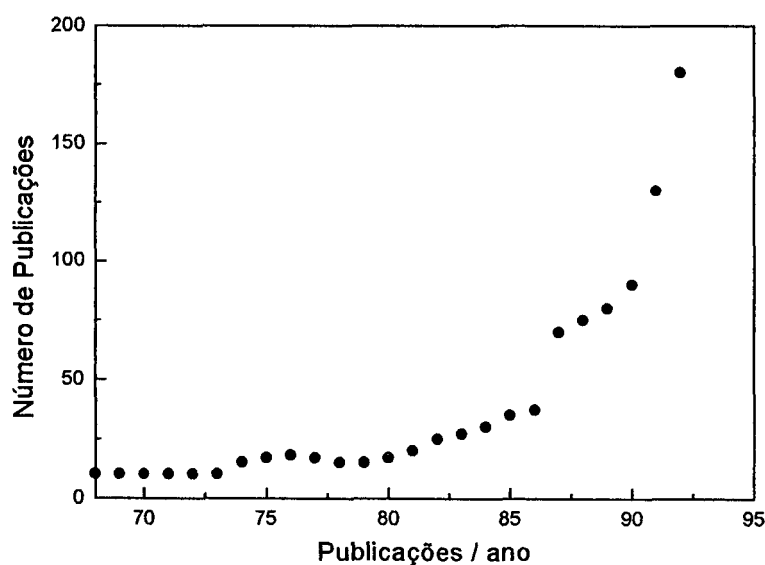
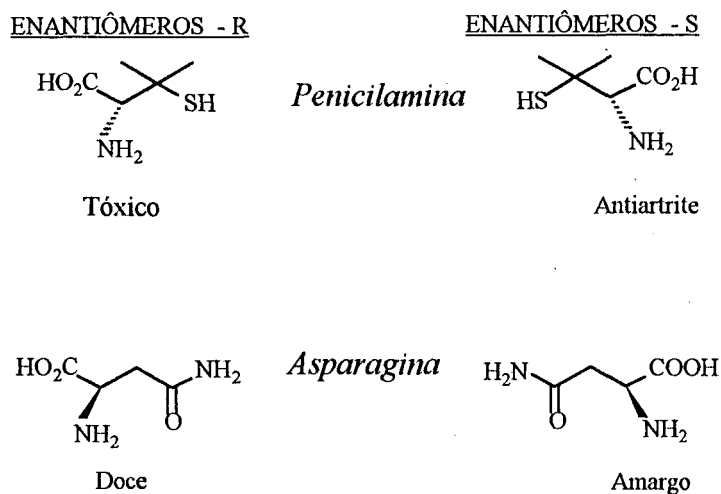


Figura 11 - Número de publicações sobre utilização de enzimas em solventes orgânicos
[ref. 143].

Álcoois e ácidos carboxílicos quirais são excelentes compostos para serem utilizados em síntese orgânica por causa de suas versatilidades química e facilidade de

conversão para outras classes de compostos. Além do mais, álcoois secundários quirais, ácidos carboxílicos, ésteres e lactonas ocorrem amplamente na natureza como flavorizantes de alimentos. Em muitos casos, somente um dos enantiômeros é responsável pelo aroma e sabor (Esquema IV).⁴



Esquema IV

Infelizmente, menos do que 10% de compostos orgânicos cristalizam como um conglomerado (o restante forma cristais racêmicos) oferecendo a possibilidade de separação de seus enantiômeros por técnicas simples de cristalização tal como “semeando” uma solução supersaturada do racemato com cristais de um enantiômero puro.⁴

O princípio da síntese assimétrica faz uso de reagentes auxiliares enantiomericamente puros que são utilizados como catalisadores ou as vezes em quantidades estequiométricas. Eles são muitas vezes caros e não podem ser recuperados em muitos casos.

A necessidade de estabilizar a enzima contra a inativação para utilizá-la em meio orgânico está sendo um dos pontos de pesquisa na área de biocatalisadores. Muitas técnicas vem sendo empregadas apresentando vantagens e desvantagens em suas aplicações, sendo que o organo-gel parece ser um método eficiente para tal aplicação.

Em particular, o sistema de organo-gel oferece a perspectiva para conduzir biocatálises em solvente orgânico apolar em que a máxima atividade da enzima está unida

com o uso de mínimas quantidades de catalisador reutilizável. Isto é potencialmente importante para a prática em larga escala em sistemas de reações biocatalisadas enantiosseletivamente para propósitos de resolução e separação de isômeros ópticos.

Enzimas imobilizadas em organo-gel oferecem excitantes possibilidades para biosínteses, reações orgânicas catalisadas por enzimas em um meio orgânico e a larga escala de resolução enantiomérica de isômeros ópticos entre outros. O uso do organo-gel para imobilização de enzimas para tais aplicações em solvente orgânico sobrepuja muitas das dificuldades previamente encontradas quando se utiliza 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, imobilização em suportes sólidos) em tais situações. Em particular, o organo-gel oferece vantagens significantes em termos do fato de que seu uso facilita a recuperação do produto desejado da reação bem como a reutilização do mesmo. A enzima neste sistema está imobilizada de forma econômica.¹⁴⁴

Outro método de imobilização de biocatalisadores que começou a ser recentemente explorado para síntese orgânica é utilizando a **crisotila**. Matéria prima barata e abundante no Brasil, a crisotila pode ser mais uma alternativa útil para os químicos sintéticos poderem imobilizar biocatalisadores e aplicá-los em seus métodos de síntese.

Como contribuição para o emprego de biocatalisadores em meio orgânico, cabe-nos avaliar e classificar novos métodos de imobilização de biocatalisadores, afim de otimizar condições para o emprego dos mesmos na síntese orgânica moderna.

Estudos para melhor compreender como estes biocatalisadores atuam, utilizando modelos, vem sendo desenvolvidos nos últimos anos. Novos métodos de biologia molecular e microbiologia industrial eventualmente conduziram a uma grande variedade de enzimas mais baratas para o mercado.^{34,145}

Portanto, a importância do estudo de métodos de aplicação de biocatalisadores em síntese orgânica é atualmente uma área de grande relevância.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

Explorar novos métodos de imobilização de enzimas que garanta a estabilidade, atividade e estereosseletividade das mesmas em meio orgânico, com aplicações na obtenção de compostos intermediários de interesse industrial.

1.8.2 Objetivos Específicos

- 1.8.2.1 Imobilizar enzimas em organo-gel e crisotila e avaliar sua atividade catalítica e estabilidade.
- 1.8.2.2 Fazer estudos cinéticos da adsorção da lipase de *Candida cylindracea* em crisotila a diferentes temperaturas.
- 1.8.2.3 Estudar a resolução dos ácidos racêmicos (\pm)-2 e (\pm)-3-metil-alcanóicos, (\pm)-2 etil-hexanóico, (\pm)-2-bromo-alcanóicos e ácidos mais complexos como (\pm)-citronélico, (\pm)-2-(p-clorofenoxi)-propiônico, (\pm)-canforcarboxílico e o D,L-mandélico com diferentes álcoois alifáticos via esterificação catalisadas por enzimas imobilizadas em organo-gel e crisotila .
- 1.8.2.4 Explorar novas técnicas para determinação do excesso enantiomérico dos substratos racêmicos, como por exemplo colunas quirais de β -ciclodextrinas.
- 1.8.2.5 Comparar estes métodos de imobilização de enzimas aplicados na resolução de ácidos racêmicos com outros de imobilização ou suspensão, em meio orgânico, já explorados na literatura.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais e Métodos

As enzimas utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram lipase de *Candida cylindracea* (CCL) (Sigma Chemical CO) tipo VII com atividade específica de 1010 unidades/mg de sólido, lipase de *Chromobacterium viscosum* (CVL ou C.V. lipase) (Genzyme Biochemical Ltd), com atividade específica de 3970 unidades/mg de sólido. Foram utilizados solventes e substratos comerciais, purificados quando necessário. Os ácidos (±)-2-metil-pentanóico, (±)-3-metil-pentanóico, 4-metil-pentanóico, (±)-2-metil-hexanóico, (±)-2-bromo-pentanóico, (±)-2-bromo-hexanóico, (±)-2-bromo-octanóico foram fornecidos pela Aldrich enquanto os ácidos (±)-citronélico, D.L-mandélico, (±)-canforcarboxílico, (±)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico, (±)-2-etil-hexanóico foram fornecidos pela Sigma. O ácido (±)-2-metil-butanóico foi fornecido pelo grupo de pesquisa do professor J. T. B. Ferreira*, UFSCar. 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 fornecidos pela Sigma. A sílica para cromatografia em coluna (70-230 mesh) e em placa foi fornecida pela Merck. As vidrarias foram da Pyrex, e os demais reagentes utilizados de foram pureza analítica. A crisotila do tipo 5RL foi de procedência da Mina Sama (Goiás). O ultra-som foi da marca Thornton e para realizar as reações foi utilizado um banho termostaticado tipo Dubnoff TE 093 da Tecnal. O MEV- Microscópio Eletrônico de Varredura foi Philips modelo XL 30.

2.2 Caracterização dos Compostos

Os compostos foram caracterizados por técnicas de espectroscopia. Os espectros de infravermelho foram feitos utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo FT-IR 16PC. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram feitos em um espectrofotômetro Bruker AC 200 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Estudos cinéticos foram realizados em um espectrofotômetro modelo Beckman DU-65 e um HP 8452A. As

* *in memoriam*

medidas de rotação óptica foram determinadas em um polarímetro modelo Polartronic E da Schmidt e Haensch. Os índices de refração foram medidos em um refratômetro Carl Zeiss Jena. Quando necessário foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo Shimadzu GC - 14B e um GC/MS Varian 3000 com coluna de Lipodex E [octakis (3-O-butiril-2,6-di-O-pentil) γ -ciclodextrina] do Departamento de Química da UFSM, RS.

2.3. Enzimas Imobilizadas em Organo-gel

2.3.1. Preparação do Organo-gel

O organo-gel (MBG) foi preparado pela adição de uma solução de Aerosol-OT em hexano a 55°C à uma segunda solução de gelatina em água também a 55°C. 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 na solução de Aerosol-OT. Após estabilização a temperatura ambiente, os géis foram armazenados em “freezer” por 24h no mínimo para serem utilizados nas reações (Figura 12). Géis controle, isto é, sem enzima imobilizada também foram preparados.¹¹⁶

120

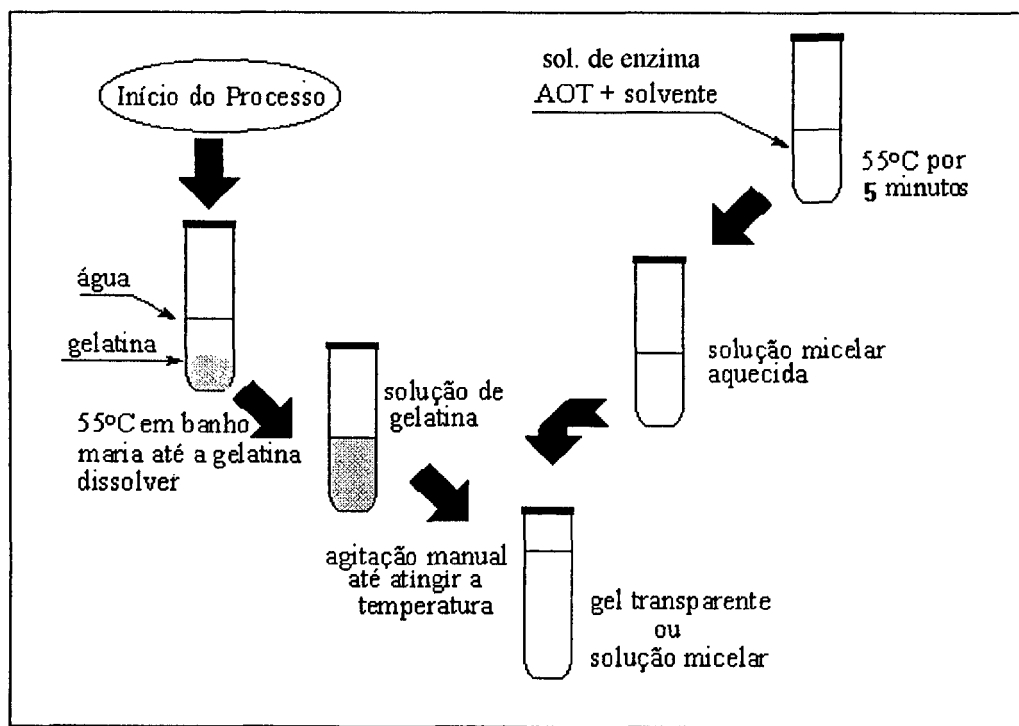


Figura 12 - Preparação do organo-gel

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 25 mL de hexano, estando assim prontos para serem utilizados nas reações em meio orgânico (Figura 13).

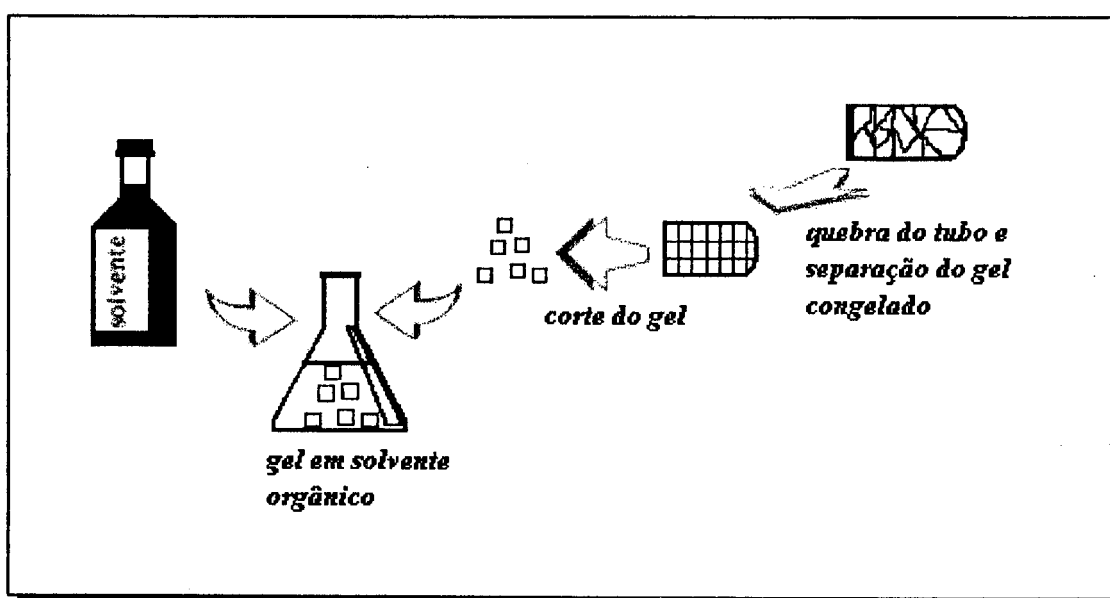


Figura 13- Preparação do meio reacional do sistema organo-gel

2.4. Enzimas Imobilizadas em Crisotila

Com o objetivo de conhecer melhor como se comporta a adsorção de lipases em crisotila, inicialmente foram feitos estudos de adsorção da lipase de *Candida cylindracea* (CCL) neste suporte. Foi seguida a metodologia empregada por Comerlato no estudo da adsorção da urease e invertase em crisotila.¹²⁶

2.4.1 Preparação do Suporte Crisotila

O tratamento da crisotila foi o mesmo descrito por Comerlato.¹²⁶ A crisotila bruta foi colocada em uma peneira e lavada com jatos de água de torneira até a mesma sair com aparência limpa*. A crisotila foi então filtrada a vácuo e logo a seguir foi colocada em um recipiente com solução tampão fosfato pH 7,2 (mistura de Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , 0,07M; $\mu = 0,28$) e levada ao ultra-som onde permaneceu por aproximadamente 45 minutos. Novamente, foi filtrada a vácuo e seca em estufa a 120°C por 5 horas.

Após o tratamento, a crisotila foi utilizada nos estudos cinéticos de adsorção e posteriores aplicações em reações de esterificação enantiosseletivas de ácidos racêmicos em meio orgânico (**Figura 14**).

* Segundo Comerlato, a crisotila tal como é vendida comercialmente, apresenta-se com uma certa quantidade de pó de rocha aderida às fibras, bem como pó de fibra, prejudicando a sua qualidade. O processo de purificação e fibrilização para a crisotila brasileira tipo 5RL tem a finalidade de eliminar estas impurezas e aumentar o grau de fibrilização dos feixes de crisotila.

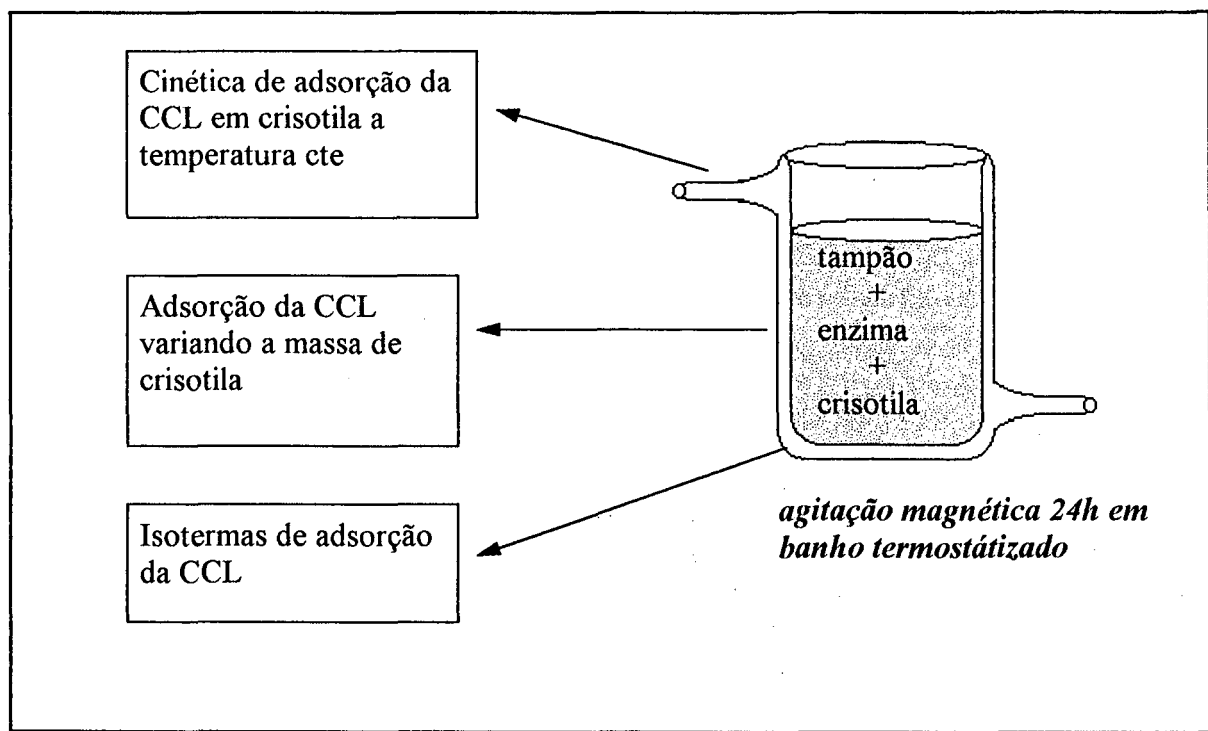


Figura 14 - Estudos realizados com a crisotila.

2.4.2. Cinética de Adsorção da CCL em Crisotila.

A enzima utilizada para estudo de adsorção na crisotila foi a CCL.

Inicialmente foi preparada uma curva de calibração da CCL, cujo $\lambda_{\text{máx.}}$ é 258 nm, em solução aquosa tamponada (tampão fosfato, pH 7,2, 0,07M, $\mu=0,28$) para ser utilizada no experimento a seguir.

1g de crisotila tratada foi colocada em um Erlenmeyer e adicionado 200 mg de lipase e 100 mL de tampão fosfato pH=7,2, 0,07M. As amostras foram colocadas em um banho termostatizado tipo Dubnoff com agitação. Aliquotas foram tiradas em tempos pré-determinados, centrifugadas para eliminar traços de crisotila presente, A seguir 250 μ L desta solução foi transferida para uma cubeta de UV e adicionado mais 3 mL de tampão fosfato. Foram feitas leituras da absorvância das alíquotas em tempos pré-determinados. Com a ajuda da curva de calibração preparada previamente, foi determinada a quantidade

de enzima adsorvida em crisotila em função do tempo. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 21, 25, 30 e 35°C.

2.4.3 Estudo da Adsorção da CCL em Função da Massa de Crisotila.

Foram pesadas diferentes massas de crisotila previamente tratada, entre 0,5 a 1g, e colocadas em um Erlenmeyer de 125 mL. Em cada amostra adicionou-se 10 mL de solução de CCL 0,5 mg/mL em tampão fosfato pH=7,2, 0,07M e termostaticada em um banho tipo Dubnoff a 25°C por 2 horas. Separou-se a crisotila com enzima do sobrenadante por peneiramento e então centrifugou-se o sobrenadante. Seguindo o mesmo procedimento anterior, fez-se a leitura da absorvância em 258 nm da CCL livre e por diferença determinou-se a quantidade de enzima adsorvida nas diferentes amostras de crisotila. As amostras de crisotila/enzima foram lavadas na própria peneira com 10 mL do mesmo tampão para verificar se ocorreu dessorção de enzima da crisotila.

2.4.4. Isotermas de Adsorção da CCL em Crisotila.

Em diferentes Erlenmeyers de 125 mL foram adicionadas 1g de crisotila tratada e 25 mL de solução de CCL em diferentes concentrações (0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 mg/mL) em meio tamponado (tampão fosfato, pH 7,2, 0,07M). As amostras foram colocadas em um banho termostaticado (25 e 30°C) e agitado moderadamente por 2 horas*. O experimento foi repetido com o controle (1g de crisotila e 25 mL de tampão fosfato). Novamente separou-se a crisotila do sobrenadante por peneiramento e lavou-se as amostra conforme procedimento anterior. O sobrenadante foi centrifugado, e então foram feitas leituras da absorvância para determinar a quantidade de proteína adsorvida. Uma vez determinada a quantidade de enzima adsorvida em crisotila, determinou-se a quantidade que ficou em equilíbrio e aplicou-se as equações de Langmuir e Freundlich para determinar o comportamento da isoterma de adsorção.¹⁴⁶

* Este tempo foi baseado nos resultados da cinética de adsorção que mostrou que 2 horas é o tempo mínimo para que o equilíbrio seja atingido.

