



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**UTILIZAÇÃO DE LIPASES EM REAÇÕES DE
EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE “MESTRE EM CIÊNCIAS”

MARCELO ALVES MOREIRA

FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA – BRASIL
FEVEREIRO DE 2003

UTILIZAÇÃO DE LIPASES EM REAÇÕES DE EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA.

MARCELO ALVES MOREIRA

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

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
(Orientadora)

Banca examinadora:

Profa. Dra. Marina Uieara

Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Prof. Dr. Hernán Terenzi

"Somente o amor com a sua ciência
nos torna tão inocentes"

Violeta Parra (Volver a los 17)

Agradecimentos

Agradeço à minha família por todo amor e compreensão que recebi durante toda minha vida.

À Janaína, minha namorada, pelo carinho e companheirismo.

À professora Dra. Maria da Graça Nascimento em especial, pela oportunidade e confiança depositadas em minha pessoa no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, além de sua dedicação e amizade.

Aos meus amigos (mesmo os mais distantes) e em especial ao Cristian, ao Anildo e à Rusiene pelas boas risadas e bate-papos nestes últimos anos.

Aos meus parceiros de laboratório: Sandra, Neide, Silvia, Damianni, Roberto, Rogério, Juliana e Ricardo pela ajuda no trabalho e pelos incontáveis cafezinhos.

Ao professor Dr. Marcus Mandolesi Sá, pelo apoio e aos seus alunos de Química Orgânica Experimental II, que sintetizaram e gentilmente doaram parte do ciclohexeno utilizado neste trabalho.

Ao professor Dr. Valdir Soldi e ao doutorando Pedro L. M. Barreto, pela ajuda e gentileza de ceder-nos o caseinato de sódio.

À UFSC e à CAPES pelo apoio financeiro e facilidades concedidas.

À Amano e à Novozymes, pela gentileza de ceder-nos as enzimas.

ÍNDICE GERAL

1 - INTRODUÇÃO	2
1.1 - Enzimas	2
1.2 - Lipases	8
1.3 - Imobilização de Enzimas	14
1.3.1 - Imobilização em Suportes Sólidos	15
1.3.1.1 - Ágar-Ágar	16
1.3.1.2 - Caseinato de Sódio	17
1.3.1.3 - Poli(Óxido de Etileno) (PEO)	19
1.3.2 - Sistema Bifásico	19
1.4 - Epóxidos	21
1.5 - Perácidos	23
1.6 - Epoxidação	24
1.6.1 - Epoxidação Eletrofílica Via Perácidos	25
1.6.2 - Epoxidação Nucleofílica	27
1.6.3 - Epoxidação Radicalar	27
1.6.4 - Epoxidação Catalisada por Aminoácidos	28
1.6.5 - Epoxidação Químio-Enzimática de Alcenos	29
2 - OBJETIVO	31
2.1 - Objetivo Geral	31
2.2 - Objetivos Específicos	31
3 - METODOLOGIA	32
3.1 - Preparação dos Suportes	32
3.1.1 - Filmes de Caseinato de Sódio	32
3.1.2 - Filme de PEO	32

3.1.3 - Gel de Ágar	32
3.1.4 - Sistema Bifásico	33
3.2 - Equipamentos e Caracterização dos Produtos	33
3.3 - Reagentes, Solventes e Lipases Utilizadas	33
3.4 - Métodos Experimentais	35
3.4.1 - Preparação do Ciclohexeno	35
3.4.2 - Reações de Epoxidação Químio-Enzimática com Lipases Imobilizadas	35
3.4.3 - Reações de Epoxidação Químio-Enzimática em Sistema Bifásico	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 - Polímeros como Suportes para Lipases em Reações de Epoxidação Químio-Enzimática	37
4.2 - Utilização da Novozyme 435 [®] em Epoxidações Químio-Enzimáticas com Adições Periódicas de H ₂ O ₂	39
4.3 - Epoxidação Químio-Enzimática em Sistema Bifásico com Diversas Lipases	41
4.4 - Influência do Solvente na Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno em Sistema Bifásico	43
4.5 - Influência do Tempo na Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno em Sistema Bifásico	46
4.6 - Influência da Temperatura na Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno em Sistema Bifásico	47
4.7 - Epoxidação Químio-Enzimática de Compostos com Dupla Ligação Carbono-Carbono em Sistema Bifásico	48
5 - CONCLUSÃO	53
6 - PERSPECTIVAS	55
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Representações gráficas das estruturas tridimensionais secundárias (a e b) e terciárias (c), obtidas por Raio-X, da lipase de <i>Penicillium sp.</i>	2
FIGURA 2	Representação genérica da cavidade do sítio ativo de uma enzima complexada com seu substrato.	3
FIGURA 3	Modelo da ligação específica de um substrato pró-quiral ao sítio ativo da enzima.	4
FIGURA 4	Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.	4
FIGURA 5	Utilização relativa das enzimas em biotransformações.	7
FIGURA 6	Representação gráfica, da estrutura tridimensional obtida por Raio-x, da CaL.	8
FIGURA 7	Representações gráficas dos principais métodos de imobilização de enzimas	15
FIGURA 8	Unidades repetidas AB do polímero de agarose.	17
FIGURA 9	Modelos sugeridos para as micelas de α , β e κ - caseína.	19
FIGURA 10	Espectro de RMN- ¹ H da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno (77%). Condições reacionais: Novozyme 435 [®] = 50mg, 30 ^o C, 6 horas.	36
FIGURA 11	Influência do tempo na epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno com adições periódicas de H ₂ O ₂ . Condições reacionais: 50mg de Novozyme 435 [®] , ciclohexeno=5mmol, H ₂ O ₂ (30%)=720 μ L, 30 ^o C, tolueno.	41
FIGURA 12	Influência do tempo na epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno em sistema bifásico. Condições reacionais: 30 ^o C, tolueno. 100mg de F-AP15, 50mg de Novozyme 435 [®] , ciclohexeno=5mmol, H ₂ O ₂ (30%)=1mL, 30 ^o C, tolueno.	46
FIGURA 13	Epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno catalisada pela Novozyme 435 [®] em sistema bifásico a temperaturas variadas, ciclohexeno=5mmol, H ₂ O ₂ (30%)=1mL, 24horas.	48
FIGURA 14	Espectro ampliado de RMN- ¹ H [2,5 – 5,5 ppm] da fase orgânica da reação de epoxidação do α -metilestireno (5mmol) com a Novozyme 435 [®] , à 30 ^o C, por 24 horas em tolueno. (200MHz)	50
FIGURA 15	Espectro de RMN- ¹ H do D-limoneno, CDCl ₃ (200MHz).	52
FIGURA 16	Espectro ampliado de RMN- ¹ H [2,0 – 6,0 ppm] da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do D-limoneno catalisada pela Novozyme 435 [®] a 30 ^o C após 24 horas, CDCl ₃ (200MHz).	52

ÍNDICES DE TABELAS E ESQUEMAS

TABELA 1	Principais Proteínas do Leite.	17
TABELA 2	Calor de Formação de Alguns Éteres.	22
TABELA 3	Lipases Utilizadas Neste Trabalho.	34
TABELA 4	Epoxidação Químio-enzimática do Ciclohexeno Utilizando a Palatase M Imobilizada em Gel de Ágar como Biocatalisador.	38
TABELA 5	Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno Catalisada por Lipases de Diversas Fontes Imobilizadas em Gel de Ágar.	38
TABELA 6	Epoxidações Químio-Enzimáticas Catalisadas por Novozyme 435 [®]	40
TABELA 7	Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno Utilizando Lipases de Fontes Variadas em Tolueno.	42
TABELA 8	Influência do Solvente na Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno Catalisada pela F-AP15 em Sistema Bifásico.	44
TABELA 9	Influência do Solvente na Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno Catalisada pela Novozyme 435 [®] em Sistema Bifásico.	45
ESQUEMA 1	Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster.	9
ESQUEMA 2	Reações paralelas na epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno com octanoato de etila e/ou ácido octanóico como doadores acila.	47

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1	Hidrólise do 2-cloro-propionato de metila.	10
EQUAÇÃO 2	Peridrólise do fenilacetato de etila.	11
EQUAÇÃO 3	Alcoólise do ácido láurico com o n-butanol.	11
EQUAÇÃO 4	Interesterificação do éster etílico da α -metil- β -alanina com o propanoato de butila	12
EQUAÇÃO 5	Reação de metanólise de triacilgliceróis para obtenção de biodiesel.	12
EQUAÇÃO 6	Acidólise de triacilgliceróis com o ácido caprílico.	13
EQUAÇÃO 7	Hidrólise enzimática da Penicilina G.	20
EQUAÇÃO 8	Síntese do poli(etilenoglicol), via catálise ácida.	23
EQUAÇÃO 9	Representação da inserção direta de oxigênio em alcenos.	24
EQUAÇÃO 10	Mecanismo de epoxidação de alcenos via perácidos.	26
EQUAÇÃO 11	Epoxidação syn seletiva do 1-ciclohexen-3-ol.	26
EQUAÇÃO 12	Efeito cooperativo de grupos de coordenação na reação de epoxidação.	27
EQUAÇÃO 13	Reação de epoxidação nucleofílica.	27
EQUAÇÃO 14	Mecanismo de epoxidação radicalar.	28
EQUAÇÃO 15	Epoxidação assimétrica de uma cetona α,β -insaturada catalisada por poli(L-leucina).	29
EQUAÇÃO 16	Epoxidação do 2 penten-4-ol com MCPBA.	29
EQUAÇÃO 17	Epoxidação químio-enzimática do ácido oléico.	30
EQUAÇÃO 18	Equação geral das reações estudadas neste trabalho.	31
EQUAÇÃO 19	Epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno (reação padrão).	37
EQUAÇÃO 20	Epoxidação químio-enzimática do α -metilestireno.	49
EQUAÇÃO 21	Epoxidação regiosseletiva do D-limoneno.	51

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

FIG.	= Figura
β	= beta
α	= alfa
sp.	= espécie não determinada
RNA	= ácido ribonucleico
pH	= potencial hidrogênio
l(-)	= levógiro
d(+)	= dextrógiro
ATP	= adenina trifosfato
ADP	= adenina difosfato
kDa	= quilo Daltons
Cal	= lipase de <i>Candida antarctica</i>
ESQ	= esquema
Tyr	= tirosina
Gln	= glutamina
Ser	= serina
His	= histidina
Asp	= ácido aspártico
MCP	= 2-cloro-propionato de metila
CrL	= lipase de <i>Candida rugosa</i>
col.	= colaboradores
EQ	= equação
rend.	= rendimento
E	= razão enantiomérica
e.e.	= excesso enantiomérico
K_M	= constante de Michaelis

p. ex. = por exemplo

PEO = poli(óxido de etileno)

MEV = microscopia de eletrônica de varredura

σ = sigma

ΔH_f = Calor de formação

MCPBA = ácido metacloroperbenzóico

IV = infra-vermelho

CS = caseinato de sódio

RMN-¹H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

TMS = tetra metilsilano

TAB = tabela

n. d. = não houve detecção do produto

log P = logaritmo do coeficiente de partição

ABSTRACT

Most enzymes are protein catalysts and in optimal conditions of temperature and pH accelerate chemical reactions. They can be immobilized in various supports and applied in organic media reactions where they became powerful tools, specially in chiral synthesis. The goal of this work was to investigate some parameters of chemo-enzymatic epoxidation reaction of unsaturated compounds. In first of all, lipases of varied sources were immobilized in polymeric supports (agar gel, poly(ethylene) oxide and sodium caseinate films) and applied as catalysts of cyclohexene chemo-enzymatic epoxidation with carbonyl compounds (octanoic acid and ethyl octanoate) as acyl donors, by periodical injections of hydrogen peroxide 30% and toluene or hexane as external solvent. Novozyme 435[®] was tested for the system above, and cyclohexene; hexadienoic acid, allylic alcohol and ethyl oleate were used as reagents. The next step used various lipases in the cyclohexene chemo-enzymatic epoxidation in a biphasic system. Some reactions parameters such as temperature, reaction time and acyl donor ability were studied in order to optimize the reaction conditions. The best conversion (>99% in cyclohexene oxide) was achieved when the reaction was catalysed by Novozyme 435[®] with octanoic acid, as acyl donor, with periodical injections of hydrogen peroxide (30%) in toluene at 30⁰C. An interesting result was obtained in the regio selective epoxidation of D-limonene.

Resumo

As enzimas, em sua maioria, são catalisadores protéicos que em condições ótimas de temperatura e pH aceleram as reações químicas. Elas podem ser imobilizadas em vários suportes para aplicação em meio orgânico onde se tornam poderosas ferramentas, principalmente em sínteses quirais. O objetivo deste trabalho foi o de estudar diversos parâmetros da reação de epoxidação químio-enzimática de compostos que contenham dupla ligação carbono-carbono. Em uma primeira etapa lipases de fontes variadas foram imobilizadas em suportes poliméricos (gel de ágar, filmes de poli(óxido de etileno) e de caseinato de sódio) e utilizadas como catalisadores na epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno com injeções periódicas de peróxido de hidrogênio 30% utilizando o ácido octanóico, octanoato de etila ou laurato de etila como doador acila e o tolueno como solvente externo. A lipase comercial Novozyme 435[®], também foi testada para o sistema reacional descrito acima e além do ciclohexeno, o ácido hexadienóico, álcool alílico e oleato de etila foram utilizados como reagentes. Na seqüência diversas lipases foram utilizadas na epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno em sistema bifásico. Foram testados vários parâmetros de reação como a temperatura, tempo, doador acila, etc.; para otimizar a reação. As melhores conversões do ciclohexeno (>99% em óxido de ciclohexeno) foram obtidas para as reações de epoxidação químio-enzimática que foram catalisadas pela Novozyme 435[®] com o ácido octanóico, como doador acila, em tolueno com adições periódicas de peróxido de hidrogênio a 30^oC. Outro resultado promissor foi a epoxidação régiosseletiva do D-limoneno.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Enzimas

As enzimas, em sua maioria*, são catalisadores de natureza protéica, produzidas pelos organismos vivos.¹ Como outras proteínas, elas são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas e a seqüência exata de aminoácidos da cadeia protéica é chamada estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é denominada estrutura secundária (**FIG. 1a e 1b**) e a disposição espacial destas estruturas é denominada estrutura terciária. (**FIG.1c**)

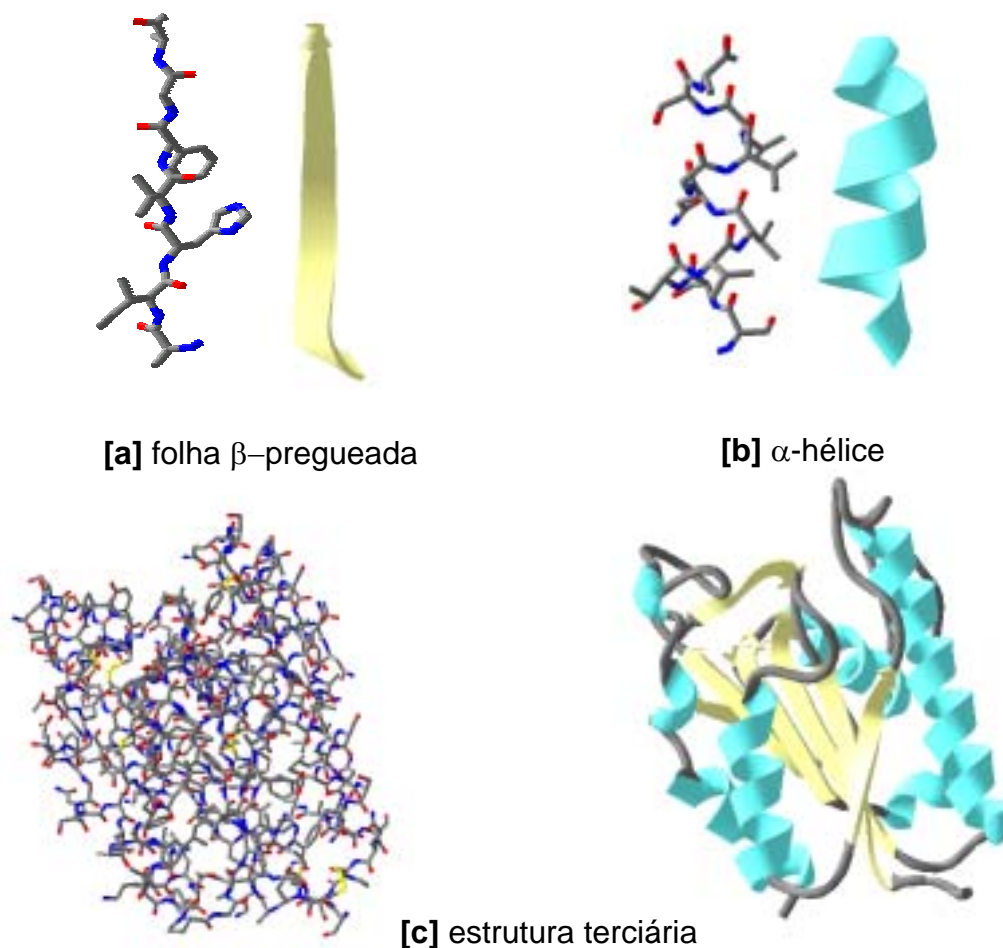


FIGURA 1 – Representações gráficas das estruturas tridimensionais secundárias (a e b) e terciárias (c) obtidas por Raio-X da lipase de *Penicillium sp.*²

* Existem certas moléculas de RNA que também agem como enzimas. O Prêmio Nobel de Química de 1989 foi dado a Sidney Altman e a Thomas R. Cech por esta descoberta.

Nos sistemas biológicos, as enzimas constituem a base das complexas e variadas reações que caracterizam os fenômenos vitais. Elas estão presentes em todas as células vivas, e desempenham a função vital de controlar os processos metabólicos pelo qual os nutrientes são convertidos em energia.

As enzimas são catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente com vários tipos de reações orgânicas.³ Diversos processos no metabolismo animal são regidos pelas enzimas e estes se realizam em condições favoráveis para o indivíduo sem liberação brusca de energia, num meio de pH e concentração salina praticamente constante. 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 correspondentes não catalisadas.⁴

As enzimas produzidas pelos organismos vivos só catalisam, habitualmente, um tipo ou uma determinada reação. Esta habilidade está diretamente ligada à configuração L dos aminoácidos e ao formato dos sítios catalíticos que proporcionam o encaixe do substrato. **(FIG. 2)**

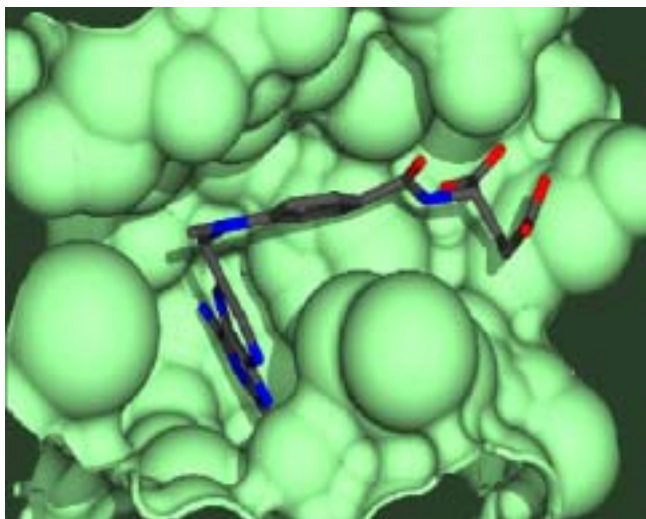


FIGURA 2 – Representação genérica da cavidade do sítio ativo de uma enzima complexada com seu substrato.⁵

Elas têm uma especificidade tão marcada que, em geral, atuam exclusivamente sobre substâncias de configuração precisa. Por exemplo, só reagem com aminoácidos que tem seu carbono α assimétrico, com configuração L e não revelam a menor atividade

sobre formas idênticas desses aminoácidos que apresentam configuração do tipo D. Esta estereoespecificidade é decorrente da inerente quiralidade das proteínas (pois são formadas exclusivamente de L-aminoácidos), formando sítios ativos assimétricos.⁶(**FIG. 3**)

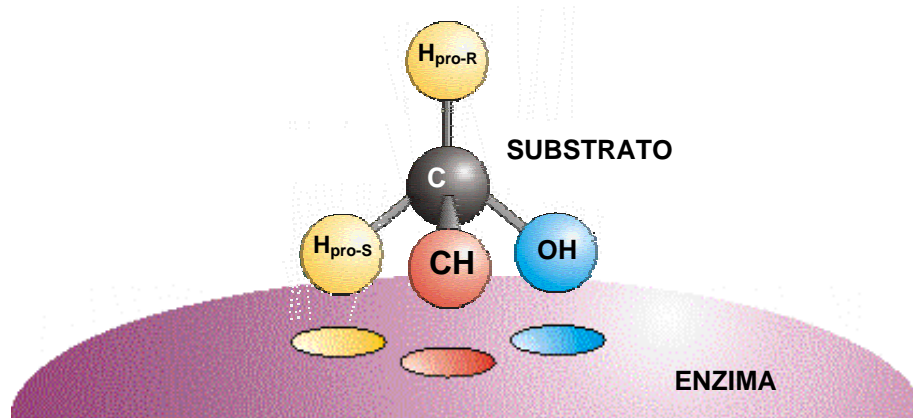


FIGURA 3 – Modelo da ligação específica de um substrato pró-quiral ao sítio ativo da enzima.

As enzimas representam as substâncias encarregadas de aumentar a velocidade de determinadas reações no interior das células. Como nas diversas células se realizam uma infinidade de reações, deduz-se que existam milhares de enzimas e de uma forma geral, o mecanismo simplificado de ação destas pode ser representado como na **FIG. 4**.

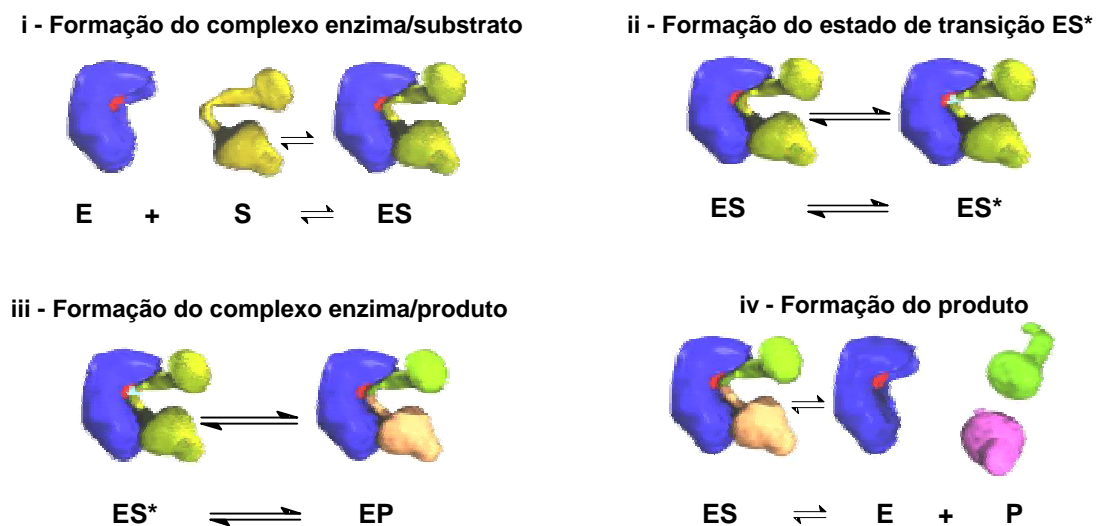
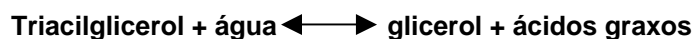


FIGURA 4 – Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.

O sistema de classificação divide as enzimas em seis classes principais, nas quais estão incluídas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. De acordo com esta sistemática, cada enzima é designada por um **nome recomendado**, usualmente pequeno e apropriado para o uso diário, um **nome sistemático**, o qual identifica a reação catalisada, e um **número de classificação**, o qual é usado quando uma identificação precisa é necessária.



O nome recomendado (que é o normalmente usado) para a enzima que realiza a reação acima é *lipase* e o nome sistemático, baseado na reação catalisada, é *triacilglicerol acilhidrolase*. Seu número de classificação é *EC 3.1.1.3*, onde *EC* representa Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB, o primeiro dígito, 3, a classe (*hidrolase*), o segundo dígito, 1, a subclasse (*esterase*), o terceiro dígito, 1, a sub-subclasse (*éster carboxílico hidrolase*), e o quarto dígito, 3, designa uma *triacilglicerol lipase*. A seguir estão alguns códigos utilizados para a aplicação do número de identificação das enzimas:

1. *Oxido-redutases* (reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons – *Desidrogenases e Oxidases*)
 - 1.1. atuando em grupos CH-OH de doadores
 - 1.2. atuando em grupos aldeído de doadores
 - 1.3. atuando em grupos CH-CH de doadores
 - 1.4. atuando em grupos CH-NH₂ de doadores

2. *Transferases* (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil – *Quinases e Transaminases*)
 - 2.1. transferem grupos com um carbono
 - 2.2. transferem grupos aldeído ou cetona
 - 2.3. aciltransferases
 - 2.4. glicosiltransferases

3. *Hidrolases* (reações de hidrólise de ligação covalente - *Peptidases*)
 - 3.1. atuam em ligações de ésteres
 - 3.2. glicosilases
 - 3.3. atuam em ligações de éteres
 - 3.4. peptidases

4. *Liases* (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico – *Dehidratases* e *Descarboxilases*)
 - 4.1. atuam em ligações carbono-carbono
 - 4.2. atuam em ligações carbono-oxigênio
 - 4.3. atuam em ligações carbono-nitrogênio
 - 4.4. atuam em ligações carbono-enxôfre

5. *Isomerases* (reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos - *Epimerases*)
 - 5.1. racemases
 - 5.2. *cis-trans*-isomerases
 - 5.3. Intramolecular isomerases
 - 5.4. Intramolecular transferases (mutases)

6. *Ligases* (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre com consumo de energia - *Sintetases*)⁷
 - 6.1. formando ligações C-O
 - 6.2. formando ligações C-S
 - 6.3. formando ligações C-N
 - 6.4. formando ligações C-C

A incorporação de vias sintéticas utilizando etapas de biotransformação, através do uso de microorganismos e/ou enzimas isoladas como catalisadores, vem sendo explorada tanto em laboratórios acadêmicos quanto na indústria, principalmente na farmacêutica.^{8,9,10,11}

O primeiro fator a ser levado em consideração para a incorporação de uma biotransformação em um processo sintético é a regio e estereosseletividade que pode ser obtida com o uso de reações catalisadas por enzimas. Biotransformações estão sendo utilizadas como um método para gerar compostos opticamente puros. A biotransformação vem se tornando uma ferramenta alternativa e muitas vezes competitiva à disposição dos químicos sintéticos.

As vantagens do uso de enzimas, apresentadas por Loughlin e outros autores^{12,13,14,15,16,17}, em processos de sínteses incluem:

- são catalisadores eficientes; as velocidades de processos mediados por enzimas são maiores se comparados com a catálise química e são efetivas mesmo em frações molares muito pequenas de catalisador;
- atuam sob condições brandas; e a faixa moderada de temperatura de operação (20-40°C) minimiza reações laterais indesejadas como rearranjos;

- catalisam uma grande variedade de reações e podem freqüentemente promover reações em posições muito pouco reativas do substrato;
- demonstram seletividade; como (a) quimiosseletividade (enzimas podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos funcionais reativos), (b) regioseletividade e diastereosseletividade (enzimas podem distinguir entre grupos funcionais somente com a mudança do meio reacional), (c) enantioseletividade (enzimas são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas);
- não são restritas aos seus substratos naturais; a maioria das enzimas demonstra grande especificidade para um determinado tipo de reação ao mesmo tempo em que geralmente aceitam uma grande variedade de substratos;
- catalisam reações em meios não aquosos; e apesar de normalmente ser observado uma perda de atividade, algumas enzimas podem ser utilizadas em solventes orgânicos.

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. Nesta classe estão incluídas as amidases, proteases, nitrilases, fosfatases e epoxidases sendo de particular e grande interesse as lipases. **(FIG. 5)**⁴

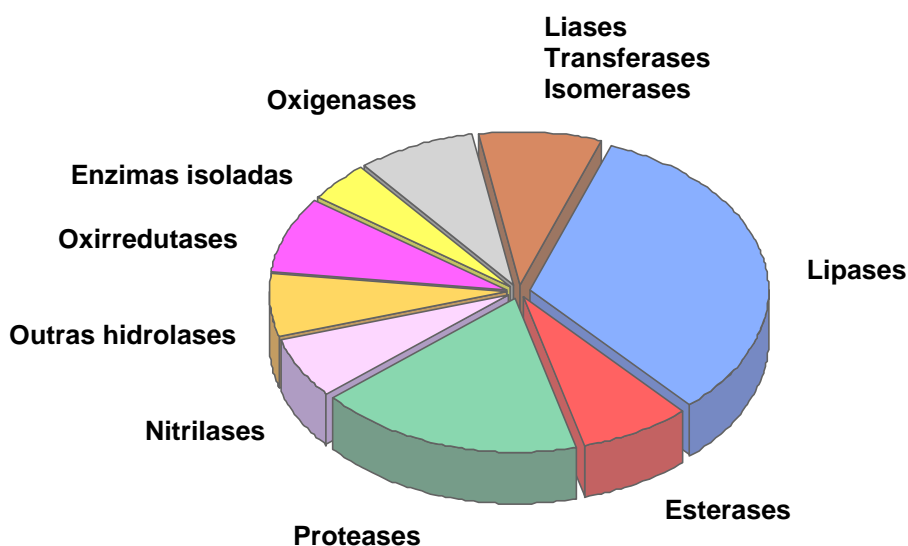


FIGURA 5 – Utilização relativa das enzimas em biotransformações.

1.2 – Lipases

As lipases (triglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) são α/β -hidrolases, que possuem massa molecular em torno de 40 a 50Kda, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. Nos organismos vivos são as enzimas responsáveis pela hidrólise de acilglicerídeos. São enzimas extracelulares, produzidas por fungos tais como *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp*, e por leveduras *Tulopis sp* e *Candida sp*. Algumas bactérias que produzem lipases são *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp*. Destes organismos, as de *Aspergillus sp*, *Mucor sp*, *Rhizopus sp* e *Candida sp* já estão disponíveis comercialmente.¹⁸

A **FIG. 6** mostra a representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase da *Candida antarctica* (CaL) com a ampliação do seu sitio ativo formado pela cadeia lateral da histidina, serina e ácido aspártico.

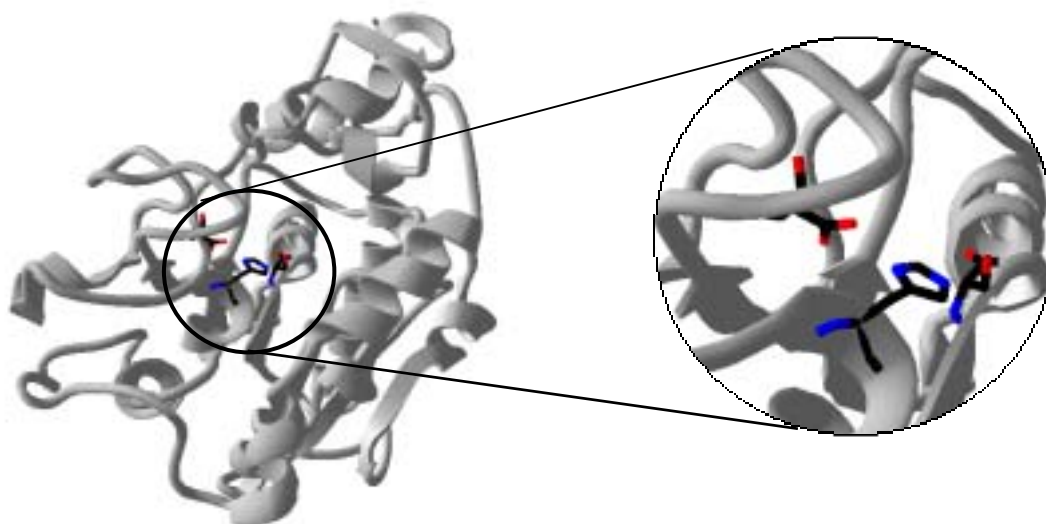
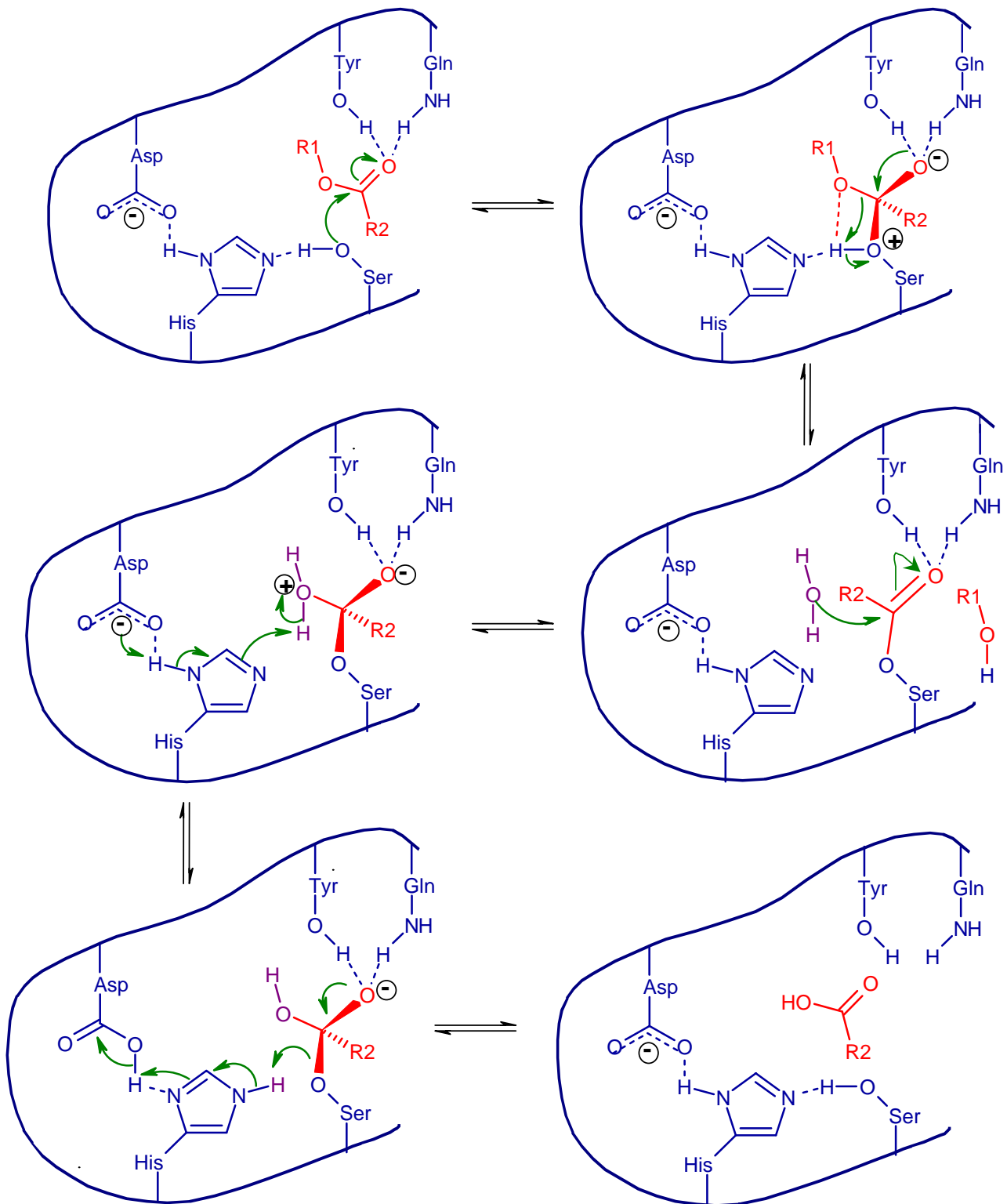


FIGURA 6 – Representação gráfica, da estrutura tridimensional obtida por Raio-X, da CaL.²

Todos os membros da família de estrutura α/β -hidrolase possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, que consiste em cinco etapas:

- i. Ligação ao substrato éster.
- ii. Formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica, com o oxianion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio.
- iii. Quebra da ligação éster.
- iv. Saída da porção alcoólica.
- v. Hidrólise.