2.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram feitas micrografias da crisotila tratada com tampão fosfato pH 7,2 com e sem CCL adsorvida com o objetivo de observar a superfície e morfologia da amostra.

As amostras foram fixadas no estabe com cola, secas a vácuo e submetidas em um banho de ouro, em um metalizador modelo P-S2 Diode Sputtering System fabricado pela ISI (International Scientific Instruments), antes de serem fotomicrografadas num microscópio eletrônico de varredura Philips modelo XL 30 do Laboratório de materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

2.5 Resolução dos Ácidos Racêmicos

Procedimento geral:

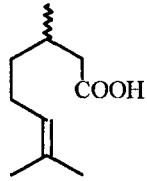
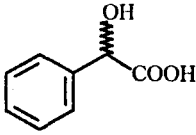
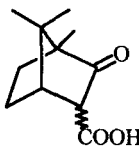
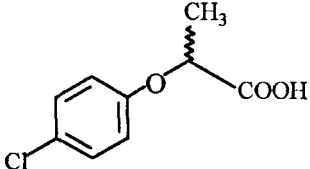
Foram utilizados os ácidos descritos nas Tabelas 5 e 6 para os estudos de resolução via reação de esterificação catalisadas por enzima imobilizada em organo-gel e/ou crisotila.

Tabela 5 - Ácidos racêmicos utilizados no trabalho^a.

Composto	Substratos utilizados no trabalho	Nomenclatura
1	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	ácido (±)-2-metil-butanóico
2	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	ácido (±)-2-metil-pentanóico
3	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	ácido (±)-3-metil-pentanóico
4	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	ácido 4-metil-pentanóico
5	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CHCOOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	ácido (±)-2-metil-hexanóico
6	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CHCOOH} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	ácido (±)-2-etil-hexanóico
7	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{Br} \end{array}$	ácido (±)-2-bromo-pentanóico
8	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{Br} \end{array}$	ácido (±)-2-bromo-hexanóico
9	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CHCOOH} \\ \\ \text{Br} \end{array}$	ácido (±)-2-bromo-octanóico

(a) Na série acima mencionada o ácido 4-metil-pentanóico (4) é o único que não é racêmico.

Tabela 6 - Ácidos racêmicos utilizados no trabalho.

Composto	Substratos utilizados no trabalho	nomenclatura
10		ácido (±)-citronélico
11		ácido D,L-mandélico
12		ácido (±)-canforcarboxílico
13		ácido (±)-2-(p-clorofenoxi) propiônico

As reações de esterificação foram realizadas adicionando em um Erlenmeyer de 125 mL, 25 mL de hexano, quantidades equimolares dos reagentes (geralmente 0,03 mol) e 20g do gel contendo 5 mg de lipase de *Chromobacterium viscosum* imobilizada ou 1g de crisotila contendo 140 mg de lipase de *Candida cylindracea* adsorvida (**Figura 15**).

As reações foram agitadas em um banho tipo Dubnoff termostatizado a 25°C (**Figura 16**), acompanhadas através de análises de cromatografia de camada delgada (ccd) e RMN de ^1H , de 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 21 dias. Os ésteres foram isolados por cromatografia em coluna com sílica gel 60 (70-230 mesh) utilizando como eluente hexano:acetato de etila (15:1). A hidrólise básica dos ésteres obtidos forneceu os ácidos correspondentes. Os excessos enantioméricos foram determinados por comparação da rotações ópticas específicas dos ácidos determinados experimentalmente com os valores citados na literatura.¹⁴⁷ Os ésteres e ácidos provenientes das reações foram caracterizados

por espectroscopia de infra-vermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , índice de refração (n_D) e ponto de ebulição, além de medidas de rotação óptica.

Todas as reações foram efetuadas nas mesmas condições experimentais utilizando géis controle sem enzima imobilizada, e crisotila sem enzima adsorvida, não observando reação nos períodos nos quais se realizaram os experimento.

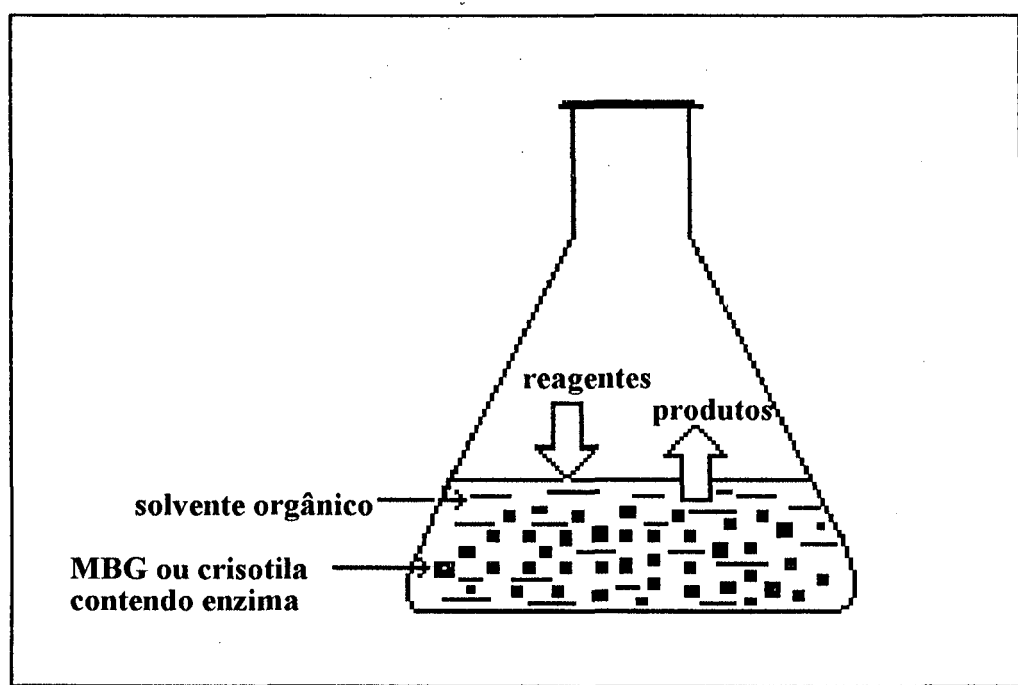


Figura 15 - Sistema de organo-gel (MBG) e/ou crisotila utilizado para realizar as reações de esterificação.

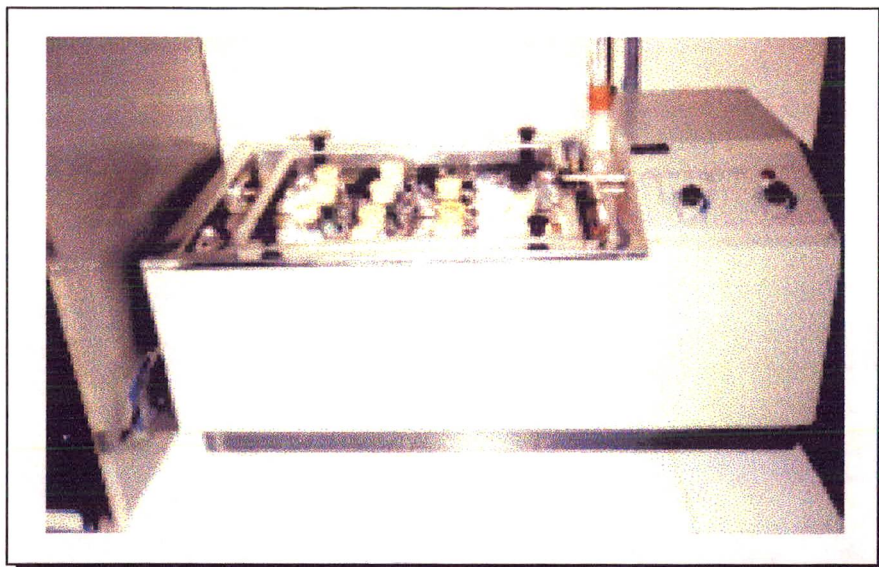


Figura 16 - Dubnoff TE 093 da Tecnal termostatizado, utilizado nas reações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

1º Parte: *Estudo da adsorção da CCL em crisotila.*

2º Parte: *Resolução dos ácidos racêmicos.*

Os estudos de imobilização de lipases em organo-gel já estão de certa forma bem documentados, com modelos propostos para o comportamento do mesmo em meio orgânico.^{102,116-121} Cabe-nos então conhecermos um pouco mais sobre a crisotila como suporte para a imobilização de biocatalisadores e posterior aplicação em meio orgânico.

3.1- Estudo da Adsorção da Lipase de *Candida Cilindracea* (CCL) em Crisotila.

3.1.1 - Cinética da Adsorção da CCL em Crisotila

Utilizando a CCL, foi verificado o comportamento da adsorção desta enzima em crisotila em meio tamponado nas temperaturas de 21, 25, 30 e 35°C.

A adsorção foi acompanhada pela diminuição do valor da absorbância em 258 nm com o tempo, a temperatura constante. Pela curva da calibração preparada inicialmente, determinou-se a quantidade de enzima adsorvida em crisotila nas diferentes temperaturas em estudo.

A **Figura 17** mostra que o tempo mínimo para que ocorra a saturação, ou seja, para o equilíbrio ser atingido é de 120 minutos, sendo que o valor máximo obtido para a adsorção foi de 70 % nas temperaturas de 21 e 25°C.

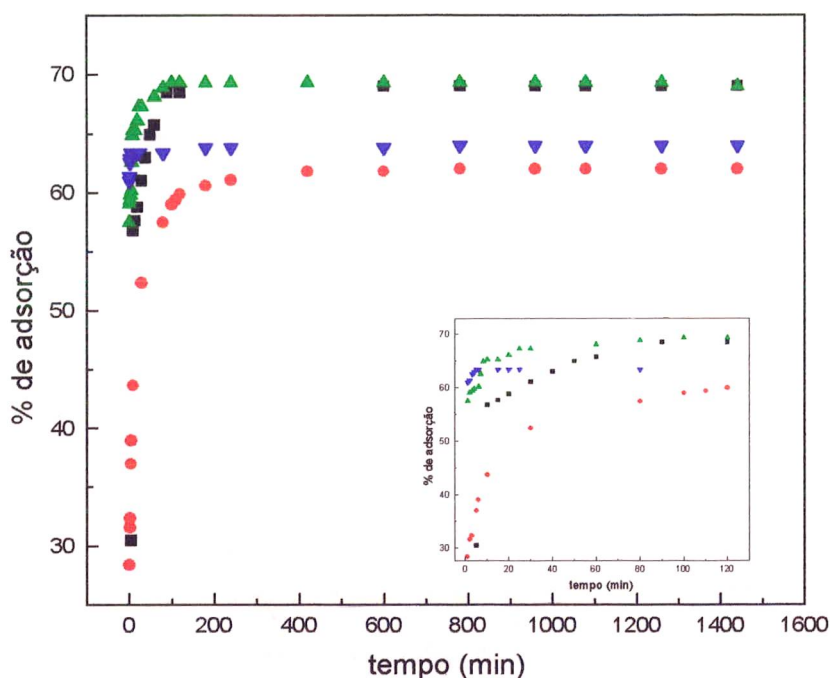


Figura 17 - Quantidade de CCL adsorvida em crisotila nas temperaturas de (■) 21°C, (▲) 25°C, (●) 30°C, (▼) 35°C. (c = 2 mg/mL de CCL em tampão fosfato, pH 7,2)

A porcentagem de CCL adsorvida em crisotila nas diferentes temperatura estão demonstradas na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Quantidade de CCL adsorvida em crisotila em diferentes temperaturas^a

Temperatura (°C)	CCL adsorvida (%)
21	70
25	70
30	60
35	64

(a) CCL (2 mg/mL), 1g de crisotila, tampão fosfato pH 7,2, tempo de 120 min.

Os resultados de Comerlato para a adsorção da urease em crisotila mostraram que o tempo de adsorção para atingir o equilíbrio é de 60 minutos, sendo que 73% de urease

foi adsorvida ($c = 0,35 \text{ mg/mL}$ para $0,5\text{g}$ de massa de crisotila a 25°C).¹²⁶ Os resultados da adsorção da CCL foram similares aos de Comerlato, porém, o tempo de adsorção foi superior.

Durante os experimentos constatou-se que o comportamento das curvas observadas para a diminuição da $[\text{CCL}]$ da solução eram típicas de uma cinética de primeira ordem. Com a ajuda de um programa iterativo, foram calculadas as constantes de velocidade aparente (k_{obs}) para as cinéticas de adsorção nas diferentes temperaturas. A **Figura 18** mostra o comportamento da curva cinética para uma corrida a 25°C . Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 8**.

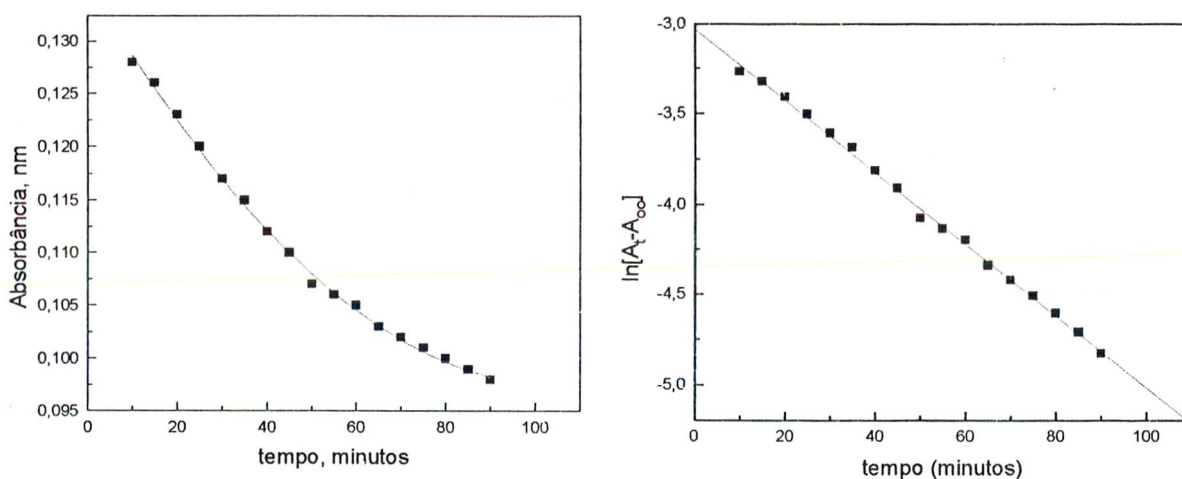


Figura 18 - Acompanhamento da velocidade de adsorção da CCL em crisotila a 258 nm, 25°C (pH 7,2, tampão fosfato 0,07M).

Tabela 8 - Efeito da temperatura na constante de velocidade de adsorção da CCL em crisotila ^(a)

Temperatura, K	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	$10^4 k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$ (média)
294,15	3,38; 2,69	$3,04 \pm 0,35$
298,15	2,91; 3,79	$3,35 \pm 0,44$
303,15	4,37; 3,05	$3,71 \pm 0,66$
308,15	4,09; 4,08	$4,09 \pm 0,01$

(a) coeficiente de correlação $\cong 0,9794$.

Observa-se pela **Tabela 8** que a velocidade de adsorção teve um pequeno aumento na faixa de temperatura estudada, ou seja, de 25°C a 35°C. Aplicando a equação linearizada de Arrhenius foi possível determinar a energia de ativação (E_a) para o processo, construindo um gráfico de \ln do valor médio de k_{obs} versus $1/T$ (**Equações 7 e 8**). O coeficiente angular da reta obtida é igual a $-E_a/R$ (**Figura 19**).¹⁴⁶

$$k_{obs} = A \cdot \exp^{-E_a/RT} \quad (\text{eq. 7})$$

$$\ln k_{obs} = \ln A - E_a/RT \quad (\text{eq. 8})$$

Onde,

E_a = energia de ativação

A = fator de frequência

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

T = temperatura absoluta (Kelvin)

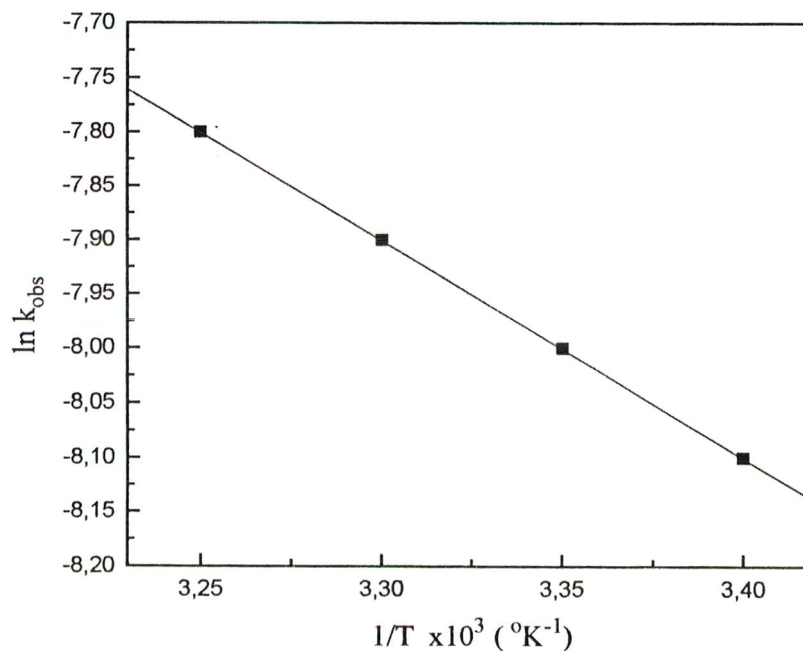


Figura 19 - Variação de k_{obs} em função da temperatura para a adsorção da CCL em crisotila ($r = 0,9992$).

A velocidade de adsorção é proporcional à área superficial total, externa e interna, no caso de adsorção controlada pela superfície. No caso de processos controlados pela difusão, somente a área externa influencia na velocidade de adsorção. A energia de ativação de processos controlados somente pela difusão é baixa, geralmente da ordem de 2 a 5 kcal/mol, enquanto que os controlados pela superfície são normalmente muito maiores.¹⁴⁶

O valor encontrado para a E_a neste processo, foi de **4,0 kcal/mol** (coeficiente de correlação linear igual a 0,9992). O valor de energia de ativação baixo demonstra que a adsorção da CCL em crisotila é um processo controlado por difusão.

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 adsorção da CCL em crisotila (**Equação 9**).

$$k_{\text{obs}} = (k_B T)/h \cdot \exp^{\Delta S^\ddagger/R} \cdot \exp^{-\Delta H^\ddagger/RT} \quad (\text{eq. 9})$$

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

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

A linearização da **Equação 9** leva a **Equação 10** a qual possibilita o cálculo de ΔH^\ddagger , através do coeficiente angular do gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ vs $1/T$ (**Figura 20**).

$$\ln k_{\text{obs}}/T = \ln A - \Delta H^\ddagger/RT \quad (\text{eq. 10})$$

O valor de ΔH^\ddagger determinado foi **3,0 kcal/mol** (coeficiente de correlação linear igual a 0,9912).

Os baixos valores de E_a e ΔH^\ddagger demonstram que a adsorção da CCL em crisotila é um processo rápido com baixo conteúdo energético.

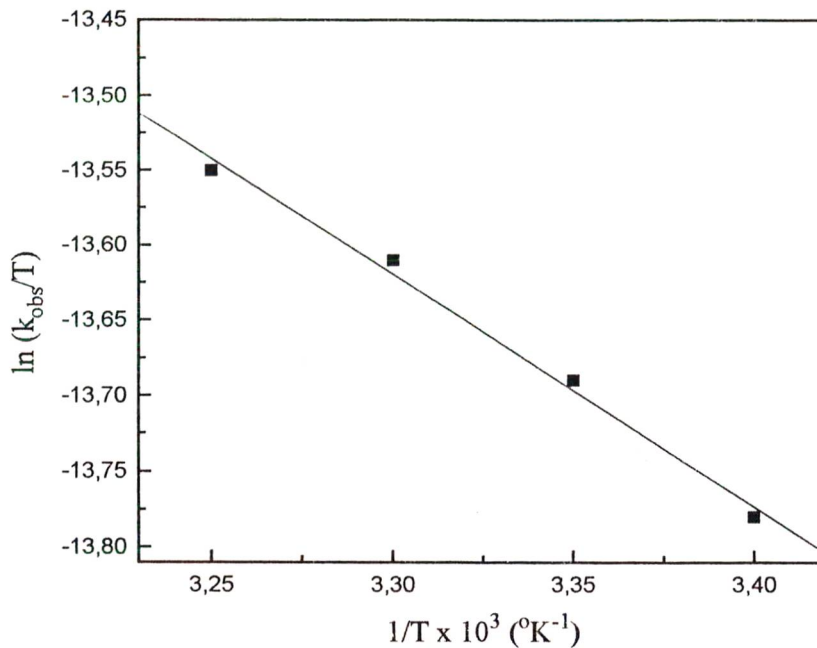


Figura 20 - Gráfico de $\ln k_{\text{obs}}/T$ versus $1/T$ para a adsorção da CCL em crisotila.

Os valores da energia livre de ativação (ΔG^\ddagger), podem ser calculados para as diferentes temperaturas na qual realizaram-se os experimentos de adsorção, diretamente pela equação de Eyring, que pode ser rearranjada fornecendo a **Equação 11**.

$$\Delta G^\ddagger = RT \ln (k_B T / h \cdot k_{\text{obs}}) \quad (\text{eq. 11})$$

Com os valores de ΔG^\ddagger encontrado para cada temperatura, fez-se a média geral, sendo o valor médio de energia livre de ativação encontrado de 49,9 kcal/mol.

Com o valor médio 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, uma vez que $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$.¹⁴⁶

O valor de ΔS^\ddagger encontrado foi de $-159,5$ cal/mol.K. Uma entropia de ativação negativa produzirá um fator de frequência muito baixo, sugerindo uma orientação específica da CCL na formação do estado de transição.