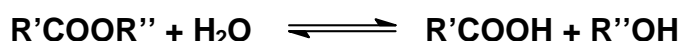
O mecanismo de ação catalítica de uma lipase na hidrólise de éster, está exemplificado no **ESQ. 1**.¹⁹



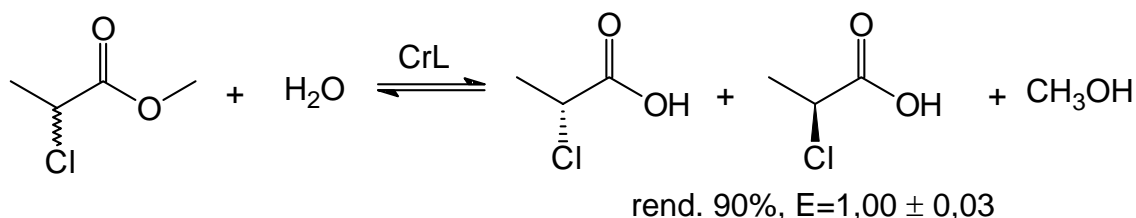
ESQUEMA 1 – Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster.

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido a sua grande disponibilidade, baixo custo, não requerem cofatores, trabalham numa faixa de pH relativamente grande e são muito estáveis.¹⁸ Em solvente orgânico, catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo de doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases podem ser classificadas em dois tipos:

I – Hidrólise

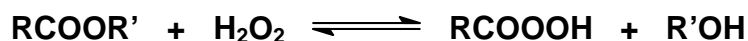


Overbeeke e Jongejan estudaram a hidrólise do 2-cloro-propionato de metila (MCP) catalisada pela lipase de *Cândida rugosa* (CrL) para avaliar a enantiosseletividade desta enzima em diferentes concentrações do substrato. Os autores observaram que apesar das velocidades de reação serem diferentes para os enantiomêros puros do MCP, a resolução cinética da mistura racêmica mostrou que a CrL não foi específica para esta reação.²⁰ (EQ. 1)

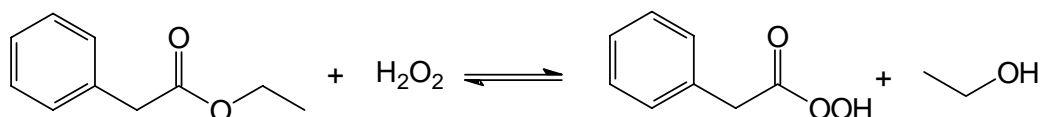


EQUAÇÃO 1 – Hidrólise do 2-cloro-propionato de metila.

. Peridrólise



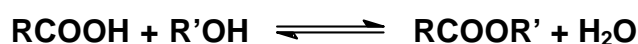
Klaas e col. prepararam novos perácidos de duas formas distintas, em ambas utilizaram a Novozyme 435[®] como catalisador; com ácidos carboxílicos que foram convertidos com peróxido de hidrogênio ou através da peridrólise de ésteres carboxílicos.²¹ (EQ.2)



EQUAÇÃO 2 – Peridrólise do fenilacetato de etila.

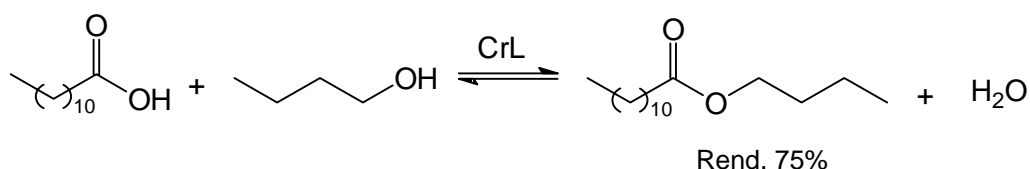
II - Sínteses - As reações de síntese, catalisadas por lipases, podem ser divididas em quatro categorias:

(a) Esterificação



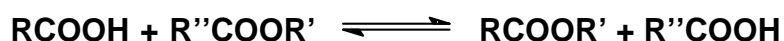
Em maio de 2002, Nagayama e col. investigaram o uso de organogéis baseados em microemulsões de lecitina como suportes para a lipase de *Candida rugosa* e sua utilização como catalisador, na reação de esterificação do ácido láurico com n-butanol.²²

(EQ. 3)

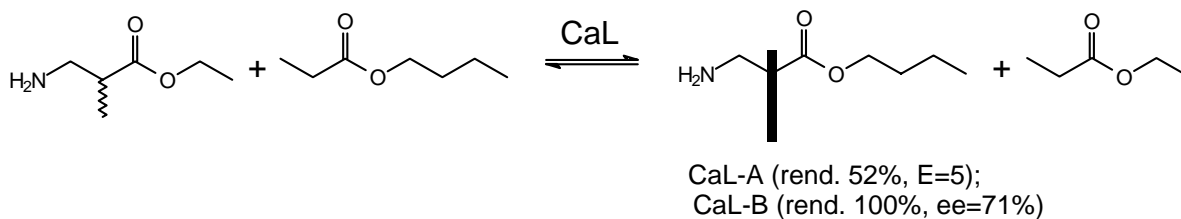


EQUAÇÃO 3 – Alcoólise do ácido láurico com o n-butanol.

(b) Interesterificação

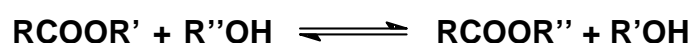


Solymár e col. publicaram em agosto de 2002 um trabalho sobre a interesterificação de derivados ésteres da α -metil- β -alanina com ésteres do ácido propanóico visando a resolução racêmica de aminoácidos. Os pesquisadores utilizaram as lipases de *Cândida antarctica A* e de *Candida antarctica B* como biocatalisadores das reações.²³ **(EQ. 4)**

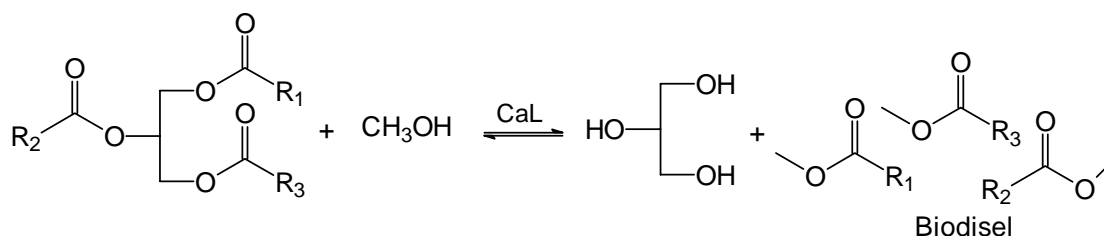


EQUAÇÃO 4 – Interesterificação do éster etílico da α -metil- β -alanina com o propanoato de butila.

(c) Alcoólise

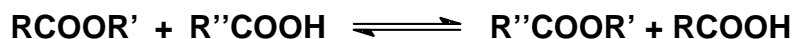


Shimada e col. desenvolveram um sistema de metanólise do óleo de soja por etapas para evitar a desnaturação do biocatalisador pelo metanol, utilizando um reator com a lipase de *Candida antarctica* imobilizada. O substrato (óleo residual de frituras e metanol) passou por várias etapas que evitaram o contato prolongado da enzima com o substrato tóxico, prevenindo a desnaturação da mesma.²⁴ **(EQ. 5)**



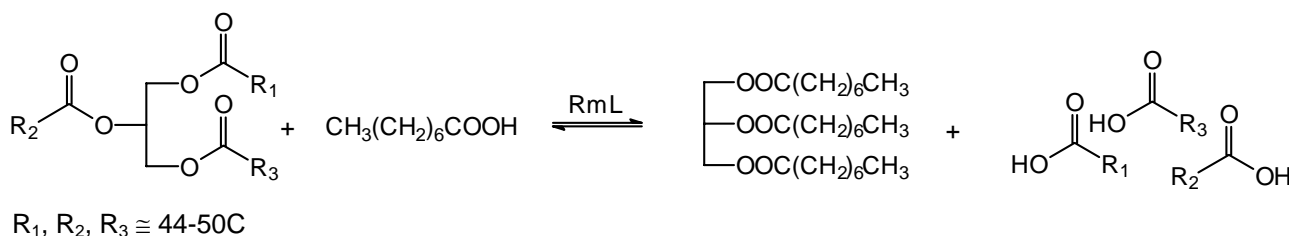
EQUAÇÃO 5 – Reação de metanólise de triacilgliceróis para obtenção de biodiesel.

(d) Acidólise



A acidólise catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL) do óleo de oliva com ácido caprílico foi estudada por Fomuso e Akoh e os seus resultados foram publicados no em 2000. Os triacilgliceróis de cadeias longas são depositados como gordura no corpo com maior facilidade que triacilgliceróis de cadeias médias.²⁵

Lee e col. demonstraram uma diminuição no ganho peso de camundongos alimentados com lipídios estruturados com 64% de ácido caprílico em relação aos camundongos alimentados com óleo de oliva comum devido à maior absorção deste último tipo de lipídio.²⁶ (EQ. 6)



EQUAÇÃO 6 - Acidólise de triacilgliceróis com o ácido caprílico.

As reações (b), (c), e (d) são agrupadas em um único termo que é a transesterificação.

O uso de lipases, nas reações acima citadas, é bem descrito na literatura.^{27,28,29,30,31,32} Estas também são utilizadas em reações de amidação³³ e síntese de peptídeos³⁴ e na formação de perácidos.^{35,36,37}

A utilização dessas enzimas em síntese orgânica tem sido de grande importância. Porém, a grande dificuldade ainda está em estabilizar estes catalisadores em meio orgânico para repetidos usos uma vez que dependendo do tipo, fonte, pureza e reações a serem utilizadas, estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Este fato pode torná-las catalisadores de custo elevado ao processo.

A busca de uma metodologia que melhore sua estabilidade no meio orgânico faz-se necessário para que a síntese de compostos complexos, que exigem vários passos, possa ser otimizada. Frente a este problema, técnicas de imobilização vem sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização.

1.3 - Imobilização de Enzimas

Estas técnicas envolvem ou a ligação em um suporte sólido insolúvel em água (ligação em suporte) ou ligações cruzadas intermoleculares de enzimas por reagentes bifuncionais ou multifuncionais. Alternativamente, o biocatalisador pode ser confinado em uma área da qual ele não pode sair, mas onde permanece cataliticamente ativo (confinamento em matriz sólida ou membrana de comportamento restrito). Apesar de não apresentar ligações e nem de confinar as enzimas fisicamente, os sistemas bifásicos também são considerados métodos de imobilização de enzimas, pois estas ficam retidas na água somente entrando em contato com o solvente orgânico através de agitação mecânica. **(FIG. 7)**

Dependendo da técnica de imobilização, as propriedades do biocatalisador, tais como estabilidade, seletividade, valores de K_m^* (constante de Michaelis), pH e características de temperatura, podem ser significativamente alterados.

A enzima quando imobilizada retém sua configuração estrutural devido às ligações de hidrogênio ou a formação de complexos que ocorrem na superfície do material. Isto leva a uma dificuldade na vibração da enzima levando a um aumento da estabilidade térmica. Pode-se observar, também, que o micro ambiente da superfície do suporte tem cargas que podem causar uma mudança no pH ótimo da enzima de até duas unidades. Observa-se com isto um alargamento da faixa de pH na qual a enzima atua. Isto permite ainda que enzimas que normalmente não têm regiões de pH semelhantes, possam atuar em uma mesma reação, através dos “coquetéis enzimáticos”.^{4,38,39}

* K_m é a concentração de substrato necessária para que a velocidade da reação seja metade da velocidade máxima da mesma.

Métodos de Imobilização de Enzimas

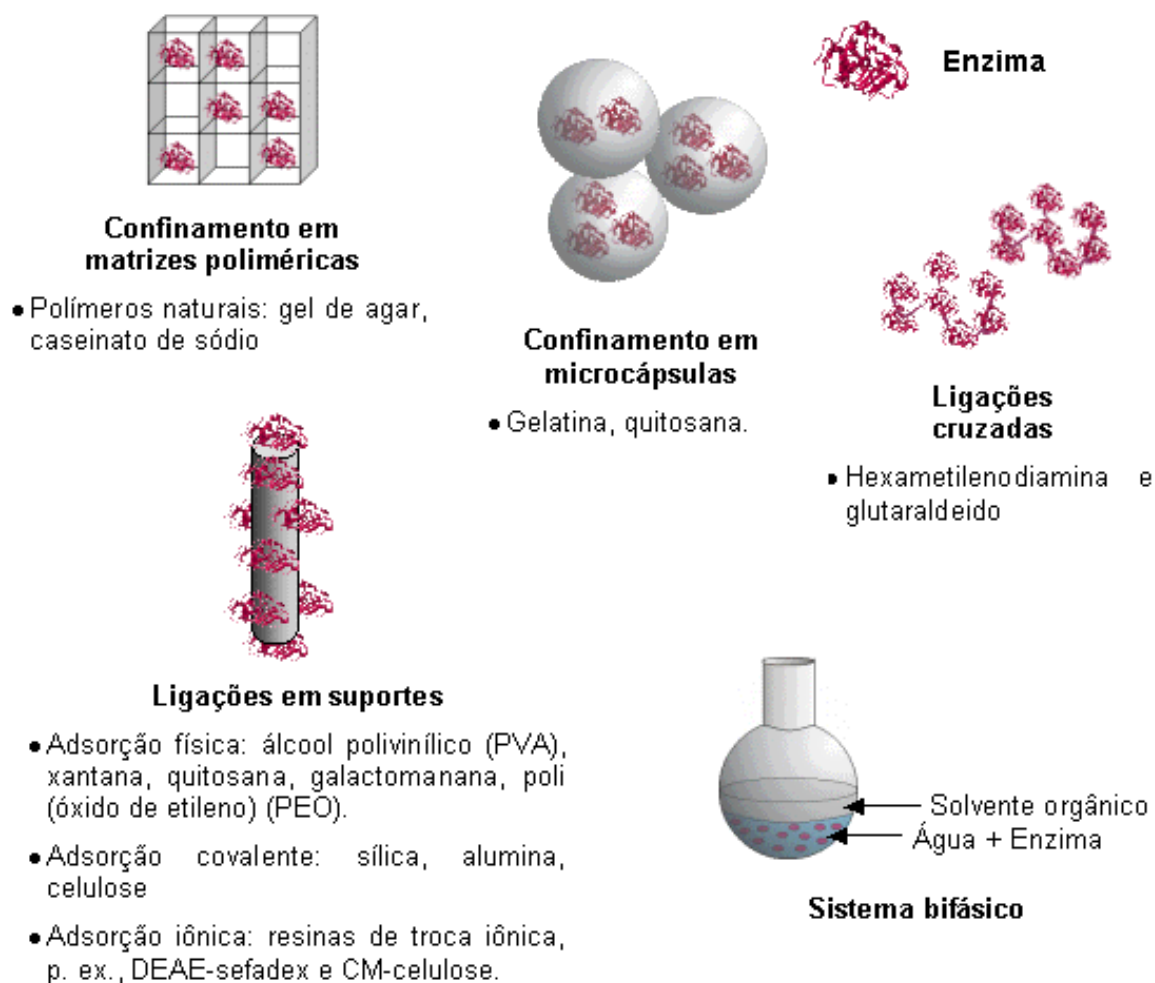


FIGURA 7 - Representações gráficas dos principais métodos de imobilização de enzimas.

1.3.1 - Imobilização em Suportes Sólidos

Vários desses métodos de imobilização vêm sendo utilizados nos últimos dez anos por grupos de pesquisa do mundo inteiro, visando tornar o uso destes biocatalisadores em solventes de baixa polaridade, uma prática rotineira em laboratórios de síntese orgânica.