A elucidação dos detalhes do mecanismo de reações em superfícies é relativamente recente e ainda requer mais informações e dados para uma interpretação mais clara dos resultados. Assim, a partir de dados cinéticos, não é possível decidir qual de muitos mecanismos razoáveis é o real para a adsorção do biopolímero. Pode-se apenas afirmar que um é mais plausível que o outro.

No caso do estudo da adsorção da CCL em crisotila, deve-se também levar em consideração a influência da agitação, da área superficial, e do pH na velocidade da adsorção. Se for considerado 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, conforme já mencionado.

3.1.2 - Adsorção da CCL em Função da Massa de Crisotila

Para este experimento utilizou-se 10 mL de solução tamponada (tampão fosfato, pH = 7,2) de CCL (0,5mg/mL) em diferentes quantidades de crisotila. Os resultados estão mostrados na **Figura 21**.

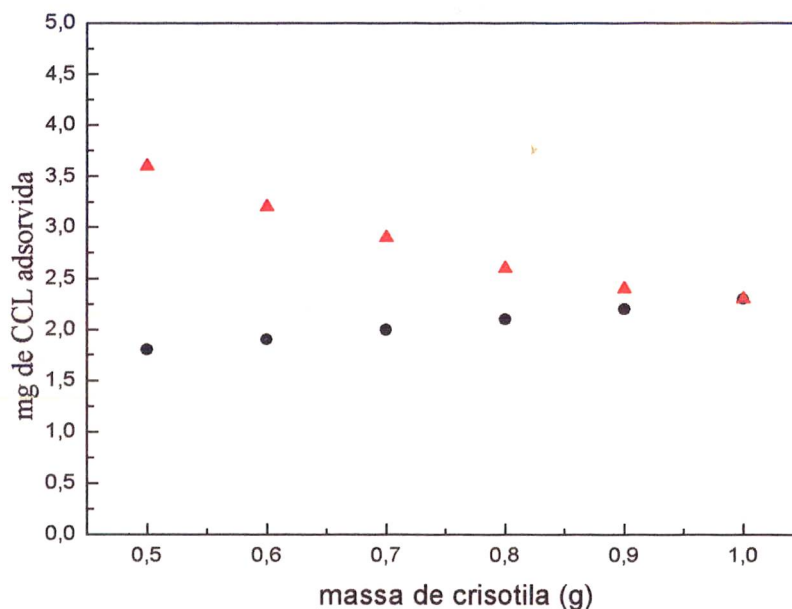


Figura 21 - Adsorção da CCL em função da massa de crisotila, (●) mg de CCL/ massa de crisotila adicionada; (▲) mg de CCL/ g de crisotila.

Pela **Figura 21** pode-se observar que ocorre um aumento na adsorção com o aumento da massa de crisotila, porém, a quantidade de CCL adsorvida por unidade de massa diminui. Este comportamento também foi verificado por Comerlato na adsorção da urease em crisotila. O comportamento observado na **Figura 21** mostra que a CCL adsorvida não é proporcional a massa de crisotila. Para a verificação de dessorção, a crisotila foi lavada na própria peneira com o tampão, sendo estas lavagens brandas, retirando-se uma alíquota e feita medida da absorbância. Nestes experimentos não foi observado a dessorção da CCL.

3.1.3 - Isotermas de Adsorção da CCL em Crisotila

Foram realizados estudos das isotermas de adsorção nas temperaturas de 25°C e 30°C, utilizando 1g de crisotila e variando a concentração da solução tamponada de CCL (tampão fosfato, pH 7,2). Observou-se um favorecimento da adsorção com o aumento da temperatura. A isoterma fornece informações com relação a afinidade entre a enzima e o suporte. Observa-se na **Figura 22** que após um aumento na concentração de 0,6 mg/mL de CCL ocorre a saturação da CCL em crisotila, o que significa que a quantidade de enzima adsorvida é função da concentração da CCL adicionada.

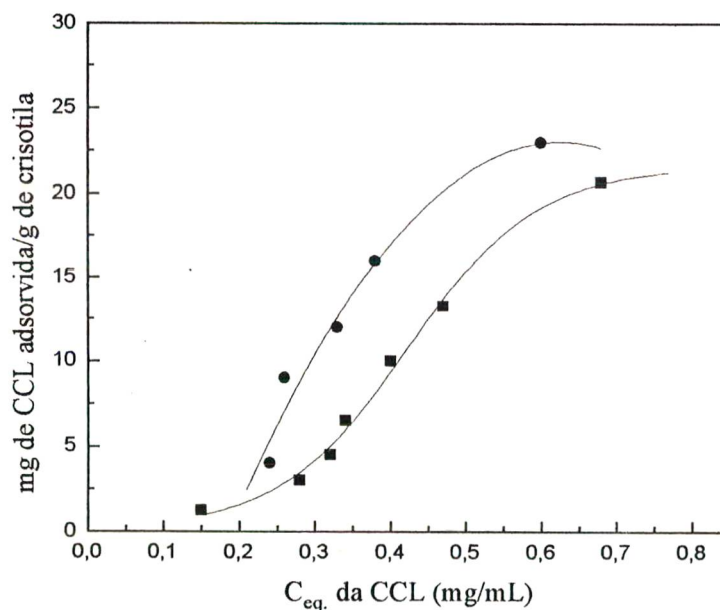


Figura 22 - Isotermas de adsorção da lipase de *Candida cylindracea* (CCL) em crisotila.
() 25°C, () 30°C, tampão fosfato (pH=7,2).

A adsorção resulta de interações favoravelmente energéticas entre o adsorvente e o adsorvato e é muitas vezes um processo complexo visto que ela pode ser influenciada pelo sólido, solvente e componentes do soluto do sistema. Várias interações tais como atração eletrostática, ligação covalente, ligação de hidrogênio ou interações não polares entre o adsorvente e as espécies adsorvato, e interações laterais entre as espécies adsorvidas bem como sua desolvatação podem contribuir para os processos de adsorção e dessorção.¹⁴⁸

As interações responsáveis pela adsorção podem ser de natureza física ou química dependendo das forças envolvidas. Adsorção física é usualmente fraca e reversível e envolve pequenas mudanças de energia. Forças de Van der Waals e forças eletrostáticas são primariamente responsáveis pela adsorção física e também são caracterizadas pela alta velocidade de adsorção e formação de múltiplas camadas. Adsorção química ocorre através da ligação covalente entre o adsorvato e as espécies sobre a superfície do sólido. Adsorção química normalmente envolve uma plataforma de ativação e é caracterizada pela mudança relativamente alta na energia e baixa velocidade de adsorção. Tais adsorções são usualmente fortes, irreversíveis e limitadas a uma monocamada. A distinção entre adsorção física e química pode ser feita pela dependência da temperatura do processo de adsorção. No caso de adsorção física, esta geralmente diminui com a temperatura enquanto que no caso de adsorção química ela aumenta com a temperatura. Contudo, pode ser notado que a distinção entre adsorção química e física é arbitrária e em muitos casos um caráter intermediário de adsorção pode ser encontrado. Em alguns casos, como a adsorção de gases sobre superfícies metálicas, a adsorção física pode ocorrer inicialmente e ser seguida pelas reação entre adsorvente-adsorbato, resultando em uma adsorção química.¹⁴⁸

A CCL é um polímero, e sabe-se que os polímeros podem existir em diferentes conformações ambas em solução e no estado adsorvido. Além disto, macromoléculas usualmente possuem muitos grupos funcionais cada um tendo um potencial para adsorver em uma ou mais partes da superfície. A adsorção causa perda da entropia do polímero, uma vez que macromoléculas usualmente preferem uma conformação que permite o máximo de contato do segmento com a superfície.

Na tentativa de avaliar a constante de equilíbrio para a adsorção da CCL em crisotila, foi aplicado o tratamento teórico de Langmuir e Freundlich para estes processos.

As isotermas de Langmuir e Freundlich são as mais utilizadas para descrever os fenômenos de adsorção.

A isoterma de Langmuir é baseada na **Equação 12** (forma linearizada). Ela se ajusta a uma grande variedade de dados de adsorção. Inicialmente foi aplicada para adsorção de gases sobre sólidos, mas também pode ser usada para descrever adsorção de soluções diluídas.¹⁴⁶

$$\frac{X}{N} = \frac{K \cdot C}{K \cdot C + 1} \quad (\text{eq. 12})$$

onde:

K é a constante de equilíbrio

C é a concentração de equilíbrio do adsorvato

X é a quantidade de soluto adsorvido geralmente em mol/g

N é o número de moles do soluto para preencher todos os sítios de adsorção.

Na dedução de Langmuir as moléculas adsorvidas interagem apenas com o adsorvente, mas não entre si. Assume-se que a adsorção é limitada à formação de monocamada, ou seja, o adsorvente possui sítios específicos em sua superfície, e cada sítio adsorve uma molécula, por isto esta equação é mais aplicada em adsorções químicas. Assume-se também que o calor de adsorção independe da superfície coberta, considerando ser um sólido com uma superfície homogênea. Porém, poucas superfícies sólidas são homogêneas a nível molecular.¹⁴⁹

A isoterma de Freundlich obedece a **Equação 13**, sendo aplicada para adsorção de soluções.

$$X = k \cdot C^{1/n} \quad (\text{eq. 13})$$

onde:

X é a quantidade de soluto adsorvido geralmente em mol/g

k e n são constantes empíricas que dependem do sistema adsorvente-adsorvato.

A magnitude da constante n fornece uma indicação da afinidade e capacidade do sistema adsorvente-adsorvato. Valores de n entre 3 e 10 indicam condições favoráveis de adsorção.

Foi observado que as isotermas de adsorção não obedecem à equação de Langmuir, apresentando uma inclinação negativa, porém, apresentam uma linearidade com a equação de Freundlich (**Figura 23**).

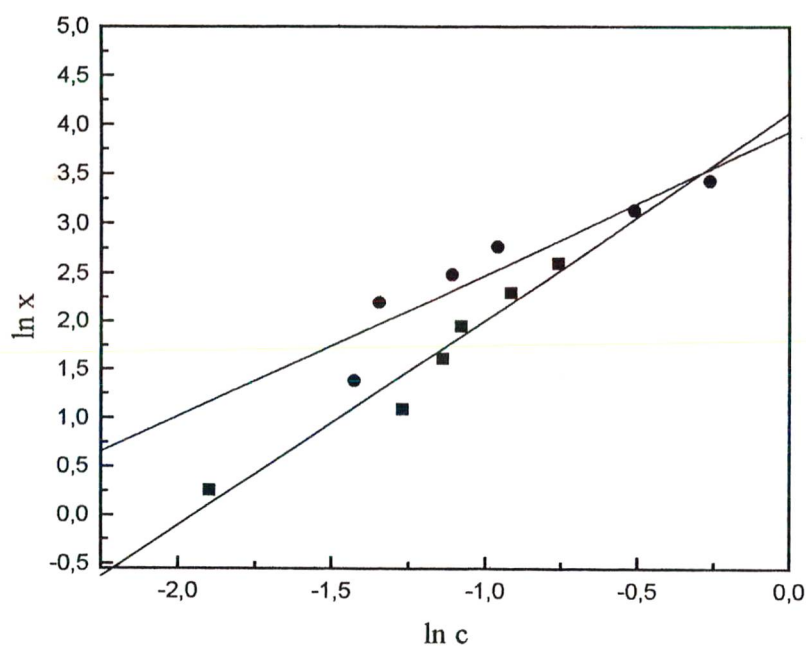


Figura 23- Gráfico de Freundlich linearizado para a isoterma de adsorção da CCL em crisotila a (■) 25°C e (●) 30°C, tampão fosfato (pH=7,2).

A **Tabela 9** apresenta os resultados obtidos para a isoterma de Freundlich. Os valores de n e k obtidos podem ser interpretados como uma baixa afinidade para a isoterma de Freundlich.

Tabela 9 - Constantes empíricas de Freundlich para a isoterma de adsorção da CCL em crisotila^a.

Temperatura, °K	k	n	coeficiente de correlação
298,15	4,178	0,5	0,9970
303,15	3,931	1	0,9270

(a) calculados de acordo com a equação $\ln x = \ln k + 1/n \cdot \ln c$, onde x é a quantidade de soluto adsorvido em mg de CCL/ g de crisotila, k e n são as constantes empíricas que dependem do sistema adsorvente-adsorvato.

Enzimas como a Serina Protease Savina e a Lipolase tem demonstrado interações eletrostáticas entre a superfície e a enzima quando sílica é utilizada como suporte.^{150,151}

Zoungrana e col.¹⁵² tem estudado a interação da α -quimiotripsina em superfícies de poliestirenos levando-se em consideração apenas as interações físicas como efeitos de cargas e interações hidrofóbicas, sendo que medidas da atividade sugerem uma distribuição conformacional heterogênea da molécula adsorvida na superfície do sólido. Outros trabalhos têm demonstrado a complexidade do estudo da adsorção de lipases sobre superfícies sólidas, aplicando novos métodos para medir a adsorção/ dessorção das proteínas em suportes sólidos.¹⁵³⁻¹⁵⁵

O processo de adsorção da CCL e outras biomoléculas sobre a superfície da crisotila deve envolver vários tipos de interações tais como: soluto-solvente, solvente-adsorvente, e soluto-adsorvente. Provalvemente deve estar ocorrendo formação de múltiplas camadas de enzimas na superfície. Além disto, as enzimas são polímeros não-lineares e a crisotila não apresenta uma superfície homogênea sendo que, certamente isso influência na caracterização do sistema.

3.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na tentativa de compreender melhor e esclarecer as possíveis interações que ocorrem entre a enzima e o suporte (crisotila), foram feitas fotomicrografias da crisotila tratada com e sem CCL immobilizada. Os resultados obtidos são mostrados nas **Figuras 24** e **25**.

Pela **Figura 24** pode-se observar que a crisotila tratada apresenta-se em forma de fibras mostrando em certas regiões cavidade salientes, confirmando assim que este material não apresenta uma superfície homogênea e sim, uma superfície irregular fibrosa, conforme já descrito na literatura.^{125,126}

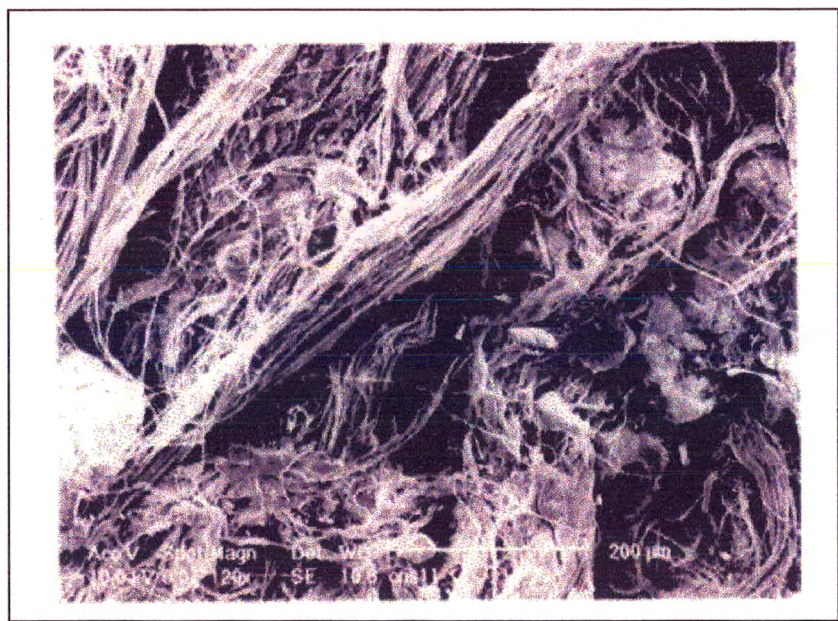


Figura 24 - Fotomicrografia da superfície da crisotila tratada sem enzima immobilizada (ampliação 120x)

Após adsorção foi observado uma perda da estrutura fibrosa em determinadas regiões da crisotila (**Figuras 25**).



Figura 25 - Fotomicrografia da superfície da crisotila tratada com CCL imobilizada (ampliação 120x)

3.2 - Resolução de Ácidos Racêmicos

Como já mencionado anteriormente, 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. 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. A importância de encontrar uma metodologia adequada para a resolução de ácidos racêmicos atualmente é de grande aplicação, porque os ácidos carboxílicos quirais são excelentes compostos para serem utilizados em síntese orgânica pela sua facilidade de conversão para outra classe de compostos importantes. Por isso muitas vezes são chamados de “synthons”.

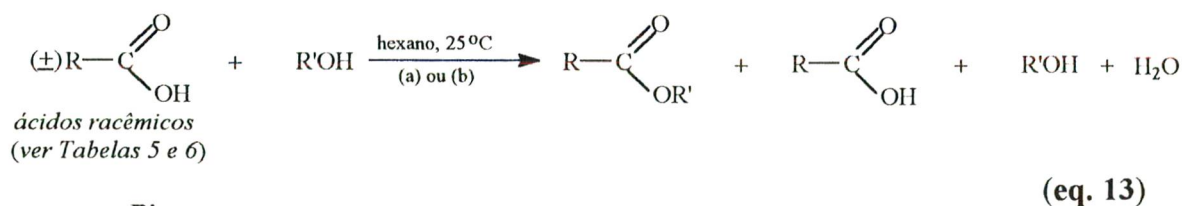
O trabalho de resolução consistiu em imobilizar as lipases de *Candida cylindracea* e de *Chromobacterium viscosum* em organo-gel e a lipase de *Candida cylindracea* em crisotila e, aplicá-las na esterificação enantiosseletiva dos ácidos racêmicos descritos nas **Tabelas 5 e 6** da parte experimental (páginas 38 e 39, respectivamente).

A lipase de *Candida cylindracea* imobilizada em organo-gel, não demonstrou nenhuma atividade nas reações de esterificação estudadas.

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

- a) A resolução dos ácidos racêmicos catalisada pela lipase de *Candida cylindracea* (CCL) imobilizada em crisotila.
- b) A resolução dos ácidos racêmicos catalisada pela lipase de *Chromobacterium viscosum* (CVL) imobilizada em organo-gel.

As reações de esterificação enantiosseletivas foram realizadas conforme a **Equação 13**, e foram acompanhadas por ccd e ^1H RMN. Os álcoois alifáticos utilizados foram o n-pentanol, o n-octanol e o n-undecanol.



ácidos racêmicos
(ver Tabelas 5 e 6)

R'

1. n-C₅H₁₁
2. n-C₈H₁₇
3. n-C₁₁H₂₃

(a) CCL = lipase de *Candida cylindracea*/ crisotila

(b) CVL = lipase de *Chromobacterium viscosum*/ organo-gel

Iniciou-se os trabalhos pela resolução dos ácidos racêmicos (±)-2 e (±)-3-metil-alcanóicos e (±)-2-etil-hexanóico para posteriormente tentar resolver os ácidos (±)-2-bromo-alcanóicos e os mais complexos tais como (±)-citronélico, (±)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico, (±)-canforcarboxílico e o D,L-mandélico. A **Tabela 10** mostra de modo geral os resultados obtidos para os ácidos em estudo com relação aos sistemas utilizados.

Tabela 10- Comportamento dos substratos com relação aos sistemas utilizados

Composto ^(a)	Sistema de Reação	
	Organo-gel/CVL	Crisotila/CCL
1	reagiu e resolveu	reagiu e resolveu
2	reagiu e resolveu	reagiu e resolveu
3	reagiu, não resolveu	reagiu, não resolveu
4	reagiu	reagiu
5	reagiu e resolveu	reagiu e resolveu
6	não reagiu	não reagiu
7	não reagiu, destruiu o sistema	reagiu, não resolveu
8	não reagiu, destruiu o sistema	reagiu, não resolveu
9	não reagiu, destruiu o sistema	reagiu e resolveu
10	reagiu e resolveu	reagiu muito pouco (< 3%)
11	não reagiu, destruiu o sistema	não reagiu
12	não reagiu	não reagiu
13	reagiu e não resolveu	reagiu e não resolveu

(a) Numerados conforme estruturas das Tabelas 5 e 6 da parte experimental.

3.2.1 Resolução dos Ácidos Racêmicos via Esterificação Catalisada pela Lipase de *Candida cylindracea* Imobilizada em Crisotila

3.2.1.1 Resolução dos ácidos (\pm)-2 e (\pm)-3-metil-alcanóicos e (\pm)-2-etil-hexanóico

A enantiosseletividade da CCL imobilizada em crisotila foi analisada inicialmente para a resolução do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico (**2**). A **Figura 26** mostra o grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com os álcoois alifáticos n-pentanol, n-octanol e n-undecanol. Pode-se observar que o grau de conversão diminui com o aumento da cadeia do álcool.

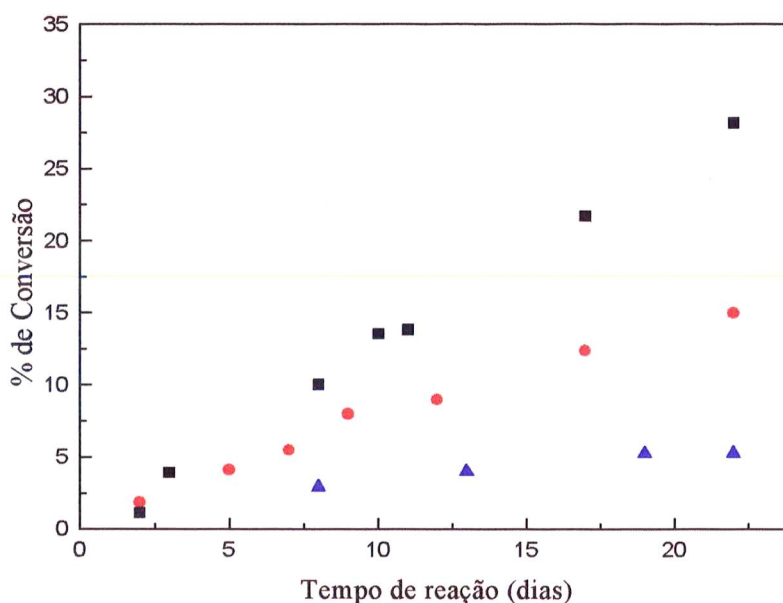


Figura 26- Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com [■] n-pentanol, [●] n-octanol, [▲] n-undecanol catalisada pela CCL imobilizada em crisotila.