Uma lipase microbial proveniente da *Pseudomonas sp.*, foi imobilizada em ACR-silica gel por Catoni e col. em 1996. Os autores promoveram a catálise na reação de esterificação do anidrido acético com diferentes álcoois secundários quirais, para investigar os efeitos de diversos solventes orgânicos sobre a eficiência desta reação.⁴⁰

A utilização de lipases imobilizadas por adsorção em membranas do tipo fibra oca de polieterimida em reatores, foi realizada por Merçon e col. em 1997. Os autores realizaram reações de hidrólise do óleo de babaçu em reatores de membrana, enquanto mantinham separadas as fases orgânica e aquosa.⁴¹

A imobilização da lipase da *Pseudomonas cepacea* utilizando como suporte polipropileno foi estudada por Pancreach e col. em 1997. Os autores demonstraram que há um aumento da atividade enzimática neste sistema.⁴²

Yang e col., em 1998, imobilizaram a β -galactosidase em perfluorocarbono (PFC) e determinaram a sua atividade na hidrólise da o-nitrofenil- β -galactose.⁴³

Em 1999, Masanobu e col. utilizaram a lipase da *Pseudomonas cepacia* adsorvida em tionita (TN-M) para resolução racêmica de álcoois secundários saturados, insaturados, alicíclicos e aromáticos.⁴⁴

Recentemente a lipase da *Fusarium solani* foi imobilizada em poliacrilamida e Dacron magnetizado por Knight e col., retendo 53% e 97% de atividade, respectivamente. Estudos cinéticos realizados pelos autores demonstraram que as lipases imobilizadas nestes suportes não seguiram a cinética de Michaelis-Menten.⁴⁵

Outros sistemas utilizados para imobilizar enzimas e microorganismos são: Eupergit C⁴⁶, a quitosana, a quitina⁴⁷, a crisotila^{48,49,50}, o gel de ágar, filmes de caseinato de sódio, poli(óxido de etileno)⁵¹ e montmorilonita K-10.⁵²

Alguns suportes poliméricos, como o gel de ágar e os filmes de caseinato de sódio e de poli(óxido de etileno), foram testados neste trabalho e na seqüência algumas das características desses materiais serão discutidas.

1.3.1.1 – Ágar-ágar

O ágar é uma mistura complexa de compostos polissacarídeos derivados de certas algas vermelhas. O principal componente gelificante do ágar é a agarose, um polímero neutro, basicamente um dissacarídeo que apresenta repetições de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. **(FIG. 8)**

Agarose

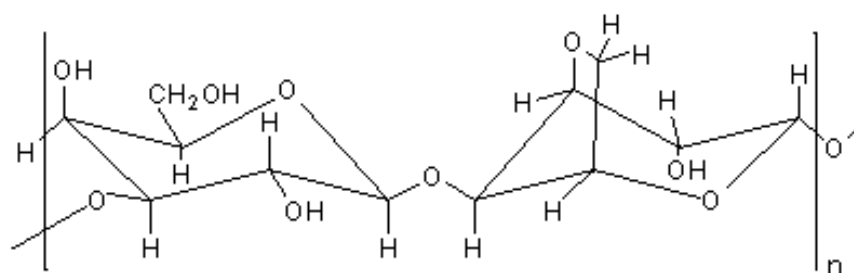


FIGURA 8 – Unidades repetidas AB do polímero de agarose.

A gelatinação da agarose é um processo bem estudado e ocorre quando soluções quentes de agarose são resfriadas abaixo de 40°C. Nas soluções quentes, as moléculas de agarose parecem se comportar como rolos endurecidos, mas quando tais soluções são esfriadas, géis duros, turvos e frágeis são formados.⁵³

Em função de suas propriedades, é utilizado como agente gelificante e/ou espessante,⁵⁴ e também como suporte para imobilização de enzimas.^{55,56}

1.3.1.2 – Caseinato de Sódio

O caseinato de sódio é um sal da caseína, que é a principal proteína do leite de vaca, correspondendo a 85% do total no mesmo, e é formada por várias frações protéicas, α , β , κ , γ , lactoglobulina e lactoalbumina. **(TAB. 1)**

TABELA 1 – Principais Proteínas do Leite.

Proteínas	%	P.M.
Caseína total	85	
α	50*	21.000
β	30*	24.000
κ	15*	20.000
γ	05*	20.000
Lactoglobulina	10	18.000
Lactoalbumina	02	16.000

* Porcentagem da caseína total.

A caseína é uma mistura de várias fosfoproteínas, sendo o principal componente do coalho e sua precipitação pode ser feita pela adição de ácido até atingir o pH do seu ponto isoelétrico, ou por adição de renina ao leite. A renina é uma enzima isolada do rúmen de bezerros, ou de cultura de fungos, e sua atuação começa por sua ação hidrolítica sobre a κ caseína com liberação de um glicopeptídeo de peso molecular 6.000 e formação da para-caseína κ .^{55,58}

As demais caseínas podem formar um precipitado gelatinoso combinando-se com os íons cálcio do leite. Aparentemente, a κ caseína estaria ligada às demais de forma a impedir sua combinação com íons cálcio e essa ligação seria rompida pela renina. O coalho obtido por ação da renina é geralmente mais macio do que aquele obtido por precipitação em meio ácido. No leite, a caseína se encontra na forma de polímeros, isto é, várias cadeias peptídicas unidas e de peso molecular de aproximadamente 20.000.⁵⁷

Cerca de 80-90% de toda a caseína do leite está na forma de partículas coloidais aproximadamente esféricas denominadas micelas, medindo de 50-200nm de diâmetro de peso equivalente a 10^7 - 10^9 daltons. As micelas são formadas de sub-unidades de tamanho uniforme (~10-20nm de diâmetro) contendo de 25-30nm de caseína com um peso médio de partícula da ordem de 6×10^5 .

As estruturas exatas das sub-unidades e das micelas de caseína ainda não foram determinadas, apenas alguns modelos têm sido sugeridos por diversos autores. Esses modelos recaem basicamente em duas categorias. A primeira, um conceito de “capa-núcleo” em que sub-unidades de α e β -caseínas formariam núcleos termodinamicamente estáveis em roseta cobertos por camadas periféricas de κ -caseína (**FIG. 9-A**). O segundo modelo representado por uma estrutura aberta composta de sub-unidades de tamanho uniforme contendo α e β -caseínas no centro e κ -caseína na periferia (**FIG. 9-B**). Ambos modelos permitem a associação das sub-unidades através de ligações de cálcio ou fosfato de cálcio coloidal, representado por **S** no modelo **B**.⁵⁸

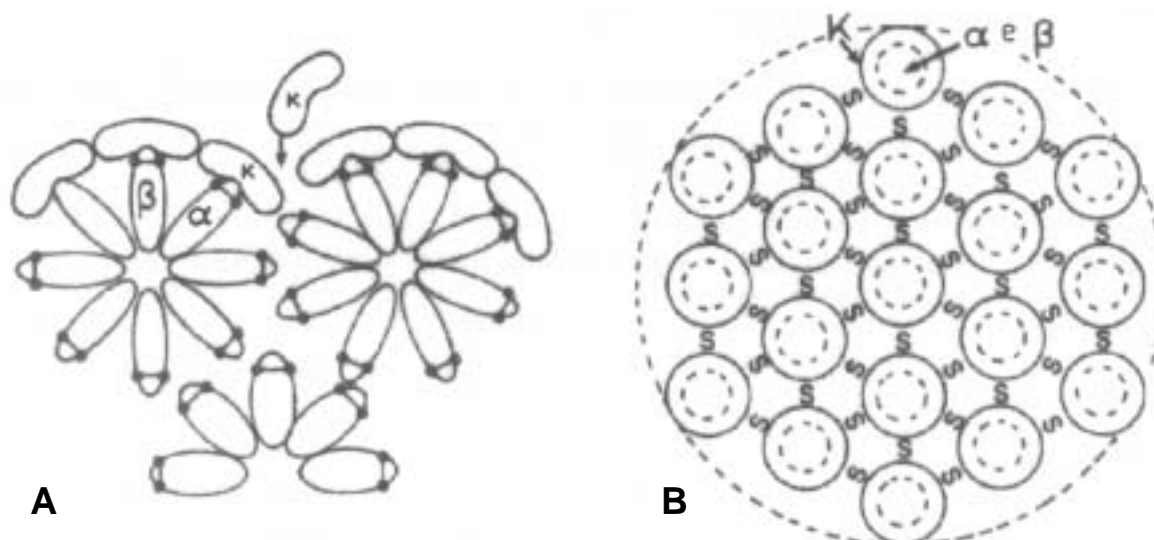
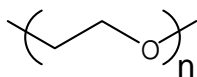


FIGURA 9 – Modelos sugeridos para as micelas de α , β e κ - caseína.

1.3.1.3 – Poli(óxido de etileno) (PEO)

Em comparação com outros suportes, tais como sílica, alumina e celite, os polímeros hidrofóbicos como o poli(óxido de etileno) e poli(propileno), levam a um aumento da atividade de enzimas da classe das lipases.⁵⁹ Nestes suportes, as enzimas são facilmente adsorvidas.

Estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada por Crespo, mostraram que não há diferença na morfologia de fratura do filme de PEO puro e com enzimas. Entretanto a morfologia da superfície do filme de PEO puro e com enzimas revelaram que estes biocatalisadores estão localizados preferencialmente na superfície do material polimérico.⁶⁰



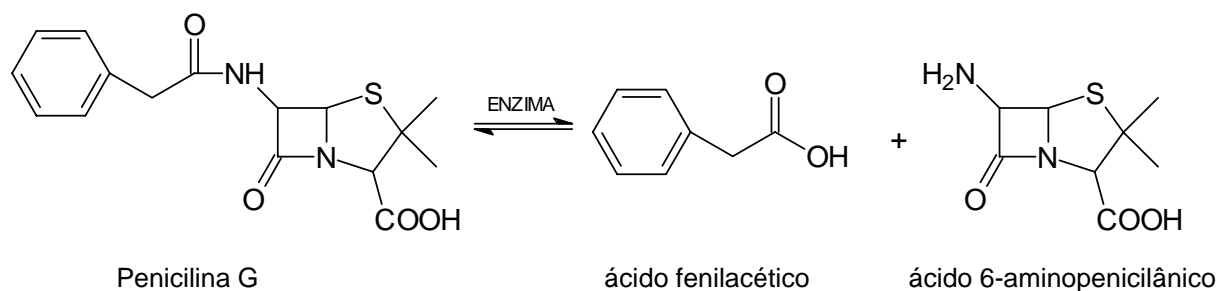
monômero do PEO

1.3.2 - Sistema Bifásico

O sistema bifásico foi utilizado pela primeira vez em reações biocatalíticas por Cremonesi e col. em 1973, onde os autores testaram a atividade catalítica da β -hidroxiesteróide dehidrogenase na desidrogenação de esteróides e a enzima

demonstrou atividade por longo período com alguns solventes orgânicos, tais como, 1-butanol, diclorometano e éter etílico.⁶¹

Em 1975, Buckland e col. utilizaram um sistema bifásico para conversão do colesterol em colesteno-4-eno-3-ona utilizando a *Nocardia sp.*⁶² Em 2002, Hollander e col. realizaram a hidrólise contínua da Penicilina G em um sistema água/acetato de butila catalisada pela penicilina acilase imobilizada.⁶³ (EQ. 7)



EQUAÇÃO 7 – Hidrólise enzimática da Penicilina G.

As principais vantagens do sistema bifásico são:

- reações de substratos insolúveis em água podem ser feitas em volumes reduzidos de uma mistura de reação;
- o produto pode ser facilmente separado do biocatalisador;
- a inibição da enzima por substratos ou produtos é minimizada devido a sua baixa concentração na fase aquosa, onde esta se localiza;
- enzimas hidrolíticas podem ser usadas em reações de transesterificação, síntese de peptídeos e reações de esterificação, visto serem estas reações termodinamicamente desfavoráveis em meio aquoso.

As desvantagens desse sistema são:

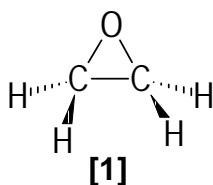
- inativação ou inibição da enzima pelo solvente (minimizada pela escolha do solvente);
- sistema em agitação permanente, para acelerar a reação;
- perda da atividade enzimática a cada repetição.

A utilização de enzimas em síntese orgânica tem como um de seus objetivos a minimização de condições reacionais drásticas, como por exemplo a substituição de ácidos minerais por estes catalisadores versáteis em reações de epoxidação. Neste trabalho reações químio-enzimaticamente catalisadas foram estudadas para a obtenção de

epóxidos, compostos de grande interesse sintético devido à sua alta reatividade causada pela tensão existente no anel de três membros.

1.4 - Epóxidos

Os epóxidos [1] são uma sub-classe de éteres, pois possuem unidade C-O-C. Contudo, o termo epóxido ou oxirano*, é usado para descrever o sistema heterocíclico de três membros, contendo dois carbonos e um oxigênio. Estes átomos estão ligados entre si através de ligações σ . As ligações C-O são polares devido à alta eletronegatividade do átomo de oxigênio.⁶⁴



A síntese dos epóxidos possui rotas variadas, e dentre estas pode-se destacar as via perácidos e a epoxidação nucleofílica que são as mais utilizadas em laboratórios de síntese orgânica. Estas e outras formas de epoxidação serão discutidas na seção sobre **epoxidação**.

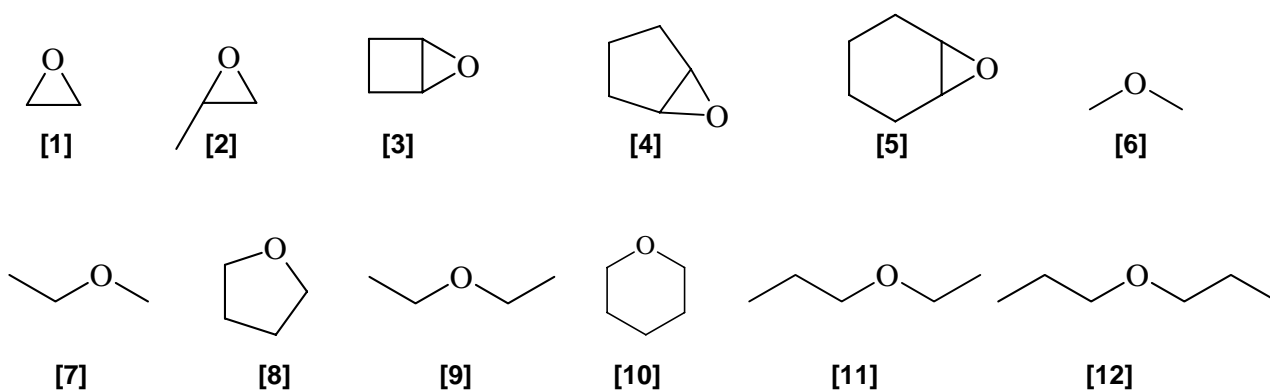
Os oxiranos diferem significativamente, tanto nas propriedades físicas quanto químicas, de seus análogos alifáticos e alicíclicos de cadeias longas. A característica principal destas moléculas é o pequeno ângulo de ligação endocíclica, imposto pelo anel de três membros ao carbono tetracoordenado e ao oxigênio dicoordenado; os ângulos de ligação para estas espécies em cadeias abertas estão em torno de 109° . Este é um fator desestabilizante, contribuindo para a tensão total inerente do sistema.⁶⁴ **(TAB. 2)**

* Oxirano é o termo utilizado pela IUPAC.

TABELA 2 – Calor de Formação de Alguns Éteres.

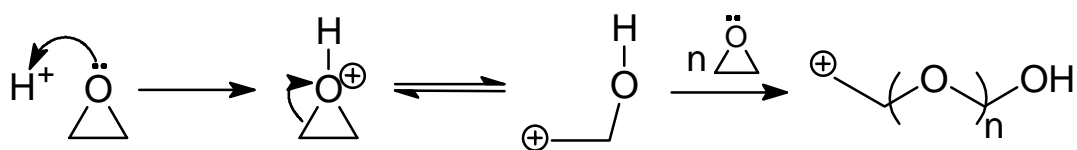
Fórmula	Nome	ΔH_f^*	Fórmula	Nome	ΔH_f^*
[1] C ₂ H ₄ O	oxirano	-52,6 (gás)	[6] C ₂ H ₆ O	éter dimetílico	-184,1 (gás)
[2] C ₃ H ₆ O	metiloxirano	-94,7 (gás)	[7] C ₃ H ₈ O	éter metil etílico	-216,4 (gás)
[3] C ₄ H ₆ O	2,3-dihidrofurano	-109,1 (liq.)	[8] C ₄ H ₈ O	tetrahidrofurano	-216,2 (liq.)
[4] C ₅ H ₈ O	6-oxabicyclo[3.1.0]hexano	-130,8 (liq.)	[9] C ₄ H ₁₀ O	éter dietílico	-279,3 (liq.)
[5] C ₆ H ₁₀ O	7-oxabicyclo[2.2.1]heptano	-223,9 (liq.)	[10] C ₅ H ₁₀ O	tetrahidropirano	-258,3 (liq.)
			[11] C ₅ H ₁₂ O	éter etil propílico	-303,6 (liq.)
			[12] C ₆ H ₁₄ O	éter di-n-propílico	-328,8 (liq.)