Nas **Tabelas 11** e **12** podem ser observados os resultados obtidos para a esterificação enantiosseletiva do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico. A CCL imobilizada em crisotila mostra preferência na esterificação pelo enantiômero com rotação óptica positiva (+). Os valores de excessos enantioméricos para os produtos formados ficaram na faixa de

75 a 80%, e podem ser considerados bons quando comparados com outros dados da literatura.⁶⁸ Já os valores de excesso enantiomérico para o enantiômero não reativo restante foram baixos (20 a 38%). Observa-se que quando a cadeia do álcool aumenta ocorre uma diminuição no grau de conversão, um aumento no excesso enantiomérico do éster formado e uma diminuição no excesso enantiomérico do substrato restante. 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.

Tabela 11 - Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisada pela CCL imobilizada em crisotila^a.

Álcool	% de Conversão	$[\alpha]_D^{25}$ éster (c, éter) ^c	$[\alpha]_D^{25}$ ácido reativo ^b (c, éter)	$[\alpha]_D^{25}$ ácido não reativo (c, éter)
n-pentanol	28,0	+ 6,0 (12)	+ 4,2 (6)	- 2,7 (18)
n-octanol	15,0	+ 6,4 (10)	+ 4,3 (5)	- 2,1 (3)
n-undecanol	5,0	+ 6,0 (11)	+ 4,5 (4)	- 1,4 (4)

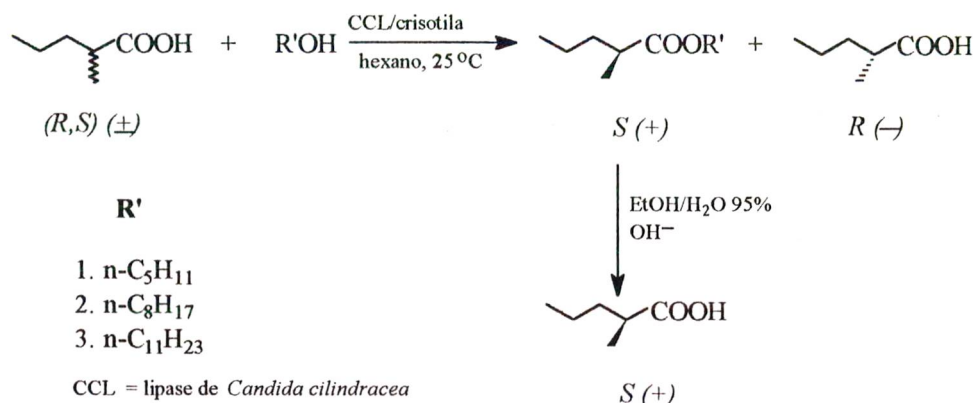
(a) Condições da reação: tempo de 21 dias, 0,03 moles de substratos (1:1), solvente hexano, 25°C; (b) ácido derivado da hidrólise básica do éster; (c) c é a concentração da amostra em g/100 mL.

Tabela 12 - Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisada pela CCL imobilizada em crisotila^a.

Álcool	% de Conversão	ee _s (%) ^a	ee _p (%) ^b	E ^c
n-pentanol	28,0	38	75	10
n-octanol	15,0	30	77	10
n-undecanol	5,0	20	80	11

(a) ee_s é o excesso enantiomérico do isômero ácido não reativo; (b) ee_p é o excesso enantiomérico do isômero ácido reativo derivado da hidrólise básica do éster; (c) E é a razão enantiomérica calculada pela equação $E = \ln [(1 - c) \cdot (1 - ee_s)] / \ln [(1 - c) \cdot (1 + ee_s)]$ onde $c = ee_s / ee_s + ee_p$ [ref. 5, 7]

Por comparação com os trabalhos de Engel e col.^{68,70} pode-se atribuir a configuração absoluta para a esterificação enantiosseletiva do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico quando catalisada pela CCL (**Esquema V**).



Esquema V

Análises espectroscópicas de IV e ¹H RMN foram realizadas para todos os produtos obtidos nas reações de esterificação enantiosseletivas e estão mostrados no **item 3.5** (caracterização dos produtos, p. 86).

A **Figura 27** mostra o espectro de IV para o éster (+)-2-metil-pentanoato de n-octila onde pode-se observar a banda característica da carbonila de éster em 1736 cm⁻¹.

A **Figura 28** mostra o espectro de ¹H RMN para o (+)-2-metil-pentanoato de n-octila, em CDCl₃. Observa-se um triplete em 4,1 ppm que corresponde aos prótons metilênicos (-CH₂OOC) ligados ao oxigênio do grupo éster.

A **Figura 29** mostra o o espectro de ¹H RMN para o ácido (+)-2-metil-pentanóico, produto da hidrólise básica do (+)-2-metil-pentanoato de n-octila, em CDCl₃. Pode-se observar nesta figura um singlete em 11,2 ppm referente ao próton do grupo carboxílico, e um multiplete do próton do -CHCOOH, em 2,5 ppm. Os demais picos nos espectros mostrados nas **Figuras 28 e 29** são correspondentes aos outros hidrogênios presentes nas moléculas citadas, e estão devidamente caracterizados conforme mostrado na página 86.

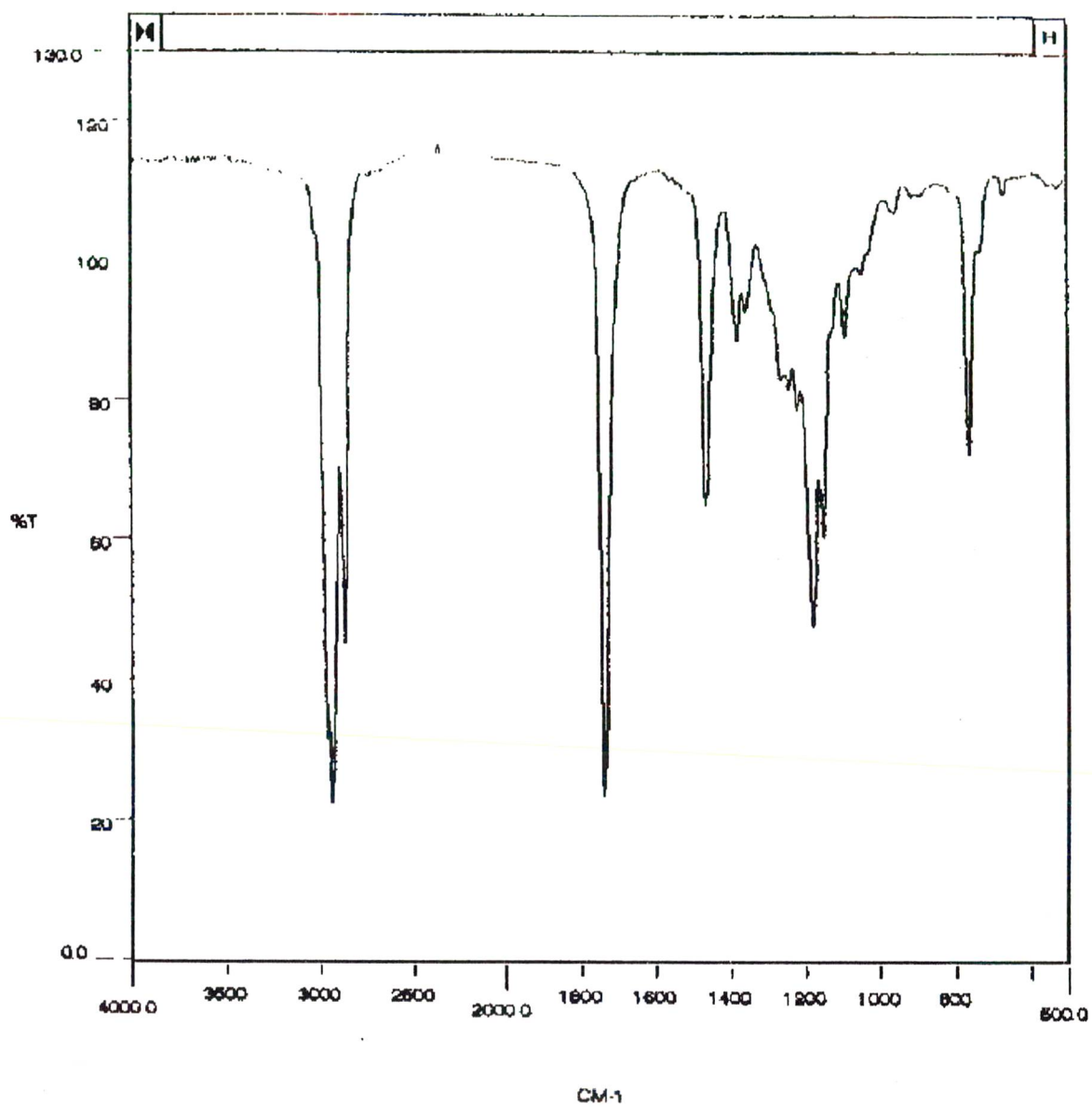


Figura 27 - Espectro de infravermelho do éster (+)-2-metil-pentanoato de n-octila (em filme)

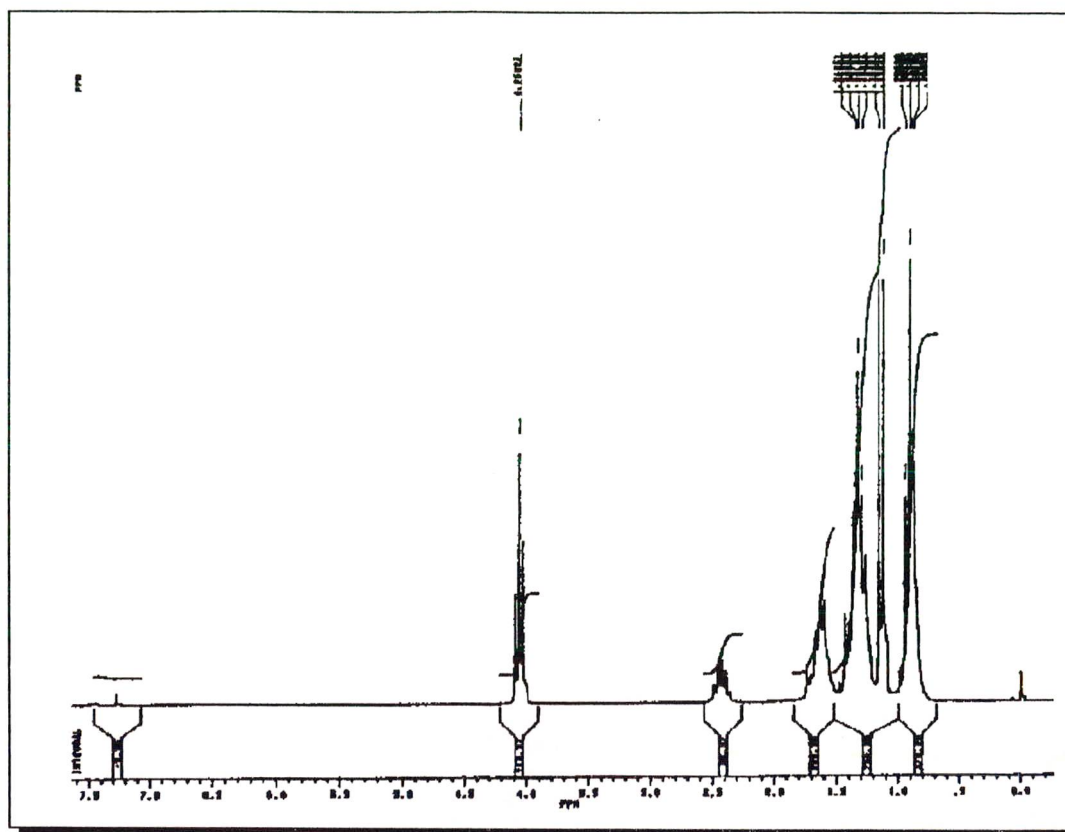


Figura 28 - Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do (+)-2-metil-pentanoato de n-octila em CDCl_3 .

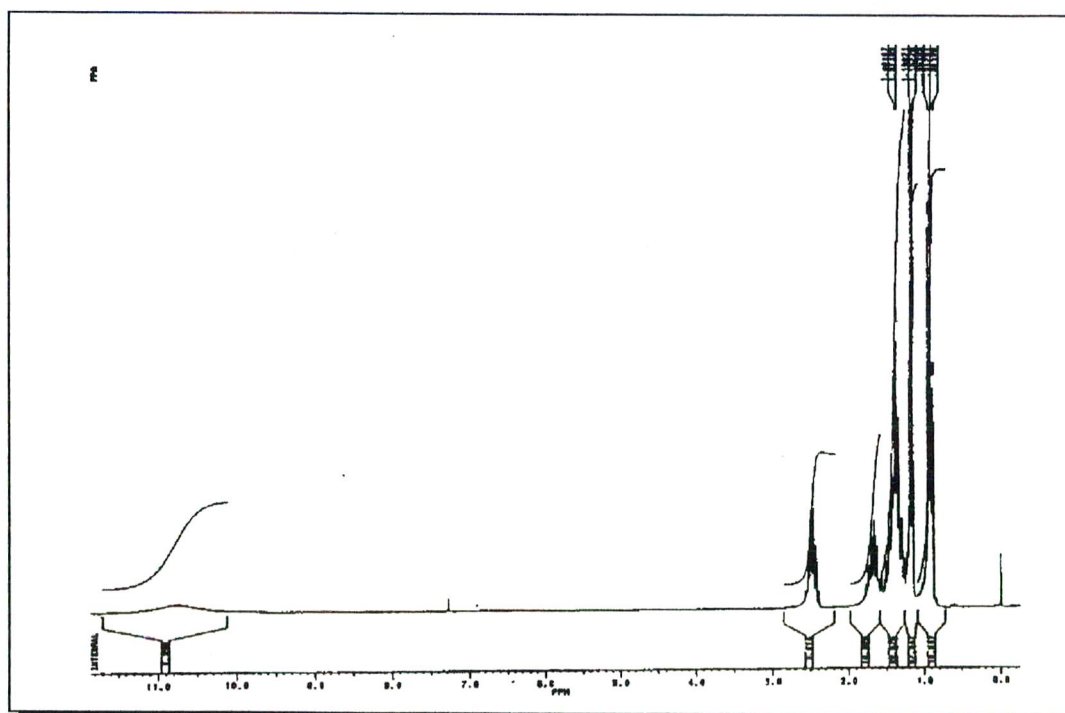


Figura 29 - Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do ácido (+)-2-metil-pentanóico em CDCl_3 .

Para a resolução do ácido (\pm)-3-metil-pentanóico (**3**) observa-se que a reação ocorreu com uma conversão pequena para produtos (< 5%), e que não houve a separação dos enantiômeros, sendo os valores de rotação óptica obtidos iguais a zero (Tabela 13).

Tabela 13 - Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (\pm)-3-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisada pela CCL imobilizada em crisotila^a.

Álcool	% de Conversão	$[\alpha]_D^{25}$ éster (c, éter) ^b	$[\alpha]_D^{25}$ ácido reativo (c, éter)	$[\alpha]_D^{25}$ ácido não reativo (c, éter)
n-pentanol	4,0	0,0 (3)	—	0,0 (5)
n-octanol	3,0	0,0 (2)	—	0,0 (4)
n-undecanol	traços	—	—	—

(a) Condições da reação: tempo de 21 dias, 0,03 moles de substratos (1:1), solvente hexano, 25°C; (b) c é a concentração da amostra em g/100 mL.

Com a finalidade de verificar como a posição do grupo metila interfere no grau de esterificação, foram realizadas reações com o ácido aquiral 4-metil-pentanóico (**4**). Os resultados estão mostrados na Tabela 14.

Tabela 14- Comparação do grau de conversão da reação dos ácidos (\pm)-2-metil-pentanóico, (\pm)-3-metil-pentanóico e 4-metil-pentanóico com diferentes álcoois alifáticos catalisada pela CCL imobilizada em crisotila^a.

Álcoois	(\pm)-2-metil-pentanóico % de conv. p/ éster	(\pm)-3-metil-pentanóico % de conv. p/ éster	4-metil-pentanóico % de conv. p/ éster
n-pentanol	28,0	4,0	49,8
n-octanol	15,0	3,0	18,0
n-undecanol	5,0	traços	10,0

(a) Tempo de reação: 21 dias acompanhadas por ccd e ¹H RMN, 0,03 moles de substratos (1:1), 25 mL de hexano, 25°C.

Observa-se pela **Tabela 14** que a formação de éster é maior para o ácido 4-metil-pentanóico seguido dos ácidos (\pm)-2-metil-pentanóico e (\pm)-3-metil-pentanóico para todos os álcoois utilizados na reação. Um aumento na cadeia do álcool de 5 para 11 carbonos causa apenas uma diminuição no rendimento do éster formado, não alterando a ordem preferencial de formação do éster. Considerando apenas os ácidos racêmicos (\pm)-2-metil-pentanóico e (\pm)-3-metil-pentanóico, observa-se que a reação é mais favorecida por um grupo metila na posição 2 do que na posição 3 da cadeia hidrocarbônica do ácido. Fica claro neste experimento a importância do sítio de posicionamento para a catálise, ou seja, o encaixe do substrato ácido no sítio catalítico da enzima deve envolver boa parte da molécula, sendo que uma ramificação no carbono 3 da cadeia do ácido prejudica esse encaixe, e assim, a sua seletividade.

A **Figura 30** mostra o grau de esterificação dos ácidos (\pm)-2-metil-pentanóico, (\pm)-3-metil-pentanóico e 4-metil-pentanóico com o n-pentanol catalisada pela CCL imobilizada em crisotila, a 25°C. Pode-se observar que a variação do rendimento para a formação do éster (\pm)-3-metil-pentanoato de n-pentila foi pequena durante o período em que foi realizado o experimento, sendo que para os outros dois ácidos o aumento foi de uma forma quase linear.

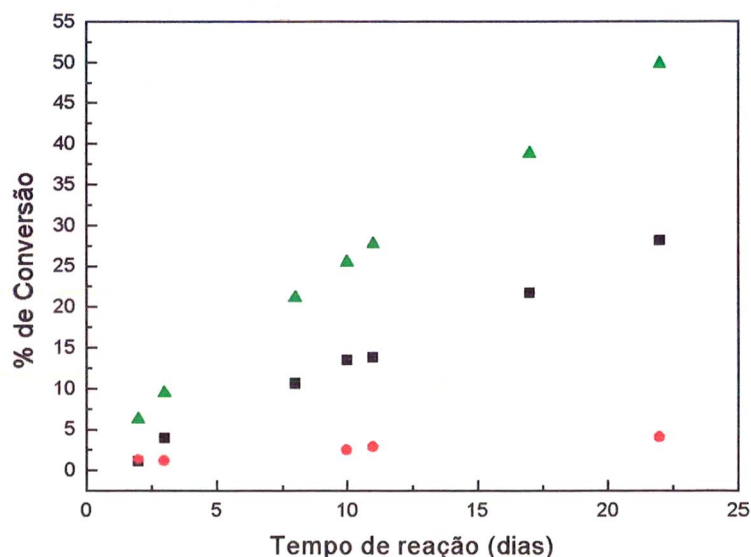


Figura 30 - Grau de esterificação em função do tempo para a reação do n-pentanol com os ácidos [■] (\pm)-2-metil-pentanóico, [●] (\pm)-3-metil-pentanóico e [▲] 4-metil-pentanóico, catalisada pela CCL imobilizada em crisotila, em hexano a 25°C.

Com o propósito de verificar o efeito na mudança de um grupo metila por um grupo mais volumoso na posição 2 da cadeia hidrocarbônica do ácido, foi estudada a esterificação do ácido (\pm)-2-etil-hexanóico (**6**) com o n-pentanol. O resultado obtido foi a não formação de éster, ou seja, não ocorreu a reação de esterificação quando o grupo metila foi substituído pelo grupamento mais volumoso etila. Este resultado demonstra novamente a importância do posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima para a efetivação da catálise, já que é necessário uma orientação ideal dos orbitais do substrato com o centro catalítico para que a reação ocorra e que seja seletiva.

Dando continuidade a resolução dos ácidos racêmicos 2-metil-alcanóicos, foram realizadas reações de esterificação enantiosseletivas do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico (**5**) com n-pentanol, n-octanol e n-undecanol. A **Figura 31** mostra o grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico com os álcoois alifáticos. Pode-se observar que o grau de conversão também diminui com o aumento da cadeia do álcool, conforme já verificado para a reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico.

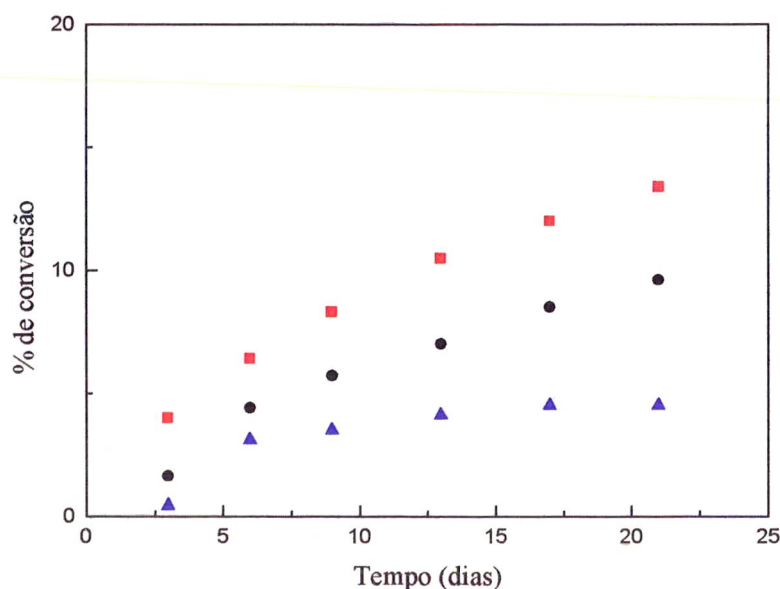


Figura 31 - Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico com [■] n-pentanol, [●] n-octanol, [▲] n-undecanol catalisada pela CCL imobilizada em crisotila a 25°C.

Os resultados obtidos na esterificação enantiosseletiva do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico estão demonstrados nas **Tabela 15** e **16**.

Tabela 15 - Medidas de rotação óptica dos produtos de reação do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico com diferentes álcoois catalisada pela CCL imobilizada em crisotila^a.

Álcool	% de Conversão	$[\alpha]_D^{25}$ éster (c, éter) ^c	$[\alpha]_D^{25}$ ácido reativo ^b (c, éter)	$[\alpha]_D^{25}$ ácido não reativo (c, éter)
n-pentanol	30,4	+ 6,8 (4)	+ 6,9 (3)	- 3,0 (5)
n-octanol	24,4	+ 7,0 (3)	+ 7,5 (2)	- 4,0 (4)
n-undecanol	23,1	+ 7,5 (3)	+ 8,2 (2)	- 3,8 (4)

(a) Condições da reação: tempo de 21 dias, 0,03 moles de substratos (1:1), solvente hexano, 25°C; (b) ácido derivado da hidrólise básica do éster; (c) c é a concentração da amostra em g/100 mL.

Tabela 16 - Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico com diferentes álcoois catalisada pela CCL imobilizada em crisotila^a.

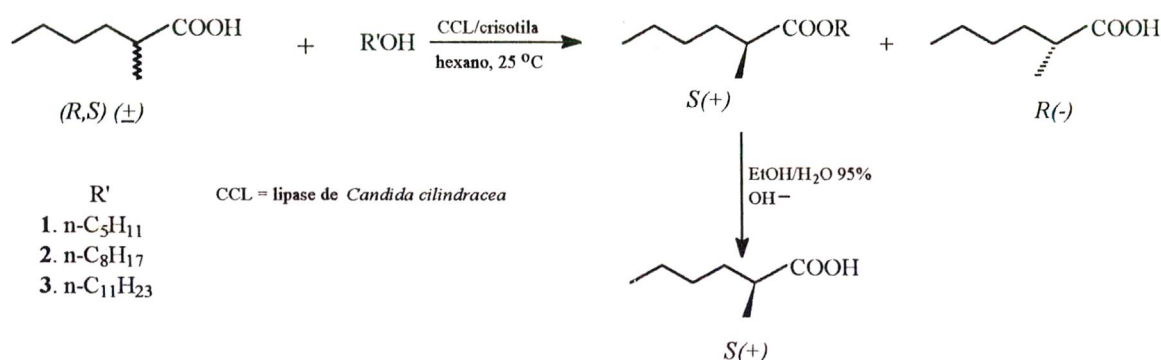
Álcool	% de Conversão	ee _s (%) ^a	ee _p (%) ^b	E ^c
n-pentanol	30,4	20	35	2,5
n-octanol	24,4	26	38	2,8
n-undecanol	23,1	25	42	3,1

(a) ee_s é o excesso enantiomérico do isômero ácido não reativo; (b) ee_p é o excesso enantiomérico do isômero ácido reativo derivado da hidrólise básica do éster; (c) E é a razão enantiomérica calculada pela equação $E = \ln [(1-c).(1-ee_s)] / \ln [(1-c).(1+ee_s)]$ onde $c = ee_s / ee_s + ee_p$ [ref. 5, 7].

A preferência pelo enantiômero com rotação óptica positiva (+) também é verificada para este ácido, porém os valores de excessos enantioméricos para os produtos foram baixos, bem como os valores da razão enantiomérica que foram menores que 4, enquanto que para a resolução do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico os valores de E ficaram em torno de 10. Estes resultados demonstram que um aumento na cadeia carbônica do ácido pode afetar a enantiosseletividade e com isso o excesso enantiomérico dos produtos da reação quando o catalisador for a CCL imobilizada em crisotila. Este resultado pode ser um reflexo de como o sítio ativo da enzima deve estar exposto para acomodar o substrato,

quando adsorvida em crisotila. Pode-se postular que deve estar ocorrendo uma competição cinética onde a porcentagem de conversão pode estar sendo o fator determinante para uma melhor discriminação enantiosseletiva da enzima.

Pelos resultados obtidos para a resolução do ácido (\pm)-2-metil-hexanóico é possível apresentar uma equação que melhor ilustra a obtenção dos ésteres (+)-2-metil-hexanoatos de n-pentila, n-octila, n-undecila e dos ácidos (-)-2-metil-hexanóico e (+)-2-metil-hexanóico (**Esquema VI**).



Esquema VI

A resolução do ácido (\pm)-2-metil-butanóico foi de interesse devido a sua utilização na síntese do feromônio de *Mygdolus fryanus*, uma praga da cana de açúcar.¹⁵⁶ A reação foi acompanhada por ccd e ^1H RMN, e a **Figura 32** mostra o grau de esterificação obtido para a reação do ácido (\pm)-2-metil-butanóico com o n-pentanol.

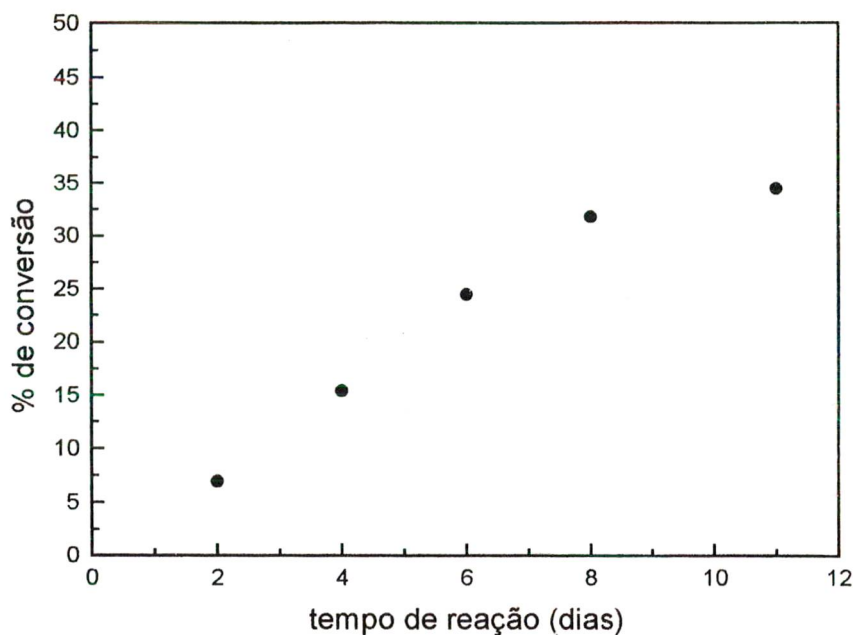


Figura 32 - Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-butanóico com o n-pentanol catalisada pela CCL imobilizada em crisotila a 25°C, acompanhada por ^1H RMN.

A reação foi interrompida após 11 dias e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17 - Medidas de rotação óptica e excesso enantiomérico do produto de reação do ácido (\pm)-2-metil-butanóico com n-pentanol^a.

Álcool	n-pentanol
% de Conversão	34,5
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ éster (c, éter)	+ 4,2 (1)
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ ácido reativo ^b (c, éter)	+ 8,0 (1)
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ ácido não reativo (c, éter)	- 4,0 (1)
ee_s (%) ^c	42
ee_p (%) ^d	40
E^e	3,5

(a) Condições da reação: tempo de 11 dias, 0,01 moles de substratos (1:1), lipase de *Candida cylindracea* imobilizada em crisotila, solvente hexano, 25°C; (b) ácido derivado da hidrólise básica do éster. (c) ee_s é o excesso enantiomérico do isômero ácido não reativo; (d) ee_p é o excesso enantiomérico do isômero ácido reativo derivado da hidrólise básica do éster; (e) E é a razão enantiomérica calculada pela equação $E = \ln [(1-c).(1-ee_s)] / \ln [(1-c).(1+ee_s)]$ onde $c = ee_s / ee_s + ee_p$ [ref. 5, 7].

Foram obtidos valores baixos de excessos enantioméricos e enantiosseletividade (**E**) para a resolução deste ácido, sendo o valor de rotação óptica para o éster formado positivo. Com um grau de conversão de 34,5%, o excesso enantiomérico obtido para o isômero não reativo foi de 42% e para o ácido derivado da hidrólise básica do éster foi de 40%, valor este menor que o obtido para o ácido (+)-2-metil-pentanóico que foi de 75%, porém, foi maior que para o ácido (+)-2-metil-hexanóico (35%).

Se pensarmos em termos da estrutura, pode-se propor que o sítio catalítico e de posicionamento é capaz de encaixar melhor compostos com cinco átomos de carbono. Sendo assim, os ácidos racêmicos (\pm)-2-metil-alcanóicos com 6 ou 4 átomos de carbonos devem induzir uma mudança conformacional da enzima para melhor encaixar os substratos e isso irá refletir numa diminuição da orientação favorável para uma melhor seletividade na catálise. Portanto, dos ácidos racêmicos estudados o (\pm)-2-metil-pentanóico é o mais adequado para ser resolvido quando a CCL está imobilizada em crisotila.

3.2.1.2 Resolução dos ácidos (\pm)-2-bromo-alcanóicos

Foi verificado que substituindo o grupamento metila pelo grupamento etila na posição 2 da cadeia hidrocarbônica dos ácidos racêmicos (\pm)-2-metil-alcanóicos, não ocorreu a reação de esterificação.

O que acontece na presença de um halogênio na posição 2 da cadeia do ácido?. Para responder a essa pergunta foram realizadas reações dos ácidos (\pm)-2-bromo-pentanóico (**7**), (\pm)-2-bromo-hexanóico (**8**) e (\pm)-2-bromo-octanóico (**9**) com o n-pentanol catalisadas pela CCL imobilizada em crisotila, em 25 mL de hexano a 25°C. Para as reações com os ácidos bromados não foi possível um acompanhamento por RMN de ^1H devido ao sinal do próton do ácido vizinho a carbonila estar na mesma região do próton vizinho ao OH do álcool quando da formação do éster. Neste caso as reações foram acompanhadas apenas por ccd e deixadas reagirem por um período de 21 dias, quando foram interrompidas e os produtos isolados por cromatografia de coluna.

Os resultados obtidos da resolução destes ácidos podem ser vistos na **Tabela 18**, onde verifica-se que para os ácidos **7** e **8** ocorreu a reação de esterificação mas não a separação dos enantiômeros, sendo os valores de rotação óptica iguais a zero.

Tabela 18 - Medidas de rotação óptica dos produtos das reações dos ácidos (\pm)-2-bromo-alcanóicos com n-pentanol^a.

Compostos	% de Conversão	$[\alpha]_D^{25}$ éster (c, éter)	$[\alpha]_D^{25}$ ácido reativo ^b (c, éter)	$[\alpha]_D^{25}$ ácido não reativo (c, éter)
7	20,7	0,0 (26)	—	0,0 (12)
8	28,0	0,0 (20)	—	0,0 (10)
9	34,9	- 12,5 (15)	- 10,5 (17)	+ 8,1 (5)

(a) Condições da reação: tempo de 21 dias, 0,03 moles de substratos (1:1), lipase de *Candida cylindracea* imobilizada em crisotila, solvente hexano, 25°C; (b) ácido derivado da hidrólise básica do éster.

Para o ácido (\pm)-2-bromo-octanóico foi observado a separação dos enantiômeros e o valor de rotação óptica para o éster formado foi negativo, diferente dos valores encontrados para os ácidos 2-metil-alcanóicos que foram positivos. O trabalho de Kirchner e col.⁸⁰ para a resolução de ácidos (\pm)-2-bromo-alcanóicos utilizando a CCL (2,0g) em suspensão em hexano, mostra uma inversão no sinal da rotação óptica com o aumento da cadeia hidrocarbônica. Kirchner obteve para a resolução do ácido (\pm)-2-bromo-hexanóico um valor de rotação óptica do éster formado positivo (+12,4, c=1, CHCl₃) e para o ácido (\pm)-2-bromo-hexadecanóico o valor de rotação óptica do éster formado foi negativo (-9,7, c=1, CHCl₃). Os autores não discutem o porquê das alterações no sinal da rotação. Provavelmente este resultado está relacionado com a estereoquímica do sítio ativo da enzima.

3.2.1.3 - Resolução dos ácidos (±)-citronélico, (±)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico (±)-canforcarboxílico e ácido D,L-mandélico

Ácidos com estruturas um pouco mais complexas foram utilizados afim de propiciar caminhos alternativos para estudos mais aprofundados dos correspondentes substratos via catálise enzimática. O ácido citronélico enantiomericamente puro, como mencionado na introdução, é aplicado na síntese de moléculas mais complexas como os feromônios.

Foi realizada a esterificação enantiosseletiva do ácido (±)-citronélico com o n-pentanol conforme procedimento geral, e a reação foi acompanhado por ccd e ^1H RMN. A **Figura 33** mostra o grau de esterificação em função do tempo para a reação. Observou-se uma pequena conversão para éster (3,19%) em 21 dias de reação.

O valor de rotação óptica para a resolução do ácido citronélico foi zero, tanto para o éster quanto para o ácido restante.

Para os ácidos (±)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico, (±)-canforcarboxílico e D,L-mandélico não foi observado reação de esterificação com o n-pentanol quando a CCL foi imobilizada em crisotila e utilizada como catalisador em meio orgânico. O ácido (±)-canforcarboxílico possui um anel de norboneno, que é uma estrutura grande e rígida que provavelmente não se encaixa adequadamente no sítio ativo da enzima. Isso explica porque este ácido não reage via catálise enzimática com a CCL. Os ácidos (±)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico e D,L-mandélico tem na sua estrutura um anel aromático que deve também interferir na orientação estrutural dos substratos para efetuar a catálise enzimática.

Cambou e Klibanov¹⁵ demonstraram para a resolução do ácido (±)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico que a esterificação direta não é favorável devido a inibição da enzima causada por uma diminuição do pH do meio. Por outro lado, a redução na concentração do ácido ou substituição de um álcool com menor cadeia hidrocarbônica (n-butanol) por um com maior (n-octanol) não resultou em uma síntese apreciável do éster.

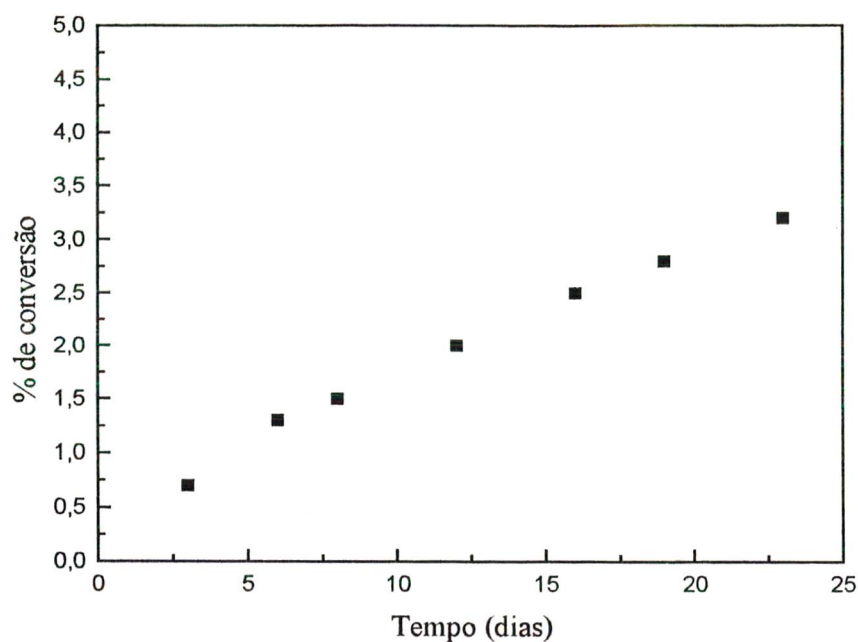


Figura 33 - Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (±)-citronílico com o n-pentanol catalisada pela CCL imobilizada em crisotila a 25°C, acompanhado por ^1H RMN, 25°C.

De uma maneira geral, a CCL imobilizada em crisotila demonstrou que pode ser utilizada para a esterificação enantiosseletiva de ácidos racêmicos, porém, com restrições quanto a estrutura do substrato ácido.

A seguir, serão discutidos os resultados obtidos para a esterificação enantiosseletiva da lipase de *Chromobacterium viscosum* imobilizada em organo-gel e aplicada na resolução dos ácidos racêmicos das Tabelas 5 e 6.

3.2.2 Resolução dos Ácidos Racêmicos via Esterificação Catalisada pela Lipase de *Chromobacterium viscosum* Imobilizada em Organo-gel

3.2.2.1 Resolução dos ácidos (\pm)-2 e (\pm)-3-metil-alcanóicos e (\pm)-2-etil-hexanóico

A Figura 34 mostra o grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico (2) com os álcoois alifáticos n-pentanol, n-octanol e n-undecanol. Pode-se observar que o grau de conversão diminui com o aumento da cadeia do álcool, sendo que estes resultados são similares aos obtidos para a CCL imobilizada em crisotila.

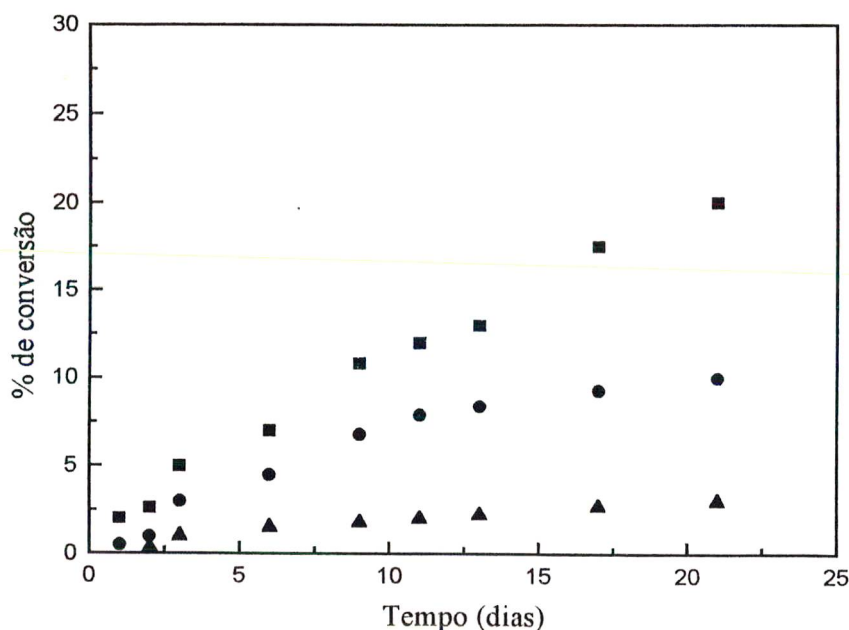


Figura 34 - Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com [■] n-pentanol, [●] n-octanol, [▲] n-undecanol catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel, a 25°C.

Os resultados obtidos para a esterificação enantiosseletiva do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico podem ser observados nas Tabelas 19 e 20. A CVL imobilizada em organo-gel mostrou preferência na esterificação pelo enantiômero com rotação óptica positiva (+). Os valores de excessos enantioméricos para os ésteres formados ficaram na faixa de 54 a 75%,

e para os ácidos restante foram menores que 30%. Observou-se que quando aumenta a cadeia do álcool ocorre uma diminuição acentuada no grau de conversão, e um aumento no excesso enantiomérico do éster formado e do ácido restante. A razão enantiomérica (*E*) também aumentou com o aumento do excesso enantiomérico do produto ($ee_p = 75\%$ para $E = 9,0$).

Tabela 19 - Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel^a.

Álcool	% de Conversão	$[\alpha]_D^{25}$ éster (c, éter) ^c	$[\alpha]_D^{25}$ ácido reativo ^b (c, éter)	$[\alpha]_D^{25}$ ácido não reativo (c, éter)
n-pentanol	20,0	+ 4,0 (9)	+ 3,0 (8)	- 1,8 (10)
n-octanol	10,0	+ 6,4 (11)	+ 3,4 (10)	- 1,4 (4)
n-undecanol	3,0	+ 5,0 (10)	+ 4,2 (8)	- 2,0 (4)

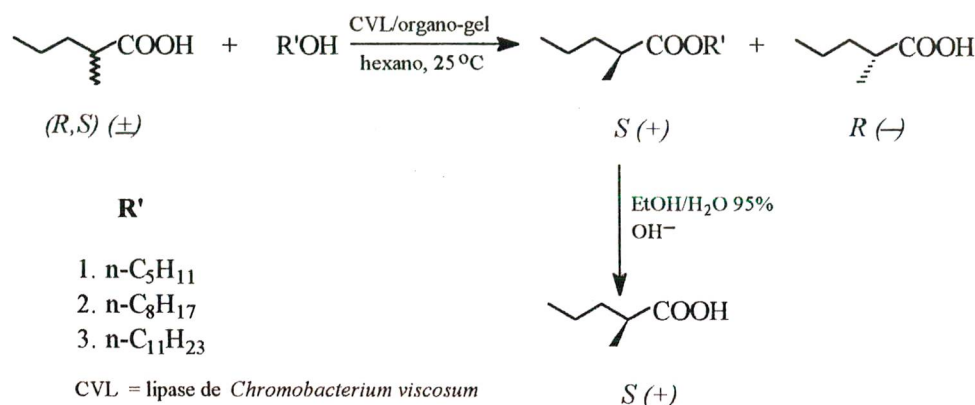
(a) Condições da reação: tempo de 21 dias, 0,03 moles de substratos (1:1), solvente hexano, 25°C; (b) ácido derivado da hidrólise básica do éster; (c) c é a concentração da amostra em g/100 mL.

Tabela 20 - Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel^a.

Álcool	% de Conversão	ee_s (%) ^a	ee_p (%) ^b	<i>E</i> ^c
n-pentanol	20,0	25	54	4,0
n-octanol	10,0	20	61	5,0
n-undecanol	3,0	29	75	9,0

(a) ee_s é o excesso enantiomérico do isômero ácido não reativo; (b) ee_p é o excesso enantiomérico do isômero ácido reativo derivado da hidrólise básica do éster; (c) *E* é a razão enantiomérica calculada pela equação $E = \ln [(1 - c).(1 - ee_s)] / \ln [(1 - c).(1 + ee_s)]$ onde $c = ee_s / ee_s + ee_p$ [ref. 5, 7].