* valores em kJ.mol⁻¹



A maior reatividade dos epóxidos em relação aos éteres comuns está diretamente ligada a sua tensão conformacional, que é aliviada por ataques nucleofílicos ao carbono da ligação C-O causando a quebra da mesma e conseqüente abertura do anel. Esta reatividade diferenciada torna os epóxidos substâncias de grande interesse sintético, pois estes podem reagir com uma grande variedade de nucleófilos formando uma série de produtos, tipicamente álcoois 2-substituídos.⁶⁴

As reações de clivagem do anel oxirano são extremamente úteis em síntese orgânica, por exemplo, na síntese do poli(etilenoglicol). (EQ. 8)

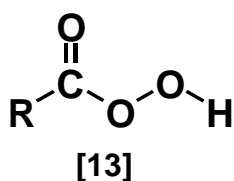


EQUAÇÃO 8 – Síntese do poli(etilenoglicol), via catálise ácida.

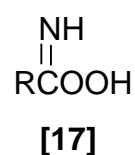
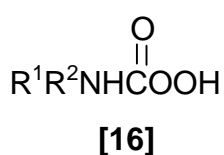
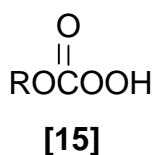
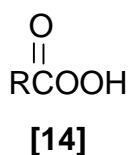
Uma das formas mais utilizadas para obtenção de epóxidos é através da oxidação de compostos insaturados por peróxi-ácidos, estes oxidantes podem ser obtidos através de uma reação de peridrólise, como exemplificado na **EQ. 2** (pág. 11).

1.5 – Peróxi-Ácidos

Os perácidos [13], ou peróxi-ácidos, são ácidos que possuem grupamento peróxido.



O peróxido de hidrogênio não é suficientemente eletrofílico para epoxidar diretamente olefinas e sua reatividade pode ser aumentada pela introdução de grupos elétron-atraentes como mostrado nos perácidos [14] – [17].



Estes compostos são oxidantes importantes em síntese orgânica assim como na indústria química. A oxidação mais comum, promovida pelos perácidos é a epoxidação de ligações C=C, mas estes também são utilizados em oxidações de Baeyer-Villinger e em numerosas oxidações catalisadas por metais de transição.⁶⁵

Apesar de sua importância como agente oxidante, o número de peróxi-ácidos disponíveis para síntese orgânica é muito limitado. Os ácidos perfórmico e peroxi trifluoroacético são formados *in situ* a partir de ácidos e peróxido de hidrogênio, enquanto os ácidos peracético e m-cloro-perbenzóico (MCPBA) e o sal de magnésio do ácido monoperóxi-ftálico, são produtos comerciais.

A produção quimio-enzimática dos peróxi-ácidos, catalisada por lipases, é atraente porque fornece aos químicos orgânicos sintéticos um importante oxidante em condições brandas (temperatura ambiente, pH neutro), permitindo que as reações de oxidação ocorram *in situ*, sem a necessidade de se isolar o perácido.

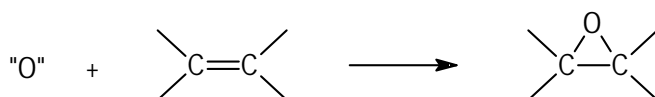
Estas reações podem ser feitas em sistema bifásico água/solvente orgânico, o que torna o isolamento de produtos de baixa polaridade por vezes mais fácil e evita, ou pelo menos diminui a desnaturação da lipase, pois esta enzima fica dissolvida na fase aquosa tendo pouco contato com o solvente orgânico.^{66,67}

Existem várias reações que utilizam os perácidos como agente oxidante e dentre elas pode-se destacar as reações de epoxidação.

1.6 - Epoxidação

A epoxidação é uma reação fundamental e importante em química orgânica e tem sido estudada extensivamente. A reação consiste na inserção de átomos de oxigênio em uma molécula para formação de um anel de três membros.

Normalmente não é fácil introduzir moléculas de oxigênio (p.ex., O₂) diretamente como na **EQ. 9**.



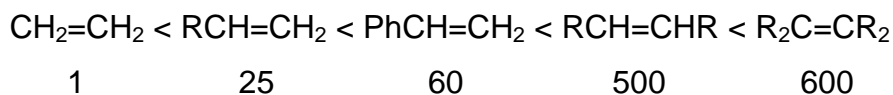
EQUAÇÃO 9 – Representação da inserção direta de oxigênio em alcenos.

Dioxigênios são reduzidos a peróxido de hidrogênio e estes por sua vez são ativados pela introdução de substituintes apropriados. Um exemplo típico é o perácido carboxílico, RCO₃H, que demonstra aumento de eletrofilicidade devido ao grupamento acila que é fortemente elétron-atrativo.

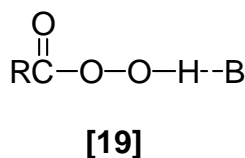
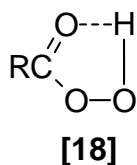
As epoxidações de olefinas são reações sintéticas e industriais importantes. Estas reações eletrofílicas têm sido repetidamente aplicadas e constantemente revisadas.⁶⁴

1.6.1 - Epoxidação Eletrofílica por Perácidos

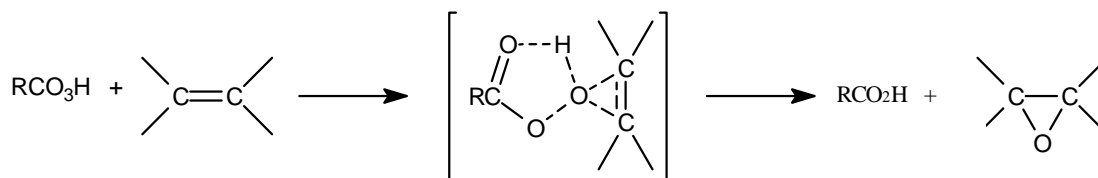
A principal característica dessa reação é que a epoxidação é acelerada pelo aumento da densidade eletrônica na ligação C=C e pelos grupos elétron-atraentes nos perácidos. As velocidades de epoxidação são significativamente reduzidas pelas ligações intermoleculares de hidrogênio com solventes como os éteres. A escala de reatividade (R=alquil) é importante para se prever a seletividade dos produtos.⁶⁴



A ligação intramolecular de hidrogênio **[18]** foi evidenciada por infra-vermelho e outras técnicas de análise. Em solventes nos quais possa haver coordenação, os perácidos existem como o complexo **[19]** com ligações intermoleculares de hidrogênio.⁶⁴



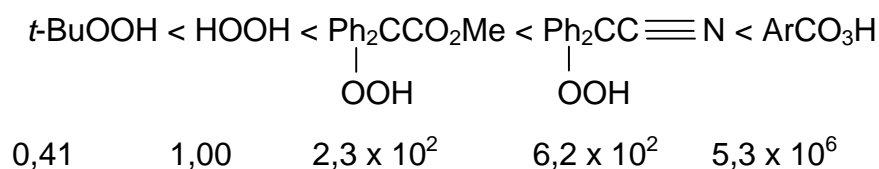
Por este motivo os efeitos do solvente são importantes nas reações de epoxidação por perácidos. Por exemplo, as velocidades de epoxidação em éter ou acetato de etila são aproximadamente 10 vezes mais lentas que em benzeno ou clorofórmio. As epoxidações muito mais lentas com perácidos de ligações intermoleculares **[19]** sugerem a importância do estado de transição cíclico **[20]** na **EQ. 10**.⁶⁴



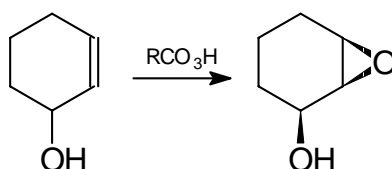
[20]

EQUAÇÃO 10 – Mecanismo de epoxidação de alkenos via perácidos.

A reatividade eletrofílica de vários hidroperóxidos pode variar em muitas ordens de magnitude desde o peróxido de hidrogênio até o perácido, como exemplo para a oxidação do sulfeto para sulfóxido.⁶⁴

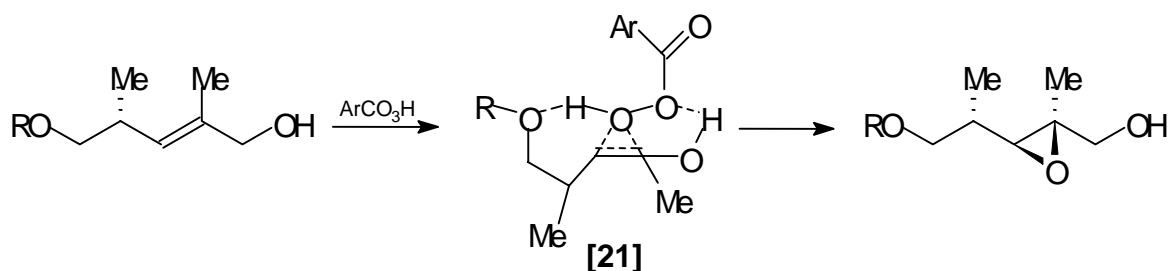


Quando grupos de coordenação estão disponíveis nas olefinas, esta ligação intermolecular de hidrogênio com os perácidos leva a uma epoxidação *syn*-seletiva. Um exemplo típico é a epoxidação *syn* de álcoois alílicos cíclicos. **(EQ. 11)**



EQUAÇÃO 11 – Epoxidação *syn* seletiva do 1-ciclohexen-3-ol.

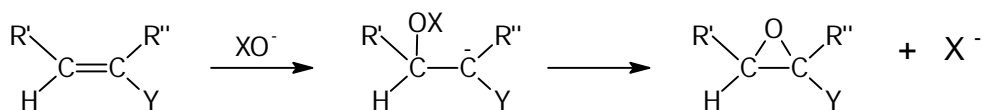
É interessante notar que um efeito cooperativo da ligação de hidrogênio foi observado na epoxidação de álcoois alílicos acíclicos. Uma epoxidação altamente seletiva pode ser realizada via ligação de hidrogênio cooperativa [21].⁶⁴ **(EQ. 12)**



EQUAÇÃO 12 – Efeito cooperativo de grupos de coordenação na reação de epoxidação.

1.6.2 - Epoxidação Nucleofílica

A reação de íons hidroperóxido com olefinas elétron-deficientes (**22**, Y = COR, CO₂R, CN, etc) é conhecida como epoxidação alcalina ou nucleofílica (ou epoxidação de Weitz-Scheffer). (**EQ. 13**)



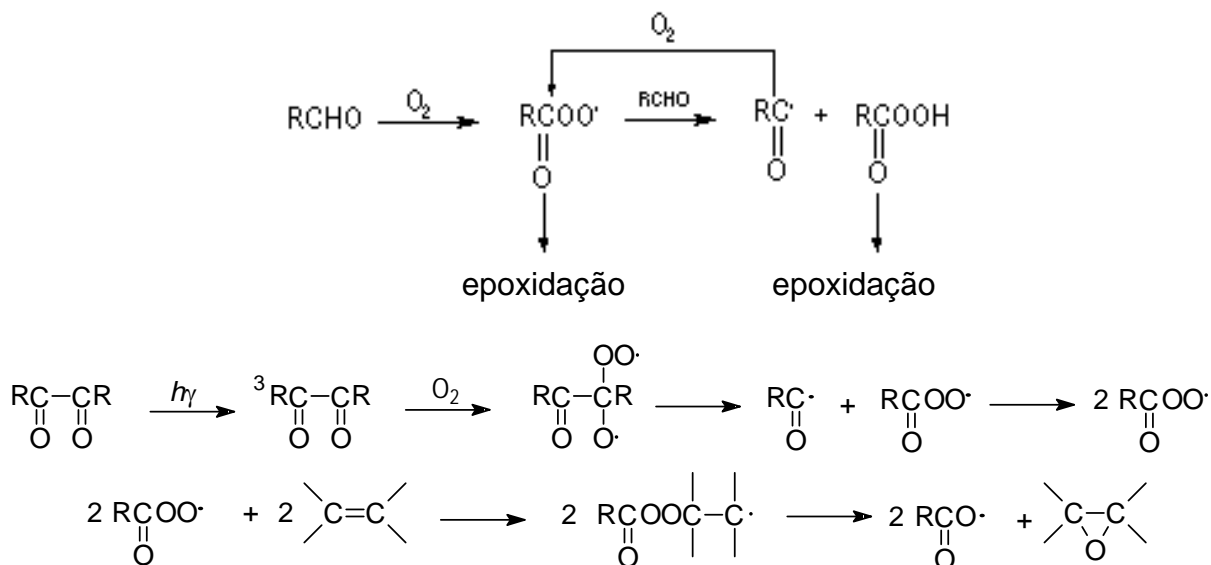
Y = COR, CO₂R, CN

EQUAÇÃO 13 – Reação de epoxidação nucleofílica.

Uma epoxidação alcalina típica é conduzida com peróxido de hidrogênio ou com hipoclorito de sódio na presença de hidróxido de sódio ou potássio em água ou solução aquosa de metanol.⁶⁴

1.6.3 - Epoxidação Radicalar

A co-oxidação de aldeídos e olefinas também é conhecida por resultar na epoxidação da olefina por perácidos e acil-peróxidos radicais como mostrado na **EQ. 14**. Shimizu e Bartlett demonstraram que a foto-oxidação de dicetonas sob oxigênio resulta em uma epoxidação eficiente.⁶⁴



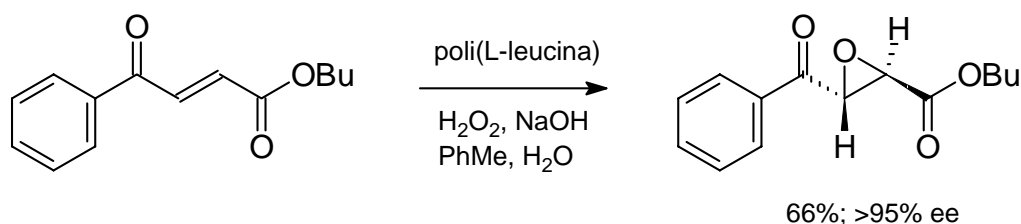
EQUAÇÃO 14 – Mecanismo de epoxidação radicalar.

As velocidades de epoxidação por perácidos são proporcionais à densidade dos elétrons- π das olefinas. As velocidades de epoxidação de olefinas alifáticas por radicais acil-peróxidos são relativamente menores do que as das reações por perácidos. Os oxidantes radicalares não são reativos com sulfetos e sulfóxidos. Contudo estes são facilmente oxidados por perácidos.⁶⁴

1.6.4 – Epoxidação Catalisada por Aminoácidos

A idéia original do uso de poli(alanina) ou poli(leucina) como catalisadores para epoxidação de cetonas α,β -insaturadas pode ser atribuída a Juliá (Barcelona) e Colonna (Milão). As equipes espanholas e italianas estudaram esta reação por um período de cerca de quatro anos no início dos anos 80.⁶⁸ (EQ. 15)

O mecanismo pelo qual poli(aminoácidos) simples catalisam uma epoxidação assimétrica tipo enzimática não está totalmente claro. Foi comprovado que nem todos poli(aminoácidos) podem ser empregados na reação de Juliá-Colonna; por exemplo poli(L-fenilalanina) e poli(L-valina) não demonstraram atividade catalítica.



Equação 15 – Epoxidação assimétrica de uma cetona α,β -insaturada catalisada por poli(L-leucina).

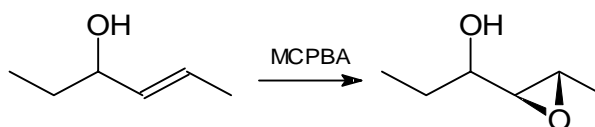
Existem algumas limitações na epoxidação assimétrica de Juliá-Colonna:

- Outros alcenos, que não sejam cetonas α,β -insaturadas, com sistemas “pobres” de elétrons geralmente não são reativos;
- Alcenonas tri-substituídas, no geral, também não apresentam reatividade.

1.6.5 – Epoxidação Químio-Enzimática de Alcenos

Muitos dos estudos para a utilização de lipases em síntese tem envolvido conversão assimétrica, um dos temas centrais da síntese orgânica moderna. A epoxidação químio-enzimática pode se tornar uma ferramenta importante nesta área, visto que a utilização de lipases, como catalisadores nas reações de perhidrólise pode fornecer perácidos carboxílicos com diferentes capacidades de oxidação e conseqüentemente com diferentes seletividades.

Sharpless* e Michaelson demonstraram que as reações de epoxidação, via perácidos, podem ser altamente seletivas, pois o produto da reação de epoxidação do 2 penten-4-ol com o ácido meta-cloro-perbenzóico (MCPBA) apresentou elevada pureza enantiomérica com 95% de formação do álcool de configuração (R).⁶³ (**EQ. 16**)



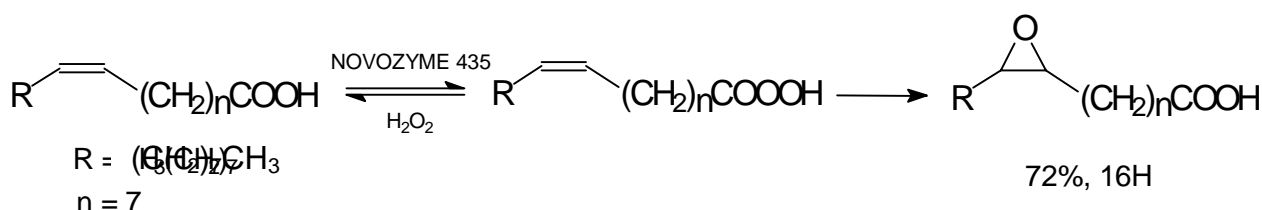
EQUAÇÃO 16 – Epoxidação do 2 penten-4-ol com MCPBA.

*K. Barry Sharpless (The Scripps Research Institute La Jolla, CA, EUA) ganhou o Prêmio Nobel de Química de 2001 pelo desenvolvimento de catalisadores metalo-orgânicos para epoxidação estereosseletiva de álcoois alílicos.