Por comparação com o trabalho de Hinze e col.¹⁵⁷, pode-se atribuir a configuração absoluta para a esterificação enantiosseletiva do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico na reação catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel (**Esquema VII**).



Esquema VII

O ácido (\pm)-3-metil-pentanóico não foi resolvido pela CVL imobilizada em organo-gel, formando ésteres com os álcoois alifáticos, porém com valores de rotação óptica igual a zero. (**Tabela 21**). Estes resultados são similares com os obtidos quando a CCL foi imobilizada em crisotila.

Tabela 21 - Medidas de rotação óptica dos produtos de reação do ácido (\pm)-3-metil-pentanóico com diferentes álcoois catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel^a.

Álcool	% de Conversão	$[\alpha]_D^{25}$ éster (c, éter) ^c	$[\alpha]_D^{25}$ ácido reativo ^b (c, éter)	$[\alpha]_D^{25}$ ácido não reativo (c, éter)
n-pentanol	29,0	0,0 (6)	—	0,0 (7)
n-octanol	12,0	0,0 (4)	—	0,0 (7)
n-undecanol	3,0	0,0 (3)	—	0,0 (8)

(a) Condições da reação: tempo de 21 dias, 0,03 moles de substratos (1:1), solvente hexano, 25°C; (b) ácido derivado da hidrólise básica do éster; (c) c é a concentração da amostra em g/100 mL.

Quando utilizou-se o ácido aquiral 4-metil-pentanóico, verificou-se que na esterificação com diferentes álcoois alifáticos a conversão foi maior para o ácido 4-metil-pentanóico seguido dos ácidos (\pm)-3-metil-pentanóico e (\pm)-2-metil-pentanóico. Assim, a medida que o grupo metila se afasta do centro reacional o rendimento em éster formado aumenta evidenciando a importância de efeitos estéricos em reações biocatalisadas conforme discutido anteriormente. Quando se aumenta a cadeia carbônica do álcool de 5 para 11 átomos de carbonos, esta diferença em rendimento diminui (**Tabela 22**).

Este resultado difere do obtido para a CCL imobilizada em crisotila onde para o ácido (\pm)-2-metil-pentanóico obteve-se melhor rendimento que o (\pm)-3-metil-pentanóico. Pode-se então postular que a estrutura do sítio catalítico da CCL e da CVL são diferentes.

Tabela 22 - Porcentagem de conversão para os ésteres formados na reação dos ácidos (\pm)-2-metil-pentanóico, (\pm)-3-metil-pentanóico e 4-metil-pentanóico com álcoois alifáticos catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel^a.

Álcool	(\pm)-2-metil-pentanóico % de conv. p/ éster	(\pm)-3-metil-pentanóico % de conv. p/ éster	4-metil-pentanóico % de conv. p/ éster
n-pentanol	20,0	29,0	60,0
n-octanol	10,0	12,0	14,0
n-undecanol	3,0	3,0	12,0

a) 21 dias de reação, hexano, 25°C.

Para o ácido (\pm)-2-etil-hexanóico também não foi observado a reação de esterificação. Novamente faz-se menção aqui para a importância de um encaixe adequado do substrato no sítio catalítico e de posicionamento da enzima para que a catálise seja efetiva.

Quando foi utilizado o ácido (\pm)-2-metil-hexanóico, observou-se que a conversão foi mais rápida não ocorrendo uma diferença significativa quando a cadeia do álcool aumentou de 5 (n-pentanol) para 11 (n-undecanol) átomos de carbono (**Figura 35**).

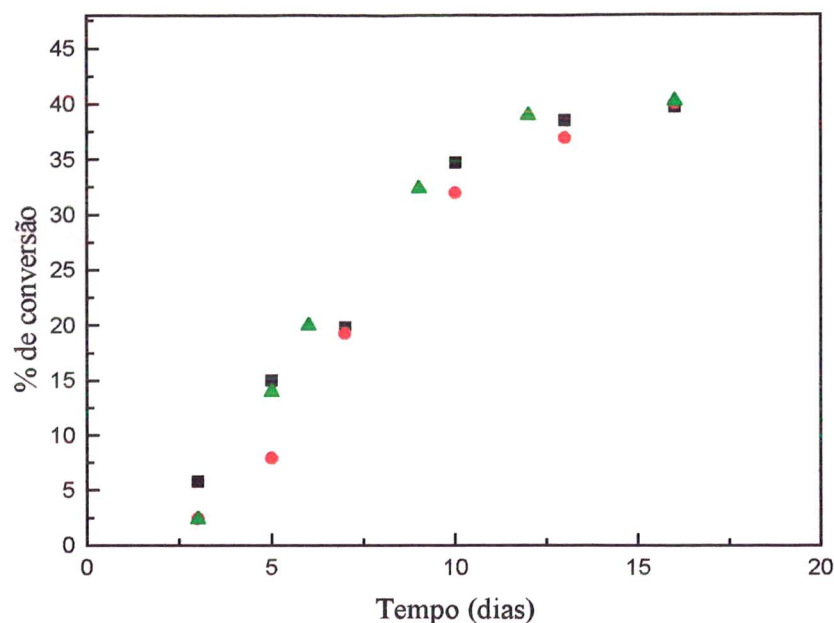


Figura 35 - Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (±)-2-metilhexanóico com [■] n-pentanol, [●] n-octanol, [▲] n-undecanol catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel.

Os valores de excesso enantiomérico e enantiosseletividade foram baixos quando comparados com os valores para a resolução do ácido (±)-2-metil-pentanóico neste sistema (Tabelas 23 e 24).

Tabela 23 - Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (±)-2-metilhexanóico com diferentes álcoois catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel^a.

Álcool	% de Conversão	$[\alpha]_D^{25}$ éster (c, éter) ^c	$[\alpha]_D^{25}$ ácido reativo ^b (c, éter)	$[\alpha]_D^{25}$ ácido não reativo (c, éter)
n-pentanol	39,7	+ 8,2 (7)	+ 9,8 (4)	- 3,6 (2)
n-octanol	40,0	+ 7,0 (9)	+ 10,4 (5)	- 6,0 (5)
n-undecanol	40,2	+ 7,5 (12)	+ 10,6 (4)	- 3,0 (13)

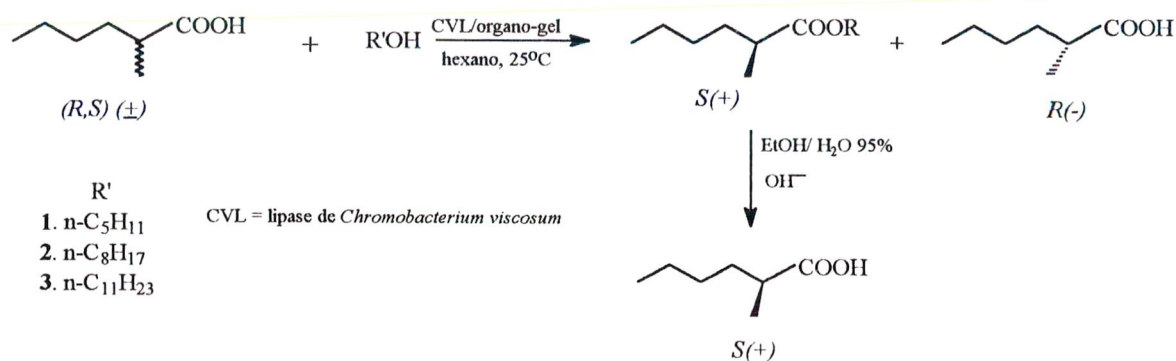
(a) Condições da reação: tempo de 21 dias, 0,03 moles de substratos (1:1), solvente hexano, 25°C; (b) ácido derivado da hidrólise básica do éster; (c) c é a concentração da amostra em g/100 mL.

Tabela 24 - Medidas dos excessos enantioméricos dos produtos da reação do ácido (±)-2-metil-hexanóico com diferentes álcoois catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel^a.

Álcool	% de Conversão	ee _s (%) ^a	ee _p (%) ^b	E ^c
n-pentanol	39,7	24	50	3,8
n-octanol	40,0	39	53	4,7
n-undecanol	40,2	20	54	4,1

(a) ee_s é o excesso enantiomérico do isômero ácido não reativo; (b) ee_p é o excesso enantiomérico do isômero ácido reativo derivado da hidrólise básica do éster; (c) E é a razão enantiomérica calculada pela equação $E = \ln [(1 - c) \cdot (1 - ee_s)] / \ln [(1 - c) \cdot (1 + ee_s)]$ onde $c = ee_s / ee_s + ee_p$ [ref. 5, 7].

A CVL mostrou ser enantiosseletiva neste sistema para o enantiômero com rotação óptica positiva. O **Esquema VIII** mostra a resolução do ácido (±)-2-metil-hexanóico catalisada pela CVL imobilizada em organo-gel.



Esquema VIII

Os melhores resultados obtidos para a CVL imobilizada em organo-gel e aplicada na resolução dos ácidos racêmicos (±)-2 e 3-metil-alcanóicos foram com o ácido (±)-2-metil-pentanóico.

3.2.2.2 - Resolução dos ácidos (\pm)-2-bromo-alcanóicos

Em trabalhos anteriores o organo-gel demonstrou ter duas limitações básicas quanto ao seu uso como suporte para a imobilização de enzimas e aplicações em meio orgânico. A primeira limitação é a temperatura do meio reacional, sendo que acima de 28°C este se dissolve. A segunda está relacionada com a polaridade do solvente e substratos utilizados, sendo que os muito polares atacam a estrutura do gel destruindo-o.

Assim, inicialmente foram feitos testes de resistência do organo-gel frente aos reagentes bromados. Observou-se que o organo-gel é afetado pelos substratos levando a sua destruição completa. A velocidade de destruição do gel ocorreu na ordem que quanto menor a cadeia hidrocarbônica do ácido, mais rápido a destruição. Portanto, não foi possível trabalhar com os ácidos (\pm)-2-bromo-pentanóico, (\pm)-2-bromo-hexanóico e (\pm)-2-bromo-octanóico no sistema de organo-gel.

3.2.2.3 - Resolução dos ácidos (\pm)-citronélico, (\pm)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico (\pm)-canforcarboxílico e ácido D,L-mandélico

Foi avaliada a esterificação enantiosseletiva do ácido (\pm)-citronélico com o n-pentanol, de acordo com o procedimento geral descrito na parte experimental. A **Figura 36** mostra o grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-citronélico com o n-pentanol, sendo que os resultados obtidos de excesso enantioméricos e razão enantioméricas estão demonstrados na **Tabela 25**.

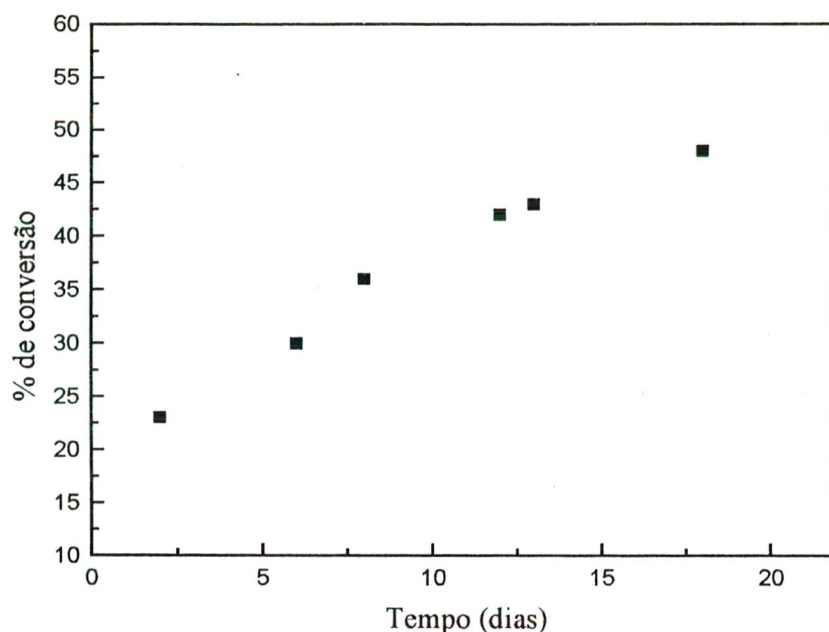


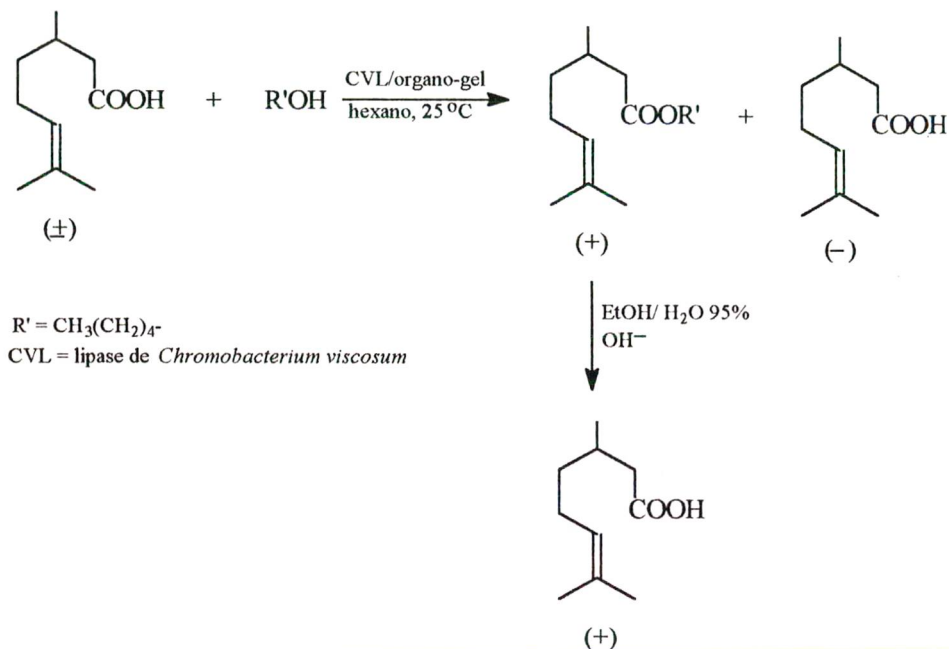
Figura 36 - Grau de esterificação em função do tempo para a reação do ácido (\pm)-citronílico com o n-pentanol catalisada pela lipase de CVL imobilizada em organo-gel.

Tabela 25 - Medidas de rotação óptica dos produtos da reação do ácido (\pm)-citronílico com n-pentanol^a.

Álcool	n-pentanol
% de Conversão	48,0
$[\alpha]_D^{25}$ éster (c, éter)	+ 2,0 (12)
$[\alpha]_D^{25}$ ácido reativo ^b (c, éter)	+ 3,8 (1)
$[\alpha]_D^{25}$ ácido não reativo (c, éter)	- 2,3 (6,2)
ee_s (%) ^c	29
ee_p (%) ^d	48
E^e	3,8

(a) Condições da reação: tempo de 21 dias, 0,03 moles de substratos (1:1), lipase de *Chromobacterium viscosum* imobilizada em organo-gel, solvente hexano, 25°C; (b) ácido derivado da hidrólise básica do éster. (c) ee_s é o excesso enantiomérico do isômero ácido não reativo; (d) ee_p é o excesso enantiomérico do isômero ácido reativo derivado da hidrólise básica do éster; (e) E é a razão enantiomérica calculada pela equação $E = \ln [(1 - c).(1 - ee_s)] / \ln [(1 - c).(1 + ee_s)]$ onde $c = ee_s / ee_s + ee_p$ [ref. 5, 7].

A CVL mostrou preferência pelo enantiômero com rotação óptica positiva. Um valor de 48% de excesso de produto foi obtido sendo a razão enantiomérica para esta resolução de apenas 3,8. A **Esquema IX** representa a resolução do ácido (\pm)-citronílico via esterificação com n-pentanol.



Esquema IX

Para o ácido (\pm)-canforcarboxílico não foi observado a reação de esterificação enquanto que o ácido D,L-mandélico destruiu o organo-gel, mostrando que este não é um bom substrato para ser utilizado neste sistema. O ácido (\pm)-2-(p-clorofenoxi)-propiónico formou o produto com 10,3% de conversão em 21 dias de reação com o n-pentanol. Porém, o valor de rotação óptica obtido para os produtos foi igual a zero.

Portanto, o Organo-gel tem suas limitações, mas pode ser utilizado com êxito como suporte para a imobilização de enzimas e aplicado na resolução de ácidos racêmicos apolares.

3.3 Comparação da Resolução dos Ácidos Racêmicos nos Sistema de CCL/Crisotila e CVL/Organo-Gel com Dados da Literatura

Um catalisador quirial é considerado eficiente quando reúne seletividade para efetivação da catálise, baixo custo, e pode ser reutilizado por um período relativamente longo.

É conhecido que as enzimas são catalisadores quirais pois são formados por unidades de L-aminoácidos e as velocidades das reações catalisadas podem ser até 10^{12} vezes mais rápidas do que as reações correspondentes não catalisadas. São geralmente muito seletivas em termos dos tipos de reações catalisadas, com relação à estrutura e estereoquímica do substrato e do produto.

Trabalhos recentes tem demonstrado que a seletividade das lipases pode ser afetada pelo solvente, suporte quando imobilizadas, pH e temperatura.¹⁵⁸⁻¹⁶²

Considerando os resultados obtidos para a resolução dos ácidos (\pm)-2-metil-pentanóico observa-se que a CCL (1010 unidades/ mg de sólido) imobilizada em crisotila (140 mg em 1g de crisotila) apresentou resultados melhores de excesso enantiomérico para os produtos (75-80%) do que a CVL (3970 unidades/ mg de sólido) imobilizada em organo-gel (5 mg em 20g de gel) (54-75%).

Engel e col. demonstraram que quando 500 mg de CCL (750 unidades/mg de sólido) é adicionada em solvente orgânico (heptano) e utilizada na catalise do ácido racêmico (\pm)-2-metil-pentanóico com os álcoois alifáticos n-octanol e n-octadecanol a 25°C, os valores de excesso enantiomérico para o (R)-ácido foram de 79,5 e 72,3% e para o (S)-éster foram de 93,3 e 88,3% respectivamente.^{68,70}

Para o ácido (\pm)-2-metil-hexanóico foi observado um aumento de 70,1 a 84,0% de excesso enantiomérico para o (R)-ácido; e de 58,4 a 84,0% para o (S)-éster quando se utiliza n-butanol, n-octanol, n-decanol e n-octadecanol como álcoois. Engel obteve bons resultados demonstrando que os valores de excessos enantiomérico aumentam com o aumento da cadeia carbônica do álcool para o ácido (\pm)-2-metil-hexanóico.^{68,70}

Tanto no sistema da CCL/crisotila bem como no sistema de CVL/organo-gel, foi observado um aumento no excesso enantiomérico com o aumento da cadeia carbônica do

álcool. Porém, foram obtidos valores menores de excessos enantioméricos daqueles obtido por Engel.

Quando a enzima é utilizada em suspensão ela não pode ser reutilizada como no caso da enzima imobilizada. Além disto, a quantidade de biocatalisador utilizado é bem maior do que quando imobilizada.

Kirchner e col.⁸⁰ utilizaram 2,0g de CCL (2415 unidades/ mg de sólido) em suspensão em hexano (30°C) na resolução dos ácidos (\pm)-2-bromo-propanóico, (\pm)-2-bromo-hexanóico e (\pm)-2-bromo-hexadecanóico, obtendo excessos enantioméricos na faixa de 95-99% por um período de reação 6 a 22 horas. O ácido (\pm)-2-(p-clorofenoxi) propiônico que não reagiu quando a CCL foi imobilizada em crisotila, também foi resolvido por Kirchner com CCL em suspensão, obtendo-se o éster com 79% de excesso enantiomérico e o ácido restante com 65%. Neste caso observa-se que além da grande quantidade de enzima utilizada, a pureza da enzima pode estar sendo o fator determinante para os bons resultados obtidos por Kirchner.

Hinze e col.¹⁵⁷ utilizaram a lipase de *Chromobacterium viscosum* (CVL) imobilizada em organo-gel para a resolução do ácido (\pm)-2-metil-butanóico em heptano, deixando reagir por 21 dias com etanol. O produto foi obtido com grau de conversão de 41%, 22,2% de excesso enantiomérico de ácido e 31,7% do éster. Utilizando a CCL (1,70g) em suspensão e após 8 horas de reação, com um grau de conversão de 53%, obteve-se o éster com 31,6% de excesso enantiomérico e o ácido não reativo com 38,4%.

Estes resultados foram similares com os de Engel para a resolução do ácido (\pm)-2-metil-butanóico, obtendo em 50% de conversão 34,4% de excesso para o (R)-ácido e 34,4% para o (S)-éster (E=3). Quando a CCL foi imobilizada em crisotila os valores obtidos em 34,5% de conversão foram: $ee_s = 42$, $ee_p = 40$ e $E = 3,5$. Engel demonstrou que um aumento na cadeia do álcool aumenta pouco os valores de excessos enantioméricos na resolução do ácido (\pm)-2-metil-butanóico não sendo superior a 52%.⁶⁸

Apesar da CCL e CVL estarem imobilizadas em suportes diferentes e possuírem diferentes atividades, não foi observado separação dos enantiômeros para a resolução do ácido (\pm)-3-metil-pentanóico bem como a formação de produtos na reação do ácido (\pm)-2-etil-hexanóico. Isso mostra a similaridade destas enzimas com relação ao sítio catalítico, sendo que a seletividade é uma propriedade intrínseca dos catalisadores.

A comparação com dados da literatura demonstram claramente que o uso do organo-gel e crisotila para a imobilização de enzimas são métodos viáveis para realizar reações catalisadas por enzimas em meio orgânico.

3.4 Outros Métodos de Análise Utilizados na Determinação do Excesso Enantiomérico dos Ésteres Obtidos Experimentalmente

Sabe-se que a polarimetria é um método que utiliza o valor de rotação óptica para determinar o excesso enantiomérico de uma amostra. Existem questionamentos na literatura quanto a exatidão dos resultados obtidos por este método haja vista que pequenas impurezas podem interferir no resultado final. Afim de confirmar os valores de excessos enantioméricos obtidos para as esterificações enantiosseletivas dos ácidos racêmicos descritos nas **Tabelas 5 e 6**, foi empregado as técnicas de cromatografia com coluna quiral e ^1H RMN utilizando um agente de deslocamento quiral, para alguns ésteres obtidos experimentalmente.

Pelo método de ressonância magnética de próton foi utilizado o sal de Európio quiral tris[3-(heptafluoropropilhidroximetileno)-(+)-canforato] de Európio. Este foi adicionado em quantidades previamente pesadas nas amostras e feitas análises de RMN de próton observando-se o deslocamento dos picos em toda a extensão do espectro obtido. A primeira amostra utilizada foi o éster racêmico (\pm)-2-metil-pentanoato de n-pentila e observado um pequeno deslocamento dos picos. Foi adicionado como complemento o agente de deslocamento aquiral $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (tris-(6,6,7,7,8,8,8-heptafluor-2,2-dimetil-3,5-octanodionato de európio) outro sal de európio esperando que este associado ao primeiro melhorasse a resolução do espectro evidenciando melhor os picos. O resultado não foi muito promissor, ocorrendo o deslocamento dos picos mas não a sua separação. Quando se utilizou os ésteres obtidos pela esterificação enantiosseletiva dos ácidos racêmicos das **Tabelas 5 e 6** catalisados pela CCL e CVL, também foi observado o deslocamento dos picos, porém nenhuma evidência de separação.

Como os resultados obtidos de ^1H RMN não foram promissores, recorreu-se então ao método da cromatografia gasosa, utilizando uma coluna capilar quiral empacotada com Lipodex E (octakis-(3-O-butil-2,6-di-O-pentil)-8-ciclodextrina) acoplado a um espectrofotômetro de massa. O éster racêmico (\pm)-2-metil-pentanoato de n-pentila e os

ésteres (+)-2-metil-pentanoato de n-pentila, n-octila e n-undecila e o éster (-)-2-bromo-octanoato de n-pentila foram analisados. Para as amostras citadas acima, não foi observado separação de picos do éster racêmico no cromatograma, mostrando apenas um pico-base em 144 e os fragmentos 115, 177 e 187 de massa. As demais amostras apresentaram apenas um pico no cromatograma sendo os valores obtidos para o éster (+)-2-metil-pentanoato de n-pentila idênticos aos encontrados para o éster racêmico. Para o éster (+)-2-metil-pentanoato de n-octila obteve-se um pico base em 118 e os fragmentos principais em 174, 228 e 268. Para o éster (+)-2-metil-pentanoato de n-undecila obteve-se também um pico base em 118 e fragmentos principais 257 e 271, e para o éster (-)-2-bromo-octanoato de n-pentila verificou-se um pico base em 225 e os fragmentos principais em 252, 276 e 292. Em nenhum caso foi observado mais de um pico nos cromatogramas.

Sendo assim, não foi possível fazer uma comparação deste método com outros bem como comprovar os valores encontrados de excessos enantioméricos por polarimetria para a resolução dos ácidos racêmicos.

3.5 Caracterização dos Produtos

Abaixo estão os dados espectroscópicos para cada éster e ácidos obtidos via resolução enzimática, com seus respectivos valores de desvio de rotação óptica.

- **(+)-2-metil-pentanoato de n-pentila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,5 (m, 1H, CH), 1,2-1,8 (m, 10H, CH_2), 1,1 (d, 3H, CH_3), 0,9 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); $p.E_{760}$ 209°C ; n_D^{25} 1,4130, CHN (calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$): C, 70,97; H, 11,83; O, 17,20; experimental C, 70,80; H, 11,85; O, 17,35.
- **(+)-2-metil-pentanoato de n-octila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,4 (m, 1H, CH), 1,2-1,8 (m, 16H, CH_2), 1,1 (d, 3H, CH_3), 0,9 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1735 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); $p.E_{760}$ 218°C ; n_D^{27} 1,4221, CHN (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$): C, 73,68; H, 12,28; O, 12,10; experimental C, 71,72; H, 12,26; O, 14,02.
- **(+)-2-metil-pentanoato de n-undecila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,3-2,4 (m, 1H, CH), 1,2-1,8 (m, 22H, CH_2), 1,1-1,2 (d, 3H, CH_3), 0,8-0,9 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); $p.E_{760}$ 260°C ; n_D^{25} 1,4245, CHN (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$): C, 75,56; H, 12,59; O, 11,85; experimental C, 75,29; H, 14,00; O, 12,71.
- **ácido (-)-2-metil-pentanóico:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 11,7 (s, 1H, COOH), 2,5 (m, 1H, CH), 1,5 (m, 4H, CH_2), 1,1 (d, 3H, CH_3), 1,0 (t, 3H, CH_3); IV (filme) 1708 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); CHN (calculado para $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$): C, 62,07; H, 10,34; O, 27,59; experimental C, 63,02; H, 11,12; O, 28,54.
- **ácido (+)-2-metil-pentanóico:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 11,2 (s, 1H, COOH), 2,5 (m, 1H, CH), 1,5 (m, 4H, CH_2), 1,1 (d, 3H, CH_3), 1,0 (t, 3H, CH_3); IV (filme) 1712 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); CHN (calculado para $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$): C, 62,07; H, 10,34; O, 27,59; experimental C, 60,17; H, 11,10; O, 27,87.
- **(+)-2-metil-hexanoato de n-pentila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,4-2,5 (m, 1H, CH), 1,2-1,7 (m, 12H, CH_2), 1,1 (d, 3H, CH_3), 0,9 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); n_D^{21} 1,4145.

- (+)-2-metil-hexanoato de n-octila: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,4-2,5 (m, 1H, CH), 1,2-1,8 (m, 18H, CH_2), 1,1-1,2 (d, 3H, CH_3), 0,9 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); n_D^{21} 1,4645.
- (+)-2-metil-hexanoato de n-undecila: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,4 (m, 1H, CH), 1,2-1,7 (m, 24H, CH_2), 1,1 (d, 3H, CH_3), 0,8 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); n_D^{25} 1,4743.
- ácido (-)-2-metil-hexanóico: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 10,8 (s, 1H, COOH), 2,5 (m, 1H, CH), 1,7-1,0 (m, 9H, CH_2 , CH_3), 0,7 (t, 3H, CH_3); IV (filme) 1708 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); n_D^{25} 1,4261.
- ácido (+)-2-metil-hexanóico: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 11,0 (s, 1H, COOH), 2,5 (m, 1H, CH), 1,8-1,0 (m, 9H, 3CH_2 e 1CH_3), 0,8 (t, 3H, CH_3); IV (filme) 1712 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- (+)-2-metil-butanoato de n-pentila: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1-4,3 (t, 2H, CH_2OOC), 2,5 (m, 1H, CH), 1,2-1,8 (m, 8H, CH_2), 1,1 (d, 3H, CH_3), 0,8-1,0 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- ácido (-)-2-metil-butanóico: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 10,8 (s, 1H, COOH), 2,5 (m, 1H, CH), 1,7-1,0 (m, 7H, CH_2 , CH_3), 0,7 (t, 3H, CH_3); IV (filme) 1710 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); n_D^{25} 1,4011
- ácido (+)-2-metil-butanóico: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 10,8 (s, 1H, COOH), 2,5 (m, 1H, CH), 1,7-1,0 (m, 7H, CH_2 , CH_3), 0,8 (t, 3H, CH_3); IV (filme) 1710 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); n_D^{25} 1,4010.
- (\pm)-3-metil-pentanoato de n-pentila: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,2-4,0 (t, 2H, CH_2OOC), 2,3 (d, 2H, CH_2COO), 2,1-1,8 (m, 1H, CH), 1,8-1,2 (m, 8H, CH_2), 1,2-0,8 (dt, 9H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- (\pm)-3-metil-pentanoato de n-octila: ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,2-4,0 (t, 2H, CH_2OOC), 2,3 (d, 2H, CH_2COO), 2,1-1,8 (m, 1H, CH), 1,8-1,2 (m, 8H, CH_2), 1,2-0,8 (dt, 9H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).

- **(±)-3-metil-pentanoato de n-undecila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,2-4,0 (t, 2H, CH_2OOC), 2,3 (d, 2H, CH_2COO), 2,1-1,8 (m, 1H, CH), 1,8-1,2 (m, 8H, CH_2), 1,2-0,8 (dt, 9H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- **4-metil-pentanoato de n-pentila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,3 (d, 2H, CH_2COO), 1,8-1,2 (m, 8H, CH_2 ; 1H, CH), 1,2-0,8 (dt, 9H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- **4-metil-pentanoato de n-octila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,2-4,0 (t, 2H, CH_2OOC), 2,3 (d, 2H, CH_2COO), 2,1-1,8 (m, 1H, CH), 1,8-1,2 (m, 8H, CH_2), 1,2-0,8 (dt, 9H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- **4-metil-pentanoato de n-undecila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,2-4,0 (t, 2H, CH_2OOC), 2,3 (d, 2H, CH_2COO), 2,1-1,8 (m, 1H, CH), 1,8-1,2 (m, 8H, CH_2), 1,2-0,8 (dt, 9H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- **(±)-2-bromo-pentanoato de n-pentila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1-4,4 (q, 2H, CH_2OOC e 1H, $\text{CH}(\text{Br})\text{COO}$), 1,2-2,0 (m, 10H, CH_2), 0,8-1,1 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1741 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- **(±)-2-bromo-hexanoato de n-pentila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 4,1-4,3 (q, 2H, CH_2OOC e 1H, $\text{CH}(\text{Br})\text{COO}$), 2,0 (m, 12H, CH_2), 0,7-1,0 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1741 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- **(-)-2-bromo-octanoato de n-pentila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , acetona d_6/TMS) 4,4 (t, 1H, $\text{CH}(\text{Br})\text{COO}$) 4,1-4,2 (t, 2H, CH_2OOC), 1,2-2,2 (m, 16H, CH_2), 0,8-1,0 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1742 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- **ácido (+)-2-bromo-octanóico:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 11,9 (s, 1H, COOH) 4,1-4,2 (t, 1H, $\text{CH}(\text{Br})\text{COO}$), 2,1-1,8 (q, 2H, CH_2), 1,6--1,2 (m, 8H, CH_3), 1,0-0,8 (t, 3H, CH_3); IV (filme) 1712 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).
- **ácido (-)-2-bromo-octanóico:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 10,8 (s, 1H, COOH) 4,2-4,1 (t, 1H, $\text{CH}(\text{Br})\text{COO}$), 2,1-1,8 (q, 2H, CH_2), 1,6--1,2 (m, 8H, CH_3), 1,0-0,8 (t, 3H, CH_3); IV (filme) 1710 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).

- **(+)- citronelato de n-pentila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 5,1 (t, 1H, CH), 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,4-1,8 (m, 12H, CH_2), 1,7-1,5 (d, 6H, CH_3), 1,4-1,2 (m, 1H, CH), 1,0-0,8 (q, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} (C=O).
- **ácido (+)-citronelico:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 10,8 (s, 1H, COOH), 5,2 (t, 1H, CH), 2,4-1,8 (m, 6H, CH_2), 1,8-1,5 (d, 6H, CH_3), 1,4-1,2 (m, 1H, CH), 1,0-0,8 (q, 3H, CH_3); IV (filme) 1710 cm^{-1} (C=O).
- **ácido (-)-citronelico:** ^1H RMN (δ_{ppm} , CDCl_3/TMS) 10,8 (s, 1H, COOH), 5,2 (t, 1H, CH), 2,4-1,8 (m, 6H, CH_2), 1,8-1,5 (d, 6H, CH_3), 1,4-1,2 (m, 1H, CH), 1,0-0,8 (q, 3H, CH_3); IV (filme) 1708 cm^{-1} (C=O).
- **(±)-2-(p-clorofenoxi)-propionato de n-pentila:** ^1H RMN (δ_{ppm} , acetona d_6/TMS) 7,2-6,7 (dd, 4H, p- $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{O}$) 4,7-4,8 (d, 1H, CH), 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 1,8-1,0 (m, 6H, CH_2), 0,8-1,0 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1758 cm^{-1} (C=O), 1596 cm^{-1} (C=C, aromático).

3.6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se então fazer algumas considerações finais a respeito da imobilização da lipase de *Candida cylindracea* em crisotila e da lipase de *Chromobacterium viscosum* em organo-gel e suas aplicações na resolução de ácidos racêmicos. As principais conclusões são:

- ⇒ A crisotila demonstrou ser um bom suporte para a imobilização da CCL, sendo a que melhor temperatura de adsorção foi 25°C com um tempo de saturação de 120 minutos para uma concentração de CCL de 2,0 mg/mL. O máximo de enzima adsorvida foi de 70% e quando a concentração é aumentada, observou-se que a porcentagem de adsorção diminui.
- ⇒ Os estudos de isotermas de adsorção demonstraram que a adsorção da CCL na crisotila não segue a equação de Langmuir e apresenta uma baixa afinidade para a isoterma de Freundlich. A forma sigmoideal da isoterma de adsorção obtida a 25°C confirma a formação de múltiplas camadas de enzimas no processo de adsorção.
- ⇒ O comportamento das isotermas associado a baixa energia de ativação encontrada (4,0 kcal/mol), baixo valor de entalpia de ativação (3,0 kcal/mol), além de um valor de entropia negativo demonstra que o tratamento que deve ser dado ao estudo da adsorção para entender melhor como se processa essa interação entre a enzima e o suporte deve ser mais complexo e aprofundado. Além do mais, fica caracterizado pelos resultados obtidos, que a adsorção é física.
- ⇒ Estudos do MEV demonstraram a superfície da crisotila é irregular e fibrosa sendo que, quando a CCL é adsorvida sobre a superfície ocorre uma perda da estrutura fibrosa em determinadas regiões.

- ⇒ Quando a CCL é imobilizada em crisotila e aplicada na resolução de ácidos racêmicos, este sistema demonstrou preferência pelo enantiômero com rotação óptica positiva no caso dos ácidos (\pm)-2-metil-alcanóicos e rotação óptica negativa no caso do ácido (\pm)-2-bromo-octanóico. Os valores de enantiosseletividade foram baixos (<11) sendo que os melhores valores de excessos enantioméricos foram obtidos para a resolução do ácido (\pm)-2-metil-pentanóico.
- ⇒ A lipase de *Chromobacterium viscosum* (CVL) imobilizada em organo-gel demonstrou também preferência pelo enantiômero com rotação óptica positiva para os ácidos (\pm)-2-metil-alcanóicos e (\pm)-citronélico.
- ⇒ Os melhores resultados para a CVL foram obtidos com o ácido (\pm)-2-metil-pentanóico (ee_p variou de 54 - 75%). Porém, o maior grau de conversão nos experimentos foi obtido com o ácido (\pm)-2-metil-hexanóico e diferentes álcoois alifáticos (39,7 - 40,2%).

Finalmente, a partir destes resultados, pode-se verificar que tanto a crisotila como o organo-gel são métodos viáveis e muito atrativos para realizar reações enzimáticas em meio orgânico. Quanto aos baixos valores de excessos enantioméricos encontrados, estes talvez possam ser superados utilizando enzimas mais puras ou através de reações de transesterificação ou hidrólise dos respectivos ésteres racêmicos.

4. Referências Bibliográficas

1. MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; *HARPER: Bioquímica*, Atheneus, SP, 6^o ed., cap. 7, 1990.
2. (a) BLOW, D. M.; "Structure and Mechanism of Chymotrypsin", *Acc. Chem. Res.*, 9, 145, 1976. (b) MORRISON, R. T.; BOYD, R. N.; *Organic Chemistry*, Allyn and Bacon, Boston, 5^o ed., cap. 41, p.1381, 1990.
3. JONES, J. B.; "Enzymes in Organic Synthesis", *Tetrahedron*, 42, 3351, 1986.
4. FABER, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3rd Edition, Spring-Verlag, New York, 1997.
5. CHEN, C. S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J.; "Quantitative Analysis of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers", *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7294, 1982.
6. 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.
7. 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.
8. CHEN, C. S.; SIH, C. J.; "General Aspects and Optimization of Enantioselective Biocatalysis in Organic Solvents: The Use of Lipase". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 28, 695, 1989.
9. KLIBANOV, A. M.; "Asymmetric Transformations Catalyzed by Enzymes in Organic Solvents", *Acc. Chem. Res.* 23, 114, 1990.
10. CAMBOU, B.; KLIBANOV, A. M.; "Preparative Production of Optically Active Esters and Alcohols Using Esterase-Catalyzed Stereospecific Transesterification in Organic Media", *J. Am. Chem. Soc.* 106, 2687, 1984.
11. RIVAS, S.; CHOPINEAU, J.; KIEBOOM, A. P. G.; KLIBANOV, A. M.; "Protease-Catalyzed Regioselective Esterification of Sugar and Related Compounds in Anhydrous Dimethylformamide", *J. Am. Chem. Soc.* 110, 584, 1988.
12. MARGOLIN, A. L.; KLIBANOV, A. M.; Peptide Synthesis Catalyzed by Lipases in Anhydrous Organic Solvents, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3802, 1987.

13. CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A.; "Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases", *Quím. Nova*, 18, 544, 1995.
14. GUTMAN, A. L.; ZUOBI, K.; GUIBE, J. E.; "Lipase Catalyzed Hydrolyses of γ - Substituted α -Aminobutyrolactones", *Tetrahedron Lett.*, 31, 2037, 1990.
15. CAMBOU, B.; KLIBANOV, A. M.; "Comparison Different Strategies for the Lipase - Catalyzed Preparative Resolution of Racemic Acids and Alcohols: Asymmetric Hydrolysis Esterification, and Transesterification", *Biotechnol. and Bioeng.*, 26, 1449, 1984.
16. 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.
17. MELTZ, M.; SACCOMANO, N. A.; "Lipase Mediated Optical Resolution of Bicyclic Secondary Carbinols", *Tetrahedron Lett.* 33, 1201, 1992.
18. BARTH, S.; EFFENBERGER, F.; "Lipase-Catalyzed Resolution of Racemic 2-Alkyl Substituted 1-Alkanols", *Tetrahedron Asymmetry*, 4, 823, 1993.
19. TAKARATA, H.; UCHIDA, Y.; TAKEFUMI, M.; Transesterification - Based Enzymatic Resolution of Racemic 3-Hydroxy-4-Pentenyl-Urethanes in Organic Solvents", *Tetrahedron Lett.*, 33, 3331, 1992.
20. DJEGHABA, Z.; DELEUZE, H.; DEJESO, B.; MESSADI, D.; MAILLARD, B.; "Enzymes in Organic Synthesis VII: Enzymatic Acylation of Amines", *Tetrahedron Lett.*, 32, 761, 1991.
21. TUCCIO, B.; FERRE, E.; COMEAU, L.; Lipase-Catalyzed Synthesis n-Octyl - Alkylamides in Organic Media", *Tetrahedron Lett.*, 32, 2763, 1991.
22. BRIEVA, R.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V.; "Enzymatic Synthesis of Amides with Two Chiral Centres". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1386, 1990.
23. REBOLLEDO, F.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. "Enzymatic Synthesis of Propargylamides". *Tetrahedron Lett.*, 30, 5345, 1989.
24. GOTOR, V.; BRIEVA, R.; REBOLLEDO, F.; "A Simple Procedure for the Preparation of Chiral Amides". *Tetrahedron Lett.*, 29, 6973, 1988.
25. POHL, T.; WALDMANN, H.; "Enzymatic Synthesis of A Characteristic Phosphorylated and Glicosylated Peptide Fragment of the Large Subunit of Mammalian RNA Polymerase II", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35(15), 1720, 1996.

26. CARRERA, G.; "Biocatalysis in Water-Organic Solvents Two-Phase Systems", *Trends in Biotechnol.*, 2, 102, 1984.
27. SUGAI, T.; OHSAWA, S.; YAMADA, H.; OHTA, H.; "Preparation of Enantiomerically Enriched Compound Using Enzymes; VII. A Synthesis of Japanese Beetle Pheromone Utilizing Lipase-Catalyzed Enantioselective Lactonization", *Synthesis*, 1112, 1990.
28. MAKITA, A.; NIHIRA, T.; YAMADA, Y.; "Lipase Catalyzed Synthesis of Macrocyclic Lactones in Organic Solvents", *Tetrahedron Lett.*, 28, 805, 1987.
29. WONG, C.; WHITESIDES, M.; *Enzymes in Organic Chemistry*, Pergamon, 12, 70, 1994.
30. BROZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, U.; et. al.; "A Model for Interfacial Activation in Lipase Form Structure of Fungal Lipase - Inhibitor Complex", *Nature*, 351, 491, 1991.
31. HATA, Y., MATSURA, Y., TANAKA, N. et al. "Low Resolution Crystal Structure of Lipase from *Geotrichum candidum*", *J. Biochem.*, 86, 1821, 1979.
32. LANG, B. D.; HAALCK, L.; HOTMAMM, B.; HEICHT, H. J.; SPENER, F.; SCHMID, R. D.; SCHOMBURG, D.; "Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of a Lipase from *Chromobacterium viscosum*", *Acta Cryst. D50*, 225, 1994.
33. ENNIS, M. D.; OLD, D. W.; "Enzymatic Resolution of 2-Hydroxymethyl-1,4 Benzodioxanes", *Tetrahedron Lett.* 33, 6283, 1992.
34. MARGOLIN, A. L.; *Chemtech*, 160, 1991.
35. 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.
36. 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.
37. BIANCHI, D.; BOSETTI, A.; CESTI, P.; GOLINI, P.; "Enzymatic Resolution of 1,2 Diols: Preparation of Optically Pure Dropropizine". *Tetrahedron Lett.*, 33, 3231, 1992.
38. 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.