Trabalhos envolvendo a produção enzimática de perácidos foram descritos inicialmente por Björkling e col. no começo dos anos 90.⁶⁹

Cuperus e col. utilizaram em 1994, reatores de membrana com lipases imobilizadas em diferentes materiais poliméricos. As enzimas foram empregadas como catalisadores na hidrólise de triglicerídeos e na síntese de perácidos carboxílicos de alta reatividade.⁷⁰

Em 1995, Warwel e Klaas publicaram a epoxidação químio-enzimática de ácidos carboxílicos insaturados utilizando uma lipase imobilizada industrialmente em resina aniônica (Novozyme 435[®]).⁷¹ **(EQ. 17)**



EQUAÇÃO 17 – Epoxidação químio-enzimática do ácido oléico.

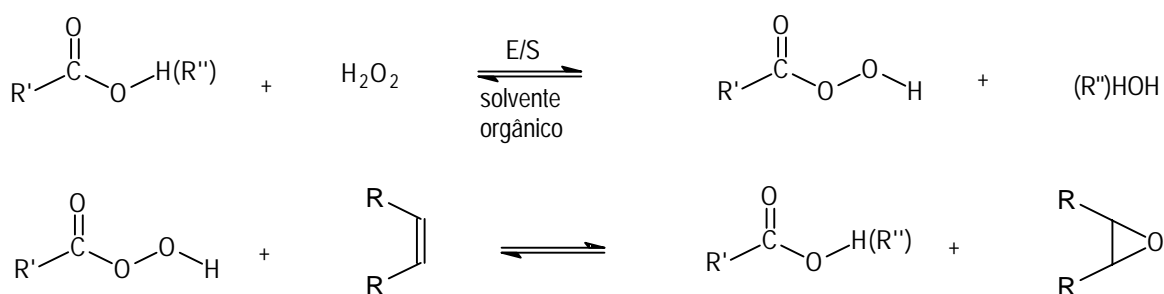
Estes últimos pesquisadores apresentaram novamente a comunidade científica em 1998 um trabalho sobre este mesmo tema, só que desta vez abordando a epoxidação completa e parcial de óleos de plantas. Óleos de plantas contendo grupos epóxidos são importantes óleo-químicos. A maior aplicação destes é o seu uso como plastificantes e estabilizadores no poli(cloreto de vinila) (PVC) devido a sua habilidade de capturar HCl livre reduzindo a degradação do polímero.⁷² Hilker e col., em 2001, também publicaram um artigo na Chemical Engineering Science abordando este mesmo assunto, só que com o uso de reatores e apresentando um modelo matemático para descrever o sistema reacional.⁷³

A indústria farmacêutica tem demonstrado grande interesse nos compostos assimétricos, visto que a atividade biológica de fármacos racêmicos muitas vezes reside em um único enantiômero. Sintetizar tais fármacos em sua forma enantioméricamente pura, está se tornando um caminho importante na química da biotransformação. Alguns fármacos resolvidos via catálise enzimática são descritos na literatura tais como: 1,4-benzodioxano, agente cardiovascular⁷⁴, Naproxen, agente antiinflamatório⁷⁵, Atenolol, tratamento de hipertensão e angina⁷⁶ e Cloranfenicol, agente antimicrobial.⁷⁷

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Utilizar lipases de diferentes fontes imobilizadas em diversos suportes e em sistema bifásico como biocatalisadores em reações de perhidrólise de ésteres e de ácidos carboxílicos para formação de seus respectivos perácidos, e a utilização destes na epoxidação *in situ* de compostos que contenham dupla ligação. **(EQ. 18)**



EQUAÇÃO 18 – Equação geral das reações estudadas neste trabalho.

2.2 - Objetivos específicos

- I. Investigar a estabilidade das lipases imobilizadas em filmes de caseinato de sódio, de PEO e em géis de ágar na reação de peridrólise de ésteres (ex.: laurato de etila, octanoato de etila) e posterior epoxidação *in situ* de sistemas que contenham dupla ligação (ex.: ciclo-hexeno, álcool alílico);
- II. Avaliar a atividade de lipases de diferentes fontes (ex.: *Rhizopus orizae*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas cepacia*, *Thermomices lanuginosus*) quando imobilizadas em vários suportes (ex.: filmes de caseinato de sódio, gel de ágar) para sua posterior utilização nas reações citadas anteriormente.
- III. A partir dos resultados dos itens I e II, estudar o efeito da variação das concentrações das lipases nas reações citadas acima.
- IV. Estudar o efeito da variação da concentração e estrutura dos reagentes (ésteres, ácidos e alcenos) na formação dos correspondentes epóxidos.
- V. Investigar o efeito do solvente e da temperatura nestas reações.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Preparação dos Suportes

3.1.1 – Filmes de Caseinato de Sódio

Os filmes de caseinato de sódio (CS) foram preparados através da solubilização de 1,5g de CS e 0,5g de glicerol em 15mL de água à temperatura ambiente. Após a formação de uma solução homogênea adicionou-se 100mg de lipase de *Rhizopus oryzae*. A seguir, esta solução foi espalhada em placa de petri de poli(estireno) (d=5cm). O solvente foi evaporado a temperatura ambiente para a formação do filme, e posteriormente retirado da placa e cortado em seções de áreas regulares de aproximadamente 2 mm^2 .⁷⁸

3.1.2 – Filme de PEO

O filme de PEO foi preparado através da solubilização de 500mg do polímero em 20mL de água, com agitação constante por 12 horas. Após este período foi adicionado 1mL de Lipolase. O sistema foi mantido sob agitação por mais 4 horas. O solvente foi evaporado a temperatura ambiente para formação do filme e posteriormente este foi retirado da placa e cortado em seções de áreas regulares de aproximadamente 2 mm^2 .⁷⁹

3.1.3 – Gel de ágar

O gel de ágar, foi preparado em duas partes. O ágar (0,4g) foi adicionado em um tubo de ensaio e a seguir adicionou-se 9mL de água. A mistura foi mantida a 100°C em um banho-maria. Nesta temperatura o ágar se dissolve. A solução de ágar foi resfriada à temperatura de aproximadamente 40°C , e a seguir, adicionada a solução de lipase de concentração conhecida (vide **TAB. 4** e **5**, pág. 38). O sistema foi homogeneizado e colocado em uma peneira sobre uma placa de petri. Após a estabilização do gel, a peneira foi retirada, e assim se formaram pequenos cubos de gel com enzima.⁸⁰

Os filmes poliméricos ou o gel de ágar contendo os biocatalisadores, foram utilizados nas reações de perhidrólise de ésteres ou ácidos carboxílicos.

3.1.4 – Sistema Bifásico

O sistema bifásico foi preparado adicionando-se a um balão de 125mL, 5mL de água destilada, 1mL de solução de peróxido de hidrogênio 30%, 6mL de solvente orgânico e lipases livres de diferentes fontes ou imobilizada industrialmente, como a Novozyme 435. Os solventes utilizados e as quantidades de lipases estão descritos nas **TAB. 7, 8 e 9** (pág. 42, 44, 45) e/ou no rodapé das figuras na seção Resultados e Discussão.

3.2 – Equipamentos e Caracterização dos Produtos

As reações foram feitas com o auxílio de um banho termostatizado MQBTZ99-20 (Micro Química) e dois agitadores magnéticos MQAMA-301 (Micro Química). Os produtos obtidos foram caracterizados e analisados por técnicas usuais de ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-RMN}$) em um espectrômetro Varian EM 360L.

3.3 – Reagentes, Solventes e Lipases Utilizadas

Os reagentes, todos de grau P.A., utilizados neste trabalho foram:

- Aldrich: ácido octanóico, poli(óxido de etileno), tetra metil silano (TMS), clorofórmio deuterado (CDCl_3), cariofileno;
- Merck: octanoato de etila, tolueno, xileno, álcool alílico, α -metil-estireno, 1(R)-(+)- α -pineno;
- Vetec: hexano, peróxido de hidrogênio, ácido laúrico, ágar-ágar, tetracloreto de carbono; ácido hexadienóico, ácido laúrico;
- Grupo Química: acetato de etila, etanol, heptano;
- Reagen: ciclohexanol, ácido fosfórico, dicloro metano, glicerol;
- Fluka: 1,4-dioxano;
- Anchor: caseinato de sódio;
- Nuclear: clorofórmio;
- Dinâmica: éter etílico;
- Citro Suco: D-limoneno.

As lipases utilizadas estão descritas na **TAB. 3**.

TABELA 3 – Lipases Utilizadas Neste Trabalho.

Fonte	Nome comercial	Atividade
<i>Pseudomonas cepacia</i>	PSL	30000u/g
<i>Rhizopous orizae</i>	F-AP15	150000u/g
<i>Mucor javanicus</i>	M	10000u/g
<i>Rhizomucor miehei</i>	Lipozyme [®]	5-6BAUN/g
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	PaL	----
<i>Penicillium coriophyllum</i>	PcL	----
<i>Thermomices lanuginosus</i>	Lipolase	100000u/g
<i>Candida antarctica</i>	Novozyme 435 [®]	10000PLU/g
Pancreática de porco	PPL	135000u/g
<i>Aspergillus niger</i>	A	120000u/g
<i>Candida rugosa</i>	CrL	746000u/g
<i>Mucor miehei</i>	Palatase M	1000 LU/g

(a) A atividade catalítica, obtida pelos fornecedores das Lipases PP, CrL, A, AY, F, M (Amano) e Palatase M (Novozymes) é definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto (unidade/grama (u/g) ou unidade de lipase/grama (LU/g)). Para a Lipolase a unidade de atividade catalítica obtida pelo fornecedor (Novozymes), é a mesma utilizada pelas lipases acima citadas. Para a Lipozyme, o fornecedor (Novozymes) determina unidades de atividade catalíticas diferenciadas. Para a Lipozyme é baseada em experimento de acidólise

As lipases de *Penicillium aurantiogriseum* e de *Penicillium coriophyllum* foram isoladas pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Nádia Krieger e pela doutoranda Valéria M. G. Lima do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (Curitiba-PR). As mesmas foram utilizadas sem purificação.

3.4 – Métodos Experimentais

3.4.1 – Preparação do Ciclohexeno

Para preparação do ciclohexeno utilizou-se 10g (100mmoles) de ciclohexanol e 3mL (44mmoles) de ácido fosfórico concentrado em um balão de fundo redondo de 100mL, alguns fragmentos de porcelana foram adicionados ao balão para um maior controle da ebulição dos reagentes. O balão foi ajustado a um sistema para destilação fracionada e a temperatura na extremidade da coluna controlada para que não ultrapassasse 90°C. A destilação foi interrompida quando restava apenas um pouco de resíduo a ser destilado.

O destilado foi transferido para um funil de separação e saturado com cloreto de sódio. Adicionou-se 2mL de carbonato de sódio a 5%. O ciclohexeno bruto foi colocado em um erlenmeyer, e a este se adicionou-se 3g de cloreto de cálcio anidro. Após agitação o sistema foi colocado em repouso por 15minutos. A mistura foi filtrada e o ciclohexeno bruto destilado novamente (81-83°C, 75%).⁸¹

3.4.2 – Reações de Epoxidação Químico-Enzimática com Lipases Imobilizadas

Inicialmente utilizou-se quantidades variadas da lipase de *Mucor miehei*, imobilizada em gel de ágar, e de *Candida antarctica* (Novozyme 435[®]), imobilizada industrialmente em poliacrilato (vide **TAB. 4 e 6**, pág. 38 e 40), em um sistema com 15mL de solvente orgânico (tolueno ou hexano), 5mmoles do reagente que continha a ligação C=C (**TAB. 4 e 6**), 10mmoles de éster (laurato de etila ou octanoato de etila) ou de ácido (ácido octanóico) e mais 24 injeções de 30µL a cada 30 minutos de peróxido de hidrogênio 30% (720µL, 7,5mmoles). Estes sistemas foram colocados em banho termostaticado do tipo Dubnoff à 30°C por tempos variados sob agitação contínua.

No prosseguimento dos ensaios preliminares, quantidades variadas de lipases de diversas fontes (vide **TAB. 5**, pág.38) foram imobilizadas em gel de ágar ou filme de PEO ou de CS e colocadas em um sistema reacional com 15mL de tolueno, 10mmoles de ácido octanóico, 2,5mmoles de ciclohexeno e mais 9 injeções de 30µL a cada 30 minutos de peróxido de hidrogênio 30% (270µL, 3,0mmoles). Os sistemas, e uma barra de

agitação magnética, foram colocados em um balão de 125mL, este foi preso em uma haste de ferro e colocado sobre uma placa de agitação magnética por 24 horas à 30^oC.

3.4.3 – Reações de Epoxidação Químico-Enzimática em Sistema Bifásico

Em um balão, com o sistema descrito na seção 3.1.4, adicionou-se 10mmoles de octanoato de etila ou ácido octanóico e 5mmoles do reagente que continha a ligação C=C (p. ex.: ciclohexeno, álcool alílico). O balão contendo uma barra de agitação magnética foi colocado em um reator termostatizado a temperaturas variadas sobre uma placa de agitação por tempos também variados (os tempos e as temperaturas reacionais utilizados nos experimentos estão descritos nas tabelas, nos gráficos ou nos rodapés dos mesmos).

Os ensaios foram acompanhados retirando-se alíquotas do meio reacional orgânico em tempos pré-determinados e analisadas por RMN-¹H (com CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno, δ = 0,0ppm).

Por exemplo, para a epoxidação do ciclohexeno esta determinação foi feita através da equação **Conv. % = [B/(A+B)]x100**, onde **A** é o valor da integral da área do singlete dos hidrogênios ligados aos carbonos da dupla ligação (hidrogênios em azul, 5,6ppm) e **B** é o valor da integral da área do singlete dos hidrogênios ligados aos carbonos do anel oxirano (hidrogênios em vermelho, 3,1ppm). (**FIG. 10**)

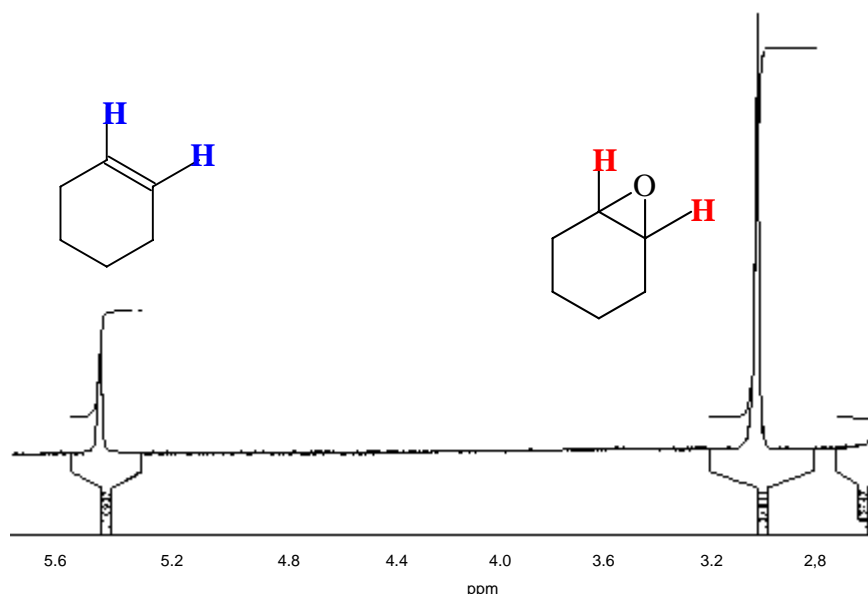


FIGURA 10 – Espectro de RMN-¹H da fase orgânica da reação de epoxidação química-enzimática do ciclohexeno (77%). Condições reacionais: Novozyme 435 = 50mg, 30^oC, 6 horas.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

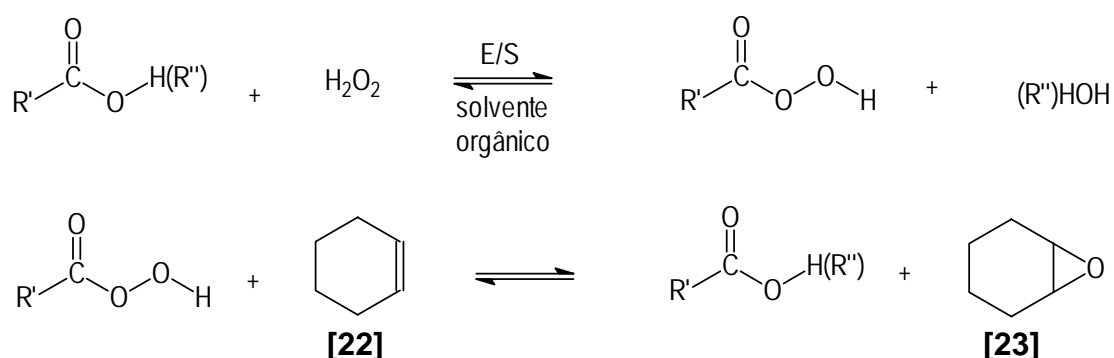
O objetivo deste trabalho foi avaliar diversos parâmetros físico-químicos da reação de epoxidação químico-enzimática de compostos que contenham dupla ligação carbono-carbono. Lipases de diferentes fontes, imobilizadas ou não em suportes poliméricos foram utilizadas como catalisadores desta reação. Estudou-se, também, a variação dos sistemas com a dupla ligação carbono-carbono e dos substratos ésteres e ácidos.

Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos primeiramente para as reações que utilizaram as enzimas imobilizadas em materiais poliméricos e injeções periódicas de peróxido de hidrogênio, e na seqüência para as que foram feitas em sistema bifásico com o peróxido de hidrogênio sendo adicionado de uma única vez.

4.1 – Polímeros como Suporte para Lipases em Reações de Epoxidação Químico-Enzimática

As **TAB. 4 e 5** apresentam as conversões obtidas do ciclohexeno **[22]** em óxido de ciclohexeno **[23]** dos ensaios nos quais lipases imobilizadas em gel de ágar foram utilizadas como biocatalisadores, e como substratos carboxílicos; laurato de etila, octanoato de etila ou ácido octanóico e como solventes externos: tolueno ou hexano.

(EQ.19)



R' = C₁₁H₂₃; C₇H₁₇
R'' = C₂H₅

EQUAÇÃO 19 – Epoxidação químico-enzimática do ciclohexeno (reação padrão).

TABELA 4 – Epoxidação Químio-enzimática do Ciclohexeno Utilizando a Palatase M Imobilizada em Gel de Ágar como Biocatalisador.

*[E] _{Palatase M}	Tempo (h)	Doadores Acila	Solventes	Conv. %
Sem enzima	24	Laurato de etila	Tolueno	n.d.
0,5	24	Laurato de etila	Hexano	n.d.
0,3	24	Laurato de etila	Tolueno	n.d.
0,5	24	Laurato de etila	Tolueno	n.d.
0,5	48	Laurato de etila	Tolueno	n.d.
0,5	24	Octanoato de etila	Tolueno	n.d.
1,0	24	Octanoato de etila	Tolueno	n.d.

n.d. = não houve detecção do produto, *[E] = mL/10g de gel, ciclohexeno=5mmol, H₂O₂(30%)=720μL, 30°C.

A **TAB. 4** demonstra que mesmo com a variação de diversos parâmetros não foi observado a formação do produto epoxidado com este sistema reacional.

A seguir, avaliou-se a atuação de diversas lipases, imobilizadas no gel de ágar, na mesma reação citada anteriormente. Os resultados obtidos estão expostos na **TAB. 5**.

TABELA 5 – Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno Catalisada por Lipases de Diversas Fontes Imobilizadas em Gel de Ágar.

Lipase	Lipase/10g de Gel	Doador Acila	Conv. %
F-AP15	100mg	Ácido octanóico	n.d.
PS	100mg	Ácido octanóico	n.d.
PP	100mg	Ácido octanóico	n.d.
Lipolase	1,0mL	Ácido octanóico	30

n.d. = não houve detecção do produto, 24 horas, tolueno, ciclohexeno=5mmol, H₂O₂(30%)=720μL, 30°C.

Os resultados obtidos e apresentados nas **TAB. 4 e 5** demonstraram que o gel de ágar não foi um bom suporte para as lipases utilizadas como biocatalisadores nos sistemas reacionais estudados neste trabalho. Estes resultados devem ser decorrentes da forte interação do peróxido de hidrogênio com a água existente no gel de ágar (~90%)

dificultando a interação deste reagente com o sitio ativo das lipases e fazendo com que a formação do perácido fosse muito baixa ou nenhuma.

O filme de PEO foi utilizado como suporte para a Lipolase e este sistema empregado como catalisador na reação de epoxidação do ciclohexeno com o ácido octanóico como doador acila e o tolueno como solvente externo. Obteve-se uma conversão do ciclohexeno em epóxido de **70%**. Contudo o filme de PEO foi completamente dissolvido no meio reacional, fato que tornaria mais dispendioso o isolamento do produto e inviabilizaria a reutilização da enzima suportada. Devido a este fato este suporte não foi mais utilizado, sendo testados novos sistemas reacionais.

O filme de caseinato de sódio também apresentou o mesmo problema de solubilidade no meio reacional, sendo que desta vez não foi detectada a formação do produto quando a lipase F-AP15 foi suportada e utilizada como biocatalisador na reação de epoxidação do ciclohexeno com o ácido octanóico como doador acila e o tolueno como solvente externo. Provavelmente a enzima foi desnaturada pelo meio reacional, que é de baixa polaridade, ou pela água oxigenada. Apesar dos resultados obtidos neste experimento com o filme de caseinato de sódio, excelentes rendimentos em produto e um grande número de reutilizações do sistema enzima/suporte foram obtidos quando este filme foi utilizado como suporte de lipases em reações biocatalisadas de esterificação.⁸²

4.2 – Utilização da Novozyme 435[®] em Epoxidações Químio-Enzimáticas com Adições Periódicas de H₂O₂

Na seqüência do trabalho, fez-se um estudo da utilização da Novozyme 435[®] como catalisador da reação de epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno [22], álcool alílico [24], ácido 2,4-hexadienóico [25] e do oleato de etila [26]. O octanoato de etila foi utilizado como doador acila nas reações, exceto com o oleato de etila, sendo que nesta

epoxidação este éster foi testado como doador acila e ao mesmo tempo receptor do oxigênio na epoxidação. Os resultados obtidos são apresentados na **TAB. 6**.

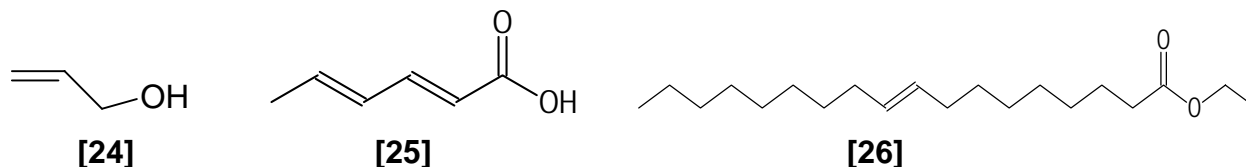


TABELA 6 – Epoxidações Químio-Enzimáticas Catalisadas por Novozyme 435[®]

Adutos	Novozyme 435 [®] (mg)	Conv. (%)
Ciclohexeno + Octanoato de etila	100	83
Ciclohexeno + Octanoato de etila	50	80
Álcool alílico + Octanoato de etila	50	n.d.
Ác. 2,4-Hexadienóico + Octanoato de etila	50	n.d.
Oleato de etila	50	n.d.

n.d. = produto não detectado, 24 Horas, tolueno, alceno=5mmoles, H₂O₂(30%)=720μL, 30°C

De acordo com os dados demonstrados na **TAB. 6**, pode-se observar que o ciclohexeno foi o único reagente que apresentou resultados consistentes para o método de análise empregado, pois o espectro da fase orgânica das reações com este substrato apresentou os singletos dos hidrogênios do reagente e do produto em regiões distintas e livre de outros sinais (**FIG. 10**). Para os outros compostos testados não foi possível detectar a formação de produtos oxidados devido a sobreposição de sinais.

Na reação com o álcool alílico, a análise dos espectros de RMN-H¹ da fase orgânica antes e depois de 24 horas de reação, apresentou uma mudança na multiplicidade do sinal centrado em $\approx 4,0$ ppm (característico de grupo metileno ligado ao oxigênio carbonílico), que provavelmente foi devido a uma transesterificação do octanoato de etila com o álcool alílico. Os espectros das reações dos compostos **[25]** e **[26]** não apresentaram sinais dos respectivos epóxidos após 24 horas.

Fez-se também uma investigação da influência do tempo na reação da epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno a 30⁰C, utilizando o ácido octanóico como doador acila.

O experimento foi feito com o decréscimo do tempo, sendo o primeiro de 24 horas, pois este foi adotado como padrão para efeito de comparação entre as reações feitas com outras lipases. O experimento não foi feito para tempos inferiores a 3 horas, pois esse era o mínimo necessário para injeção total do peróxido de hidrogênio. (FIG. 11)

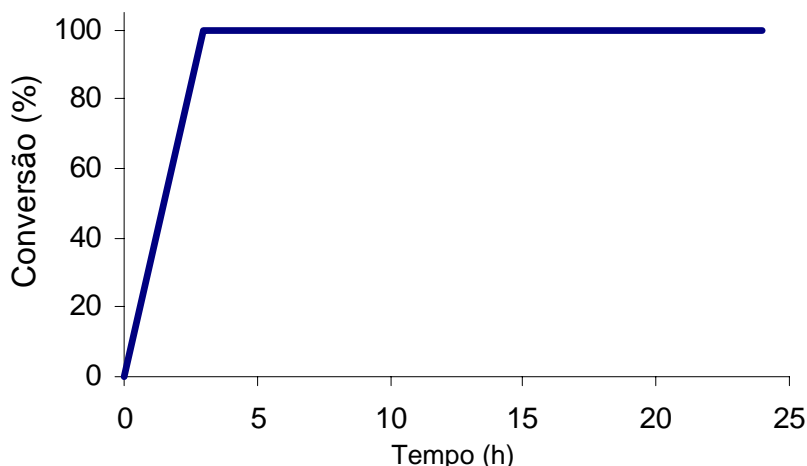


FIGURA 11 – Influência do tempo na epoxidação químico-enzimática do ciclohexeno com adições periódicas de H_2O_2 . Condições reacionais: 50mg de Novozyme 435[®], ciclohexeno=5mmol, H_2O_2 (30%)=720 μ L, 30°C, tolueno.

Pode-se observar na **FIG. 11** que mesmo quando o tempo de reação foi de somente 3 horas as conversões foram quantitativas para este sistema. Apesar dos excelentes resultados obtidos neste experimento, encontrou-se um problema que poderia trazer alguma dúvida quanto ao processo; a injeção manual do peróxido de hidrogênio durante um período tão longo poderia acarretar erros no número de injeções aplicadas no meio reacional. Um sistema de injeção automática deve ser empregado para que não haja dúvidas na quantidade de peróxido de hidrogênio adicionada.

4.3 – Epoxidação Químico-Enzimática em Sistema Bifásico com Diversas Lipases

Devido a dificuldade citada anteriormente, buscou-se um novo sistema reacional onde o peróxido de hidrogênio pudesse ser incorporado de uma única vez sem que

houvesse desnaturação da enzima; optou-se então pelo sistema bifásico água/solvente orgânico, pois a água além de proteger a lipase da desnaturação pelo solvente orgânico também diminuiria a velocidade de ataque do peróxido à enzima pela diluição do mesmo. Os ensaios foram feitos como descrito na seção 3.1.4.

Em uma primeira etapa utilizaram-se lipases de fontes variadas na reação de epoxidação do ciclohexeno, e os resultados obtidos estão descritos na **TAB. 7**.

TABELA 7 – Epoxidação Químico-Enzimática do Ciclohexeno Utilizando Lipases de Fontes Variadas em Tolueno.

Lipases	Quantidade	Conv. (%)
Novozyme 435 ^{® a}	100mg	93
PSL ^b	100mg	53
F-AP15 ^b	100mg	45
M ^b	100mg	12
CrL ^c	100mg	2
Palatase M ^a	100mg	<1
Lipozyme ^a	100mg	n.d.
PaL ^d	0,5mL	n.d.
PcL ^d	0,5mL	n.d.
Lipolase ^a	100mg	n.d.
PPL ^c	100mg	n.d.
A ^b	100mg	n.d.

n.d.=não detectado, octanoato de etila=10mmoles, ciclohexeno=5mmoles, H₂O₂(30%)=1mL, 30^oC, 24 horas. (a) Novozymes, (b) Amano, (c) Sigma, (d) isolada e não purificada.

Na **TAB. 7** pode-se observar que quando a reação foi catalisada pelas lipases Lipozyme, PaL, PcL, Lipolase, PPL e A, a formação ou detecção do produto não foi alcançada. Quando foram usadas a Palatase M, CrL e M as reações apresentaram conversões muito baixas (<1, 2 e 12% respectivamente). Os melhores resultados foram obtidos quando foram empregadas como catalisadores as lipases Novozyme 435[®], PS e F-AP15 (93, 53 e 45% respectivamente).

A comparação dos resultados apresentados na **TAB. 7** com a atividade catalítica das lipases (**TAB. 3**) demonstrou que aparentemente estes dados não estão

relacionados, pois reações catalisadas por lipases com atividades menores apresentaram, em alguns casos, conversões maiores em epóxido. Por exemplo, a reação catalisada pela lipase PS (30000u/g) teve uma conversão de 53%, enquanto que a catalisada pela lipase PP (135000u/g) não formou o produto desejado.

Os resultados (**TAB. 7**) podem estar relacionados à conformação do sítio catalítico das lipases, que segundo Pleiss e col. se diferenciam muito de uma lipase à outra, fazendo com que cada uma delas tenha uma maior eficiência catalítica dependendo do substrato empregado.⁸³ Outro fator que também deve ser levado em consideração é a sensibilidade ao peróxido de hidrogênio que provavelmente deve ser diferenciada em cada uma delas.

4.4 – Influência do Solvente na Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno em Sistema Bifásico

Uma área muito ativa nas pesquisas em biotecnologia é a biocatálise em meio orgânico. Existem muitas vantagens em se conduzir reações biocatalíticas em misturas de solventes orgânicos/água, como os citados na seção 1.3.2.

As lipases Novozyme 435[®] e F-AP15 (livre), duas das que apresentaram os melhores resultados no estudo com a variação das lipases, foram utilizadas como catalisadores na reação de epoxidação do ciclohexeno, com o octanoato de etila como doador acila, para avaliação do solvente orgânico a ser empregado no sistema bifásico. Os $\log P^*$ dos solventes utilizados variaram de -1,1 (1,4 dioxano) até 4,0 (heptano). Os resultados estão descritos nas **TAB. 8 e 9**.

* $\log P$: É o logaritmo do coeficiente de partição do solvente em água/octanol, uma medida quantitativa da polaridade do solvente.⁸⁰

TABELA 8 – Influência do Solvente na Epoxidação Químico-Enzimática do Ciclohexeno Catalisada pela Lipase F-AP15 em Sistema Bifásico.

Solvente	log P	Índice de Polaridade	Conv. (%)
1,4 dioxano	-1,1	4,8	2
acetato de etila	0,71	---	n.d.
acetato de etila (tampão pH=7,26)	0,71	---	n.d.
éter etílico	0,85	2,9	22
dicloro metano	0,93	3,4	7
clorofórmio	2,0	4,3	23
tolueno	2,5	2,3	45
tetracloroeto de metila	3,0	1,7	57
xileno	3,1	2,4	49
hexano	3,5	0,0	43
octanoato de etila	3,8	---	48
heptano	4,0	0,0	42

n.d.=não detectado, água destilada=5mL, octanoato de etila=10mmol, ciclohexeno=5mmol, H₂O₂(30%)=1mL, 24 horas, 30°C.

As conversões obtidas nas reações que utilizaram a lipase F-AP15 livre apresentaram concordância com o trabalho de Laane e col., no qual solventes com log P entre 2 e 4 são mais indicados para o uso em biocatálise do que solventes com log P <2. Esta correlação entre polaridade e atividade está ligada à habilidade do solvente orgânico em afetar (por exemplo, através de ligações de hidrogênio) a micro camada aquosa que estabiliza as enzimas hidrolíticas.⁸⁴

Na reação com o acetato de etila, mesmo em meio tamponado, não houve formação do produto. Pode ter ocorrido a formação do perácido, mas como o produto da hidrólise do acetato de etila forma pontes de hidrogênio com o peróxi-ácido, a formação do estado de transição **[20]** (seção 1.6.1) será dificultada e conseqüentemente a formação do epóxido.⁶²

Os resultados dos experimentos de efeito do solvente, utilizando a Novozyme 435[®], estão apresentados na **TAB. 9**.

TABELA 9 - Influência do Solvente na Epoxidação Químico-Enzimática do Ciclohexeno Catalisada pela Novozyme 435[®] em Sistema Bifásico.

Solventes	log P	Índice de Polaridade	Conv. (%)
éter etílico	0,85	2,9	30
dicloro metano	0,93	3,4	88
clorofórmio	2,0	4,3	65
tolueno	2,5	2,3	93
tetracloro de metila	3,0	1,7	30
xileno	3,1	2,4	45
hexano	3,5	0,0	n.d.
octanoato de etila	3,8	---	>99
heptano	4,0	0,0	14

n.d. = não detectado, 24 horas, água destilada=5mL, octanoato de etila=10mmoles, ciclohexeno=5mmoles, H₂O₂(30%)=1mL, 30°C

Os resultados expostos na **TAB. 9** não demonstraram o mesmo comportamento catalítico da Novozyme 435[®] comparado com da lipase F-AP15. (**TAB. 8**) Com a F-AP15 foi possível observar uma preferência para os solventes com log P entre 2,5 e 4,0.

Com a Novozyme 435[®] observou-se um comportamento diferenciado ao da F-AP15, provavelmente devido ao fato de a Novozyme 435[®] ser imobilizada industrialmente em resina aniônica. Esta “barreira” polimérica pode ter causado uma dificuldade de difusão do reagente e/ou dos solventes com menores índices de polaridade fazendo com que uma menor quantidade do ciclohexeno entrasse em contato com o peróxi-ácido formado *in situ*, dificultando assim a epoxidação do alceno.

Pôde-se verificar que quando o octanoato de etila foi utilizado como solvente e doador acila obteve-se boas conversões em epóxido nas reações catalisadas tanto pela Novozyme 435[®] (>99%) quanto pela lipase F-AP15 (48%).

4.5 – Influência do Tempo na Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno em Sistema Bifásico

Na seqüência deste trabalho foi feito um estudo do tempo de reação retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos pré-determinados e utilizando o tolueno como solvente externo.

Este estudo foi feito para a reação padrão catalisada por Novozyme 435[®] e pela lipase F-AP15, sendo que para a Novozyme 435[®] utilizaram-se como doadores acila o ácido octanóico ou o octanoato de etila e para a lipase F-AP15 somente o octanoato de etila. Os resultados obtidos estão apresentados na **FIG.12**.