39. 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.
40. LANGRAND, G.; BARATTI, J.; BUON, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; "Lipase Catalyzed Reactions and Strategy for Alcohol Resolution", *Tetrahedron Lett.*, 27, 29, 1986.
41. FABER, K.; RIVA, S.; "Enzyme-Catalyzed Irreversible Acyl Transfer", *Synthesis*, 10, 895, 1992.
42. 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.
43. TOONE, E. J.; JONES, B.; "Enzymes in Organic Synthesis 49. Resolutions of Racemic Monocyclic Ester with *Pig Liver Esterase*", *Tetrahedron Asymmetry*, 2, 207, 1991.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. SONNET, P. E.; "Kinetic Resolutions of Aliphatic Alcohols with a Fungal Lipase from *Mucor Miehei*", *J. Org. Chem.*, 52, 3477, 1987.
48. 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.
49. CHEN, C. S.; LIU, Y. C.; "Amplification of Enantioselectivity in Biocatalyzed Kinetic Resolution of Racemic Alcohols", *J. Org. Chem.*, 56, 1966, 1991.
50. 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.

51. 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.
52. FERRABOSCHI, P.; CASATI, S.; GRISENTI, P.; SANTANIELLO, E.; "Enantioselective *Pseudomonas fluorescens* (P. cepacia) Lipase-Catalysed Irreversible Transesterification of 2-Methyl-1,2,-Diols in Organic Solvents", *Tetrahedron Asymmetry*, 5, 1921, 1994.
53. KARO, K.; NEGI, S.; KAWASHIMA, A.; NAKAMURA, K.; "Optical Resolution of 1- Arylethanol Using Transesterification Catalyzed by Lipases", *Enantiomer*, 2, 261, 1997.
54. 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.
55. 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.
56. ORRENIUS, C.; OHRNER, N.; ROTTICCI, D.; MATTSON, A.; HULT, K.; NORIN, T.; "*Candida antarctica* Lipase B Catalysed Kinetic Resolution: Substrate Structure Requirements for the Preparation of Enantiomerically Enriched Secondary Alcanols", *Tetrahedron Asymmetry*, 6, 1217, 1995.
57. ORRENIUS, C.; NORIN, T.; HULT, K.; CARRERA, G.; "The *Candida Antarctica* Lipase B Catalysed Kinetic Resolution of Seudenol in Non-Aqueous Media of Controlled Water Activity", *Tetrahedron Asymmetry*, 6, 3023, 1995.
58. LANGRAND, G.; SECCHI, M.; BUONO, G.; BARATTI, J.; TRIANTAPHYLIDES, C.; "Lipase-Catalyzed Ester Formation in Organic Solvents an Easy Preparative Resolution of α -Substituted Cyclohexanols", *Tetrahedron Lett.*, 26, 1857, 1985.
59. 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.
60. 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.
61. CARRETERO, J. C.; DOMINGUEZ, E.; "Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of γ -Hydroxy Phenyl Sulfones", *J. Org. Chem.*, 57, 3867, 1992.

62. 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.
63. IVANOV, A. E.; SCHNEIDER, M. P.; "Methods for the Immobilization of Lipase and Their Used for Ester Synthesis", *J. Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 3, 303, 1997.
64. 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.
65. KAWANAMI, Y.; MORIYA, H.; GOTO, Y.; TSUKAO, K.; HASHIMOTO, M.; "Lipases-Catalyzed Kinetic Resolution of Trans-2,5-Disubstituted Pyrrolidine Derivatives", *Tetrahedron*, 52, 565, 1996.
66. BARTON, M. J.; HAMMAN, J. P.; FICHTER, K. C.; CALTON, G. J.; "Enzymatic Resolution of (R,S)-2-(4-Hydroxyphenoxy) Propionic Acid", *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 577, 1990.
67. MORI, K.; "Synthesis of Optically Active Pheromones", *Tetrahedron*, 3233, 45, 1989.
68. ENGEL, K. H.; "Lipase-Catalysed Enantioselective Esterification of 2-Methylalkanoic Acids", *Tetrahedron Asymmetry*, 2, 165, 1991.
69. SENANAYAKE, C. H.; BILL, T. J.; LAREN, R. D.; LEAZER, J.; REIDER, P. J.; *Rabbit Liver Esterase*-Mediated Enantioselective Synthesis of 2-Arylpropanoic Acids", *Tetrahedron Lett.*, 33, 5901, 1992.
70. ENGEL, K. H.; "Lipase-Catalyzed Enantioselective Acidolysis of Achiral 2-Methylakanoates", *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 146, 1992.
71. CHADHA, A.; MANOHAR, M.; "Enzymatic Resolution of 2-Hydroxy-4-Phenylbutanoic Acid and 2-Hydroxy-4-Phenylbutenoic Acid", *Tetrahedron Asymmetry*, 6, 651, 1995.
72. MIYAZAWA, T.; KURITA, S.; UEJI, S.; YAMADA, T.; KUWATA, S.; J. "Resolution of Mandelic Acids by Lipase-Catalysed Transesterifications in Organic Media: Inversion of Enantioselectivity Mediated by the Acyl Donor", *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 2253 1992.
73. NATARAJAN, K. R.; "Biocatalysis in Organic Solvents", *J. Chem. Educ.*, 68, 13, 1991.
74. 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.

75. 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.
76. KALBE, J.; HOCKER, H.; BERNDT, H.; "Design of Enzyme Reactors as Chromatographic Columns for Racemic Resolution of Amino and Esters", *Chromatographia*, 28, 193, 1989.
77. BIANCHI, D.; CESTI, P.; BATTISTEL, E.; Anhydrides as Acylating Agents in Lipase-Catalyzed Stereoselective Esterification of Racemic Alcohols", *J. Org. Chem.*, 53, 5531, 1988.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. 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.

86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. LUISI, P. L.; "Enzymes Hosted in Reverse Micelles in Hydrocarbon Solution", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24, 439, 1985.
90. BEREZIN, I. V.; MARTINEK, K.; "Catalysis by Enzymes Entrapped in Reversed Micelles of Surfactants in Organic Solvents", *Annals. New York Academy of Sciences*, 434, 577, 1984.
91. JAIN, T. K.; VARSHNEY, M.; MAITRA, A.; "Structural Studies of Aerosol - OT Reverse Micellar Aggregates by FT-IR", *J. Phys. Chem.*, 93, 7409, 1989.
92. SHAPIRO, Y. E.; BUDANOV, N. A.; LEVASHOV, A. V.; " 13 C-NMR of Study of Entrapping Proteins (α -Chymotrypsin) into Reversed Micelles of Surfactants (Aerosol-OT) in Organic Solvents (n-Octane)", *Collect Czech. Chem. Commun.*, 54, 1989.
93. RUCKENSTEIN, E.; KARPE, P.; "On the Enzymatic Superactivity in Ionic Reverse Micelles", *J. Colloid Interface Sci.*, 149, 408, 1990.
94. RAHAMAN, R. S.; HALTON, T. A.; "Structural Characterization of α -Chymotrypsin Containing AOT Reversed Micelles", *J. Phys. Chem.*, 95, 1799, 1991.
95. MARTIN, C.; MAGID, L.; "Carbon-13 NMR Investigations of Aerosol - OT Water-in-Oil Microemulsions", *J. Phys. Chem.*, 85, 3938, 1981.
96. FLETCHER, P. D. I.; FREEDMAN, R. B.; MEAD, J.; "Reactivity of α -Chymotrypsin in Water-in-Oil Microemulsion", *J. Colloid Surfaces*, 10, 193, 1984.
97. FLETCHER, P. D. I.; ROBINSON, B. H.; "Activity of Lipase in Water-in-Oil Microemulsion", *J. Chem. Soc. Faraday Trans I*, 81, 2667, 1985.
98. FLETCHER, P. D. I.; FREEDMAN, R. B.; ROBINSON, B. H.; "Lipase-Catalysed Ester Synthesis in Oil-Continuous Microemulsion", *Biochem. Biophys. Acta*, 912, 278, 1987.

99. DERKSEN, J. T. P.; CUPERUS, F. P.; "Lipase-Catalysed Hydrolysis of Crambe Oil in AOT-Isooctane Reversed Micelles", *Biotechnol. Lett.*, 14, 937, 1992.
100. HAERING, G.; LUISI, P. L.; "Hydrocarbon Gels from Water-in-Oil Microemulsions", *J. Phys. Chem.*, 90, 5892, 1986.
101. ROBINSON, B. H.; "Microemulsions - Properties and Novel Chemistry", *Chem. in Brit.*, 4, 342, 1991.
102. 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.
103. DANIELSON, I.; LINDMAN, B.; "The Definition of Microemulsion", *Colloids and Surfaces*, 3, 391, 1981.
104. MENGER, F. M. "Chemical Collectivism", *Chem. in Brit.*, 300, 1993.
105. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; "Some Comments on the Gelation of Gelatin Containing Water/ Oil Microemulsions", *J. Phys. Chem.*, 91, 4211, 1987.
106. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; "Mutual Gelation of Gelatin and Water-in-Oil Microemulsion", *Chimia*, 40, 233, 1986.
107. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; "Evidence of Fractal Network Formation in Gelatin w/o Microemulsion", *Europhys Lett.*, 9, 293, 1989.
108. 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.
109. QUELLET, C.; EICKE, H. F.; SAGER, W.; "Formation of Microemulsion-Based Gels", *J. Phys. Chem.*, 95, 5642, 1991.
110. ATKINSON, P. J.; GRIMSON, M. J.; HEENAN, R. K.; "Microemulsion-Based Gels: A Small-Angle Neutron Scattering Study", *Chem. Phys. Lett.*, 151, 494, 1988.
111. HOWE, A. M.; KATSIKIDES, A.; ROBINSON, B. H.; "Structure and Dynamics of Microemulsion-Based Gels", *Prog. Colloid. Polym. Sci.*, 76, 211, 1988.
112. 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.
113. ATKINSON, P. J.; CLARK, D. C.; HOWE, A. M.; "Characterization of Microemulsion-Based Gels", *Prog. Colloid. Polym. Sci.*, 84, 129, 1991.

114. ATKINSON, P. J.; ROBINSON, B. H.; "Structure of Microemulsion-Based Organo-Gels", *Spec. Publ. -R. Soc. Chem.* 82, 542, 1991.
115. PETIT, C.; ZEMB, TH.; PILENI, M. P.; "Structural Study of Microemulsion-Based Gels at the Saturation Point", *Langmuir*, 7, 223, 1991.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. REES, G. D.; ROBINSON, B. H.; "Microemulsions and Organogels: Properties and Novel Applications", *Advanced Materials*, 5, 608, 1993.
121. 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.
122. 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.
123. 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 2º Seminário Internacional de Tecnologia Enzimática*, 2, 1995.
124. SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W.; LANGFORD, C. H.; *Inorganic Chemistry*, 2º ed., Oxford University Press, Oxford, p. 495, 1994.
125. OTHMER, K.; *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, New York, 3º ed., vol. 3, p. 267 - 283, 1978.
126. COMERLATO, M. H.; "Imobilização de Enzimas no Suporte Crisotila", *Tese de Doutorado*, UNICAMP, Campinas, SP, 1995.

127. MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; JOEKES, I.; BRENELLI, E. C. S.; LEITE, R. A.; "Reduction of α -Azidopropiophenone by Immobilized Baker's Yeast", *Biocatalysis*, 9, 321, 1994.
128. SORRILHA, A. E. P. M.; MARQUES, M.; JOEKES, I.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; "Reduction of Phenylketones by Immobilized Baker's Yeast", *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.*, 2, 191, 1992.
129. CARVALHO, M.; OKAMOTO, M. T.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; "Baker's Yeast Reduction of α -Haloacetophenones", *Tetrahedron*, 47, 2073, 1991.
130. ALEIXO, L. M.; CARVALHO, M.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; "Hydride Transfer versus Electron Transfer in the Baker's Yeast Reduction of α -Haloacetophenones", *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.*, 3, 1637, 1993.
131. BRENELLI, E. C. S.; CARVALHO, M.; OKUBO, M. T.; MARQUES, M.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; SORRILHA, A. E. P. M.; "Enantioselective Synthesis of (R)-(-)-1-Phenylethanolamines Using Baker's Yeast Reduction of Some α -Substituted Methyl Phenyl Ketones", *Indian J. Chem.*, 31, 821, 1992.
132. NASCIMENTO, M. G.; LIMA, C.; SILVA, P. L. F.; REZENDE, M.C.; "The Use of Immobilized Lipases on Chrysotile for Esterification Reactions", *J. Braz. Chem. Soc.*, 7, 173, 1996.
133. MORRISON, J. D.; *Asymmetric Synthesis: Analytical Methods*, vol. 1. Ed. Academic Press, INC, Orlando, Florida, USA, cap. 2 e 5, 1983.
134. JESUS, P.C.; "Resolução de Álcoois Secundários Racêmicos Através da Esterificação Catalisada por Enzimas Imobilizadas em Organo-gel", *Dissertação de Mestrado* - Departamento de Química - UFSC, Florianópolis, SC, 1994.
135. FISCHER, P.; AICHHOLZ, R.; BÖLZ, U.; JUZA, M.; KRIMMER, S.; "Permethy - β - Cyclodextrin, Chemically Bonded to Polysiloxane: a Chiral Stationary Phase with wide Application Range for Enantiomer Separation by Cappillary Gas Chromatography", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29, 427, 1990.
136. MOSANDL, RETTINGER, K.; FISCHER, K.; SCHUBERT, V.; SCHMARR, H. S.; MAAS, B.; "Stereoisomeric Flavor Comfounds XLI: New Applications of Permethyated. β -Cyclodextrin Plase in Chiral CGC Analysis", *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, 382, 1990.

137. TAKEOKA, G.; FLATH, R. ; MON, T. R.; BUTTERY, R. G.; TERANISHI, R.; GÜNTERT, M.; LAUTAMO, R.; SZEJTLI, J.; "Further Applications of Permethylated β -Cyclodextrin Cappillary Gas Chromatographic Columns", *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, 202, 1990.
138. PARKER, D.; " ^1H and ^2H Nuclear Magnetic Resonance Determination of the Enantiomeric Purity and Absolute Configuration of α -Deuterated Primary Carboxylic Acids, Alcohols, and Amines", *J. Chem. Soc. Parkin trans. II*, 83, 1983.
139. RINALDI, P. L.; "The Determination of Absoluted Configuration Using Nuclear Magnetic Resonance Techniques", *Progress in NMR Spectroscopy*, 15, 291, 1982.
140. RODRIGUES, I, ALVAREZ, C.; LARA, J. G.; TOSCANO, R. A ; PLATZER, N.; MULHEIM, C.; RUDLER, H.; "Lanthanide Tetraphenylimidadephosphinates: X - Ray Structure of an Ethyl Acetate Adduct and Use as N.M.R. Shift Reagents for Acid", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1502, 1987.
141. ALVAREZ, C.; GOASDONE, N.; PLATZER, N.; RODRIGUEZ, I.; RUDLER, H.; "tris (Tetraphenylimidodiphosphinato) praseodymium; A Powerful Tool for the Analysis of Fatty Acids by ^1H N.M.R. Spectroscopy". *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.*, 1002, 1988.
142. PARKER, D.; "NMR Determination of Enantiomeric Purity", *Chem. Rev.*, 99, 1441, 1991.
143. KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M.; *Enzymatic Reactions in Organic Media*, 1º ed., Chapman & Hall, London, p.95, 1996.
144. 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.
145. 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.
146. PENHA, F, G.; "Cinética de Adsorção do Etilxantato de Potassio Sobre Pirita", *Dissertação de mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC, 1997.
147. **Handbook of Chemistry and Physics**, 60th Edition, 1979-1980.
148. SOMASUNDARAN, P.; KRISHNAKUMAR, S.; "Adsorption of Surfactants and Polymers at the Solid-Liquid Interface", *Colloid and Surfaces A: Phy. And Eng. Asp.*, 123, 491, 1997.

149. ADAMSON, A.W.; *Physical Chemistry of Surfaces*, John Wiley & Sons, New York, 3ª ed., cap. IX, p. 385, 1976.
150. DUINHOUVEN, S.; POORT, R.; VAN DER VOET, G.; AGTEROF, W. G. M.; NORDER, W.; LYKLEMA, J.; "Driving Forces for Enzyme Adsorption at Solid-Liquid Interfaces. The *Serine Protease Savinase*", *J. Colloid and Interface Sci.*, 170, 340, 1995.
151. DUINHOUVEN, S.; POORT, R.; VAN DER VOET, G.; AGTEROF, W. G. M.; NORDER, W.; LYKLEMA, J.; "Driving Forces for Enzyme Adsorption at Solid-Liquid Interfaces. The Fungal Lipase *Lipolase*", *J. Colloid and Interface Sci.*, 170, 351, 1995.
152. ZOUNGRANA, T.; NORDE, W.; "Thermal Stability and Enzymatic Activity of α -*Chymotrypsin* Adsorbed on Polystyrene Surfaces", *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*, 9,157,1997.
153. WANNERBERGER, K.; WAHLGREN, M.; ARNEBRANT, T.; "Adsorption from Lipase-Surfactant Solutions onto Methylated Silica Surfaces", *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*, 6, 27, 1996.
154. WANNERBERGER, K.; ARNEBRANT, T.; "Adsorption of Lipase to Silica and Methylated Silica Surfaces", *J. Colloid Interface Sci.*, 177, 316, 1996
155. WANNERBERGER, K.; KLINTSTRÖN, W.; ARNEBRANT, T.; "Activity and Adsorption of Lipase from *Humicola lanuginosa* on Surfaces with Different Wettabilities", *Langmuir*, 13, 784, 1997.
156. SANTANGELO, E. M.; RECKZIEGEL, A.; FERREIRA, J. T. B.; "Síntese do Feromônio Sexual do *Migdolus Fryanus*", *Livro de Resumos da 19ª Reunião Anual do SBQ*, QO 133, 1996.
157. HINZE, W. L.; UEMASU, I.; "Enantioselective Esterification of 2-Methylbutiric Acid Catalyzed via Lipase Immobilized in Microemulsion-Based Organogels", *Chirality*, 6, 649, 1994.
158. FITZPATRICK, P. A; KLIBANOV, A. M.; "How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity?", *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3166, 1991.
159. PARIDA, S.; DORDICK, J. S.; "Substrate Structure and Solvent Hydrophobicity Control Lipase Catalysis and Enantioselectivity in Organic Media", *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 2253, 1991.
160. TAWAKI, S.; KLIBANOV, A. M.; "Inversion of Enzyme Enantioselectivity Mediated by the Solvent", *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1882, 1992.

161. TERRADAS, F.; HENRY, M. T.; FITZPATRICK, P. A; KLIBANOV, A. M.;
“Marked Dependence of Enzyme Prochiral Selectivity on the Solvent”, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 390, 1993.
162. CARRERA, G.; OTTOLINA, G.; RIVA, S.; “Role of Solvents in Control of Enzyme Selectivity in Organic Media”, *Tibtech*, 13, 63, 1995.

ANEXOS

Produção Acadêmica nos Anos 1994 -1998

a) Artigos e Anais

JESUS, P.C.; REZENDE, M.C.; NASCIMENTO, M.G.; Enzymatic Resolution of Alcohols via Lipases Immobilized in Microemulsion -Based Gels, *Tetrahedron: Asymmetry*, 6(1), 63, 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, *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 (*aceito para publicação*).

b) Comunicação em Congressos

BURLIN, G., JESUS, P.C.; NASCIMENTO, M.G.; Síntese de Diésteres Catalisada pela *C.V.lipase* Imobilizada em Organo-Gel, *17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Caxambu, MG, 24 a 27/05 de 1994.

JESUS, P.C.; BURLIN, G.; SILVA, P.L.F.; REZENDE, M.C.; NASCIMENTO, M.G.; Immobilized Lipase Catalysed Resolution of Secondary Chiral Alcohols, *6th Brazilian Meeting on Organic Synthesis*, USP, São Paulo, SP, 5 a 9/09 de 1994.

LIMA, C.; SILVA, P.L.F.; JESUS, P.C.; NASCIMENTO, M.G.; Estudo da Atividade Catalítica da Lipase de *Candida Cilindracea* Imobilizada em Crisotila, **18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Caxambu, MG, 30/05 a 02/06 de 1995.

JESUS, P.C.; SILVA, P.L.F.; NASCIMENTO, M.G.; Avaliação da Enantiosseletividade de Lipases Imobilizadas em Organo-gel na Resolução de Álcoois Secundários Racêmicos, **18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Caxambu, MG, 30/05 a 02/06 de 1995.

SILVA, P.L.F.; LIMA, C.; JESUS, P.C.; NASCIMENTO, M.G.; Preparação de Ésteres com Lipases Imobilizadas em Crisotila, **Vº Seminário Catarinense de Iniciação Científica**, UFSC, Florianópolis, SC, 17 a 18/08 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.

LIMA, C.; NASCIMENTO, M. G.; SILVA, P. L. F.; JESUS, P. C.; Estudo do efeito do Solvente na Atividade Catalítica de Lipases Imobilizadas em Crisotila, **19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 27 a 30/05 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.

BURLIN, G.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Utilização de Lipases Imobilizadas em Gel de Ágar na Preparação de Mono e Diésteres, **VIº Seminário Catarinense de Iniciação Científica**, UFSC, Florianópolis, SC, 2 a 13/07 de 1996.

SILVA, P. L. F.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Adsorção da Lipase de *Candida cylindracea* em Crisotila, *VIº Seminário Catarinense de Iniciação Científica*, UFSC, Florianópolis, SC, 2 a 13/07 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.

JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Esterificação Enantiosseletiva do Ácidos Racêmicos (\pm)-2 e 3-Metil-Valérico Catalisada por Lipases Imobilizadas em Crisotila e Organo-Gel, *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.; CHIES, A.; NASCIMENTO, M. G.; Resolução do Ácido Racêmico (\pm)-2-Metil-Hexanóico Catalisada por Lipases Imobilizadas em Organo-Gel e Crisotila, *aceito para apresentação na 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, 25 a 28/05 de 1998.

BURLIN, G.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Utilização de Géis de Ágar, Ágar-Galactomanana e Organo-Gel como Suporte para a Imobilização de Enzimas, *aceito para apresentação na 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, 25 a 28/05 de 1998.

ROSA, F.A.F.; BURLIN, G.; JESUS, P. C.; NASCIMENTO, M. G.; Avaliação do Efeito do Solvente na Reação de Esterificação do 1,4-Butanodiol com o Ácido Láurico Catalisada pela *Lipolase* Imobilizada em Gel de Ágar, *aceito para apresentação na 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, *Aceito para apresentação na 14ª Conferência Internacional de Físico-Química Orgânica da IUPAC*, Florianópolis, SC, Agosto de 1998.