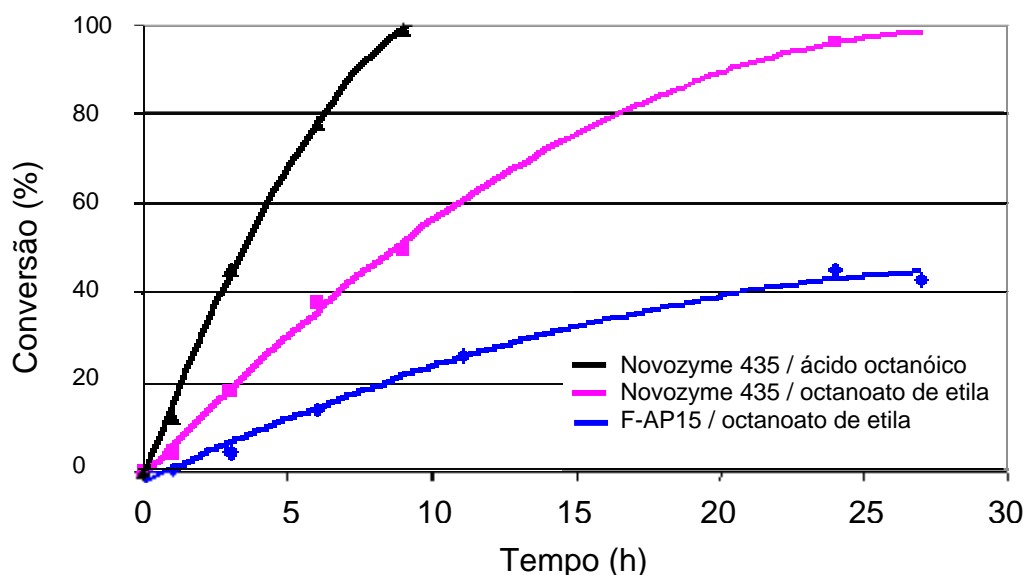
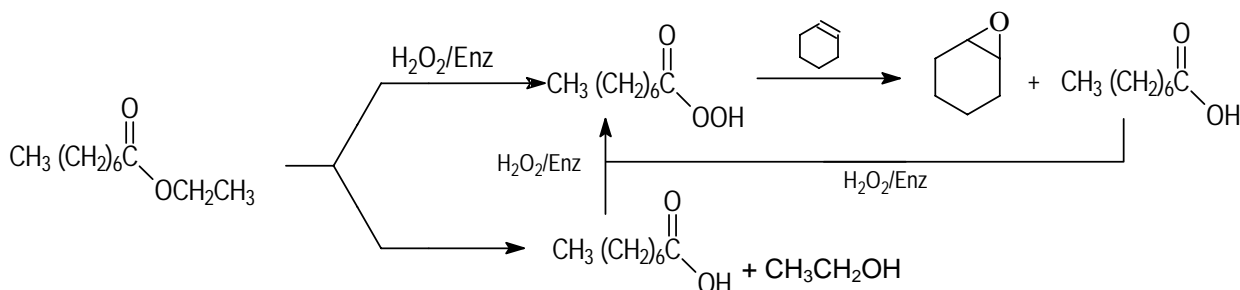


FIGURA 12 – Influência do tempo na epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno em sistema bifásico. Condições reacionais: 100mg de F-AP15, 50mg de Novozyme 435[®], ciclohexeno=5mmol, H₂O₂(30%)=1mL, 30^oC, tolueno.

Os resultados desse experimento confirmam a maior eficiência catalítica da Novozyme 435[®] em relação a lipase F-AP15 para a reação de perhidrólise do octanoato de etila. Em 24 horas de reação as conversões a produto foram quantitativas enquanto que neste mesmo período a reação catalisada com a F-AP15 apresentou conversões de 45% ao produto.

Quando o ácido octanóico foi usado como doador acila na reação catalisada pela Novozyme 435[®], obteve-se conversões quantitativas do produto em apenas 9 horas. Este resultado é provavelmente devido ao fato de não haver reações paralelas, pois com o octanoato de etila além da reação de perhidrólise também ocorre, no sítio catalítico da enzima, a hidrólise do éster. **(ESQ. 2)**



ESQUEMA 2 – Reações paralelas na epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno com octanoato de etila e/ou ácido octanóico como doadores acila.

4.6 – Influência da Temperatura na Epoxidação Químio-Enzimática do Ciclohexeno em Sistema Bifásico

O estudo da influência da temperatura de reação foi realizado para o sistema padrão (vide **EQ. 19**, seção 4.1), sendo este catalisado pela Novozyme 435[®], utilizando o octanoato de etila como doador acila e tolueno como solvente externo. Os resultados expostos na **FIG. 13**, foram obtidos após 24 horas de reação.

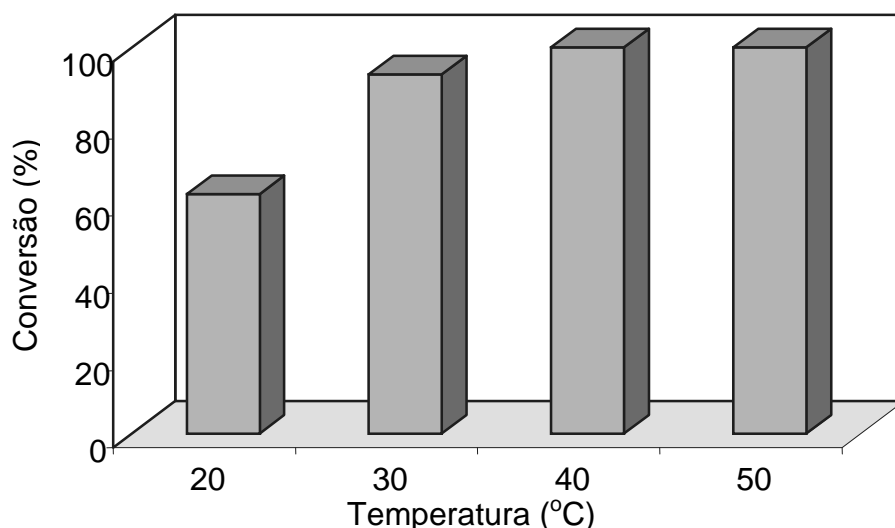


FIGURA 13 – Epoxidação químio-enzimática do ciclohexeno catalisada Novozyme 435[®] (50mg) em sistema bifásico a temperaturas variadas, ciclohexeno=5mmol, H₂O₂(30%)=1mL, 24 horas.

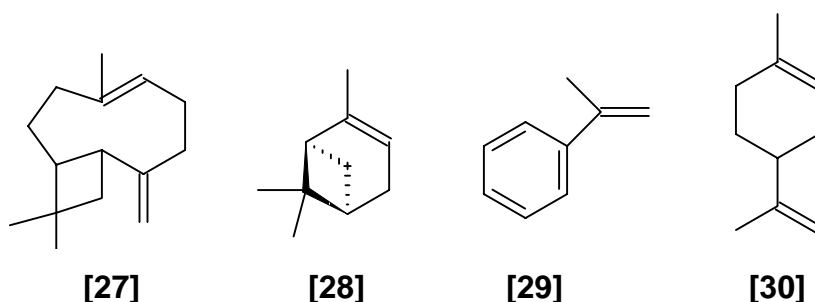
Os resultados apresentados na **FIG. 13** estão de acordo com informações obtidas na ficha técnica da Novozyme 435[®].⁸⁵ Esta lipase é termoestável e sua temperatura ótima reacional esta na faixa de 70-80^oC. Contudo a temperatura operacional recomendada pelo fabricante deve ser entre 40 e 60^oC para que não haja inativação térmica da enzima.

Não foram feitos experimentos acima de 50^oC, pois os sistemas reacionais utilizados não eram adequados para tais temperaturas, poderia haver decomposição do peróxido de hidrogênio, evaporação do solvente ou da água utilizada no controle da temperatura e/ou problemas no equipamento, que poderia não suportar temperaturas elevadas por períodos longos.

4.7 – Epoxidação Químio-Enzimática de Compostos com Dupla Ligação Carbono-Carbono em Sistema Bifásico

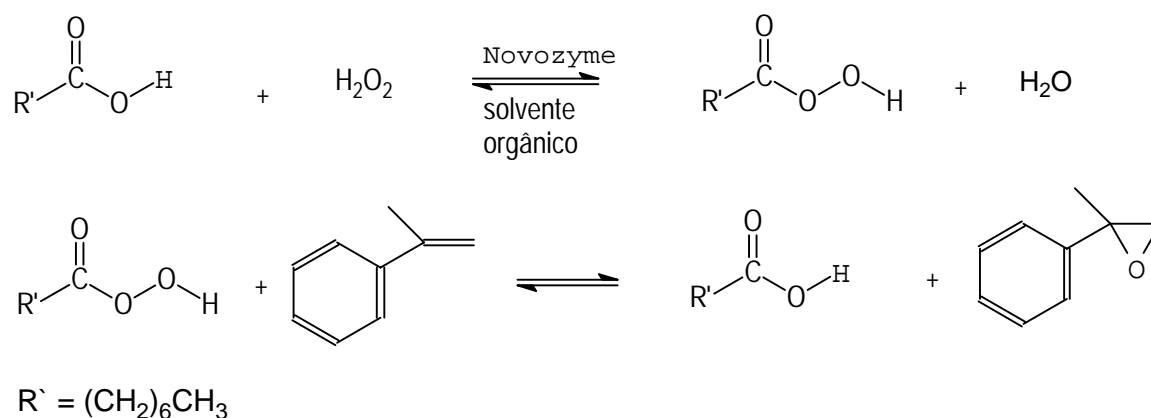
Neste experimento utilizaram-se vários compostos que possuem dupla ligação carbono-carbono (álcool alílico [24], cariofileno [27], 1(R)-(+)-pineno [28], α -metilestireno [29], D-limoneno [30]) para se avaliar a capacidade de epoxidação do sistema químio-

enzimático e do método de análise. As reações foram feitas à 30⁰C, com o tolueno como solvente externo e as alíquotas foram retiradas após 24 horas.



No experimento que utilizou o álcool alílico **[24]**, novamente observou-se apenas a esterificação do mesmo com o ácido octanóico (utilizado como doador acila). Tanto para o álcool **[24]** como para o cariofileno **[27]** e o 1(R)-(+)-pineno **[28]** não foi possível fazer a detecção da formação de produtos oxidados através da análise dos espectros de RMN-¹H, pois estes não apresentaram sinais dos reagentes nem dos produtos após 24 horas de reação, devido provavelmente à alta pressão de vapor destes compostos que fez com que eles evaporassem antes mesmo de reagirem.

Para o α -metilestireno **[29]** a análise do espectro de RMN-¹H da fase orgânica demonstrou que houve 25% de epoxidação do composto. **(EQ. 20)**



EQUAÇÃO 20 – Epoxidação químio-enzimática do α -metilestireno.

Esta determinação pode ser feita através da comparação do dublete metilênico do composto **[29]** (centrado em 5,2ppm, em azul) e do duplo dublete metilênico do correspondente epóxido (centrado em 2,8ppm, em vermelho). (**FIG. 14**)

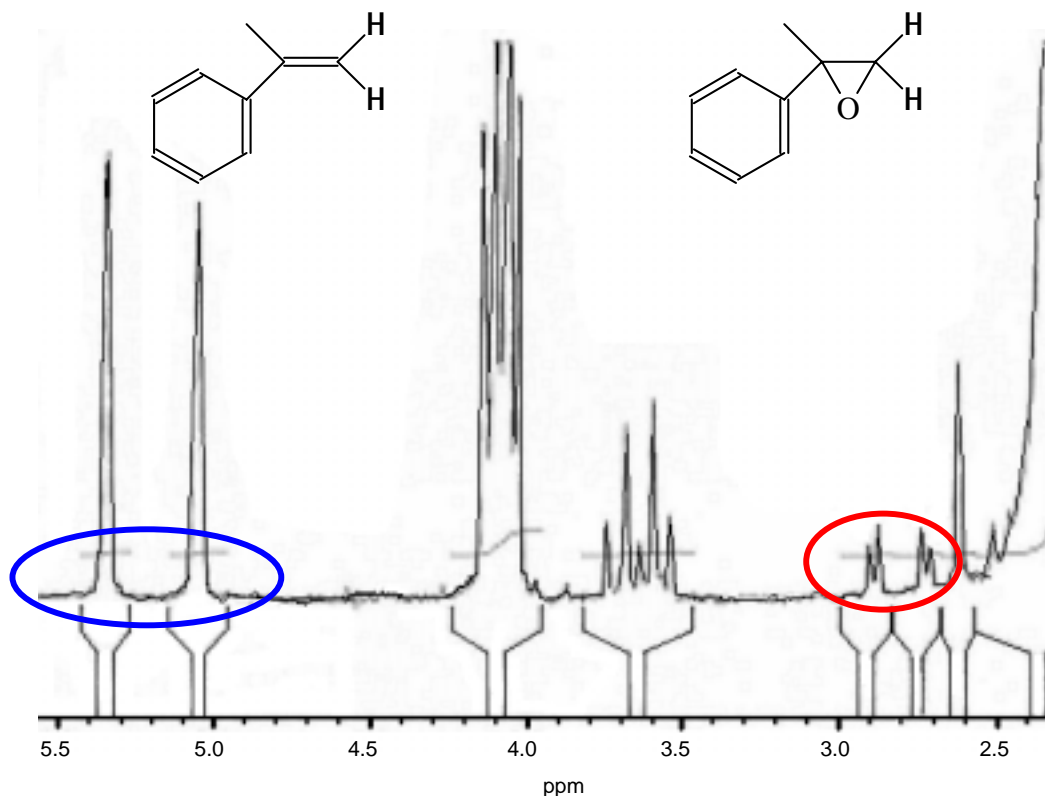


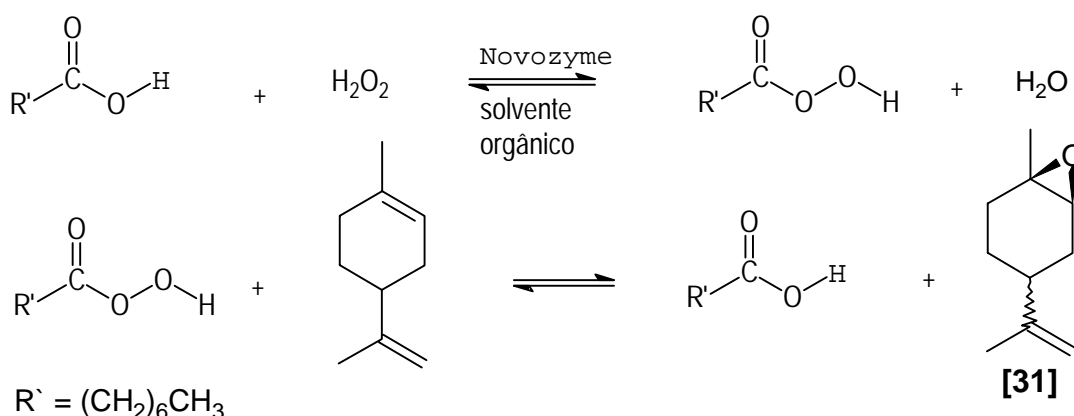
FIGURA 14 – Espectro ampliado de RMN-¹H [2,5 – 5,5 ppm] da fase orgânica da reação de epoxidação do α -metilestireno (5mmol) com a Novozyme 435[®] (50mg), à 30^oC, por 24 horas em tolueno. (200MHz)

Apesar do valor de conversão do α -metilestireno ser aparentemente baixo, supõe-se que este resultado possa ser melhorado com o aumento da quantidade de enzima empregada, com a adição periódica do peróxido de hidrogênio ou com o aumento da temperatura de reação.

O D-limoneno, extraído de óleos cítricos, usualmente é epoxidado em etapas intermediárias para elaboração de fragrâncias, perfumes e aditivos na indústria alimentícia. Um dos processos mais utilizados é a epoxidação estequiométrica com perácido. Contudo, a epoxidação seletiva de monoterpenos é difícil de se conseguir com

perácidos comerciais (p.ex., MCPBA) devido a sua força oxidativa, pela qual mono- e di-epóxidos, assim como produtos clivados são obtidos simultaneamente.⁸⁶

A reação de epoxidação do D-limoneno **[30]** foi realizada em sistema bifásico água/tolueno sendo o ácido octanóico utilizado como doador acila, com agitação magnética por 24 horas à 30°C, e a quantificação feita através da análise da fase orgânica, na qual foi possível observar que houve uma epoxidação régiosseletiva deste composto. **(EQ. 21)**



EQUAÇÃO 21- Epoxidação régiosseletiva do D-limoneno.

A dupla ligação contida no anel do D-limoneno, cujo hidrogênio (H_a) apresenta um sinal centrado em 5,5ppm foi totalmente epoxidada. Este fato que pôde ser constatado através do espectro de RMN-¹H (após 24 horas de reação) onde observa-se o aparecimento de um sinal centrado em 3,0ppm, característico do hidrogênio (H_a) do epóxido **[31]**, e o desaparecimento do sinal centrado em 5,5ppm. A outra dupla ligação, externa ao anel (centrada em 4,7ppm), provavelmente não reagiu, pois as integrações dos sinais do hidrogênio contido no anel (H_a) e dos hidrogênios metilênicos (H_b) da dupla externa demonstrou que foi mantida a relação de $1H_a:2H_b$ (0,295:0,610). **(FIG 15 e 16)**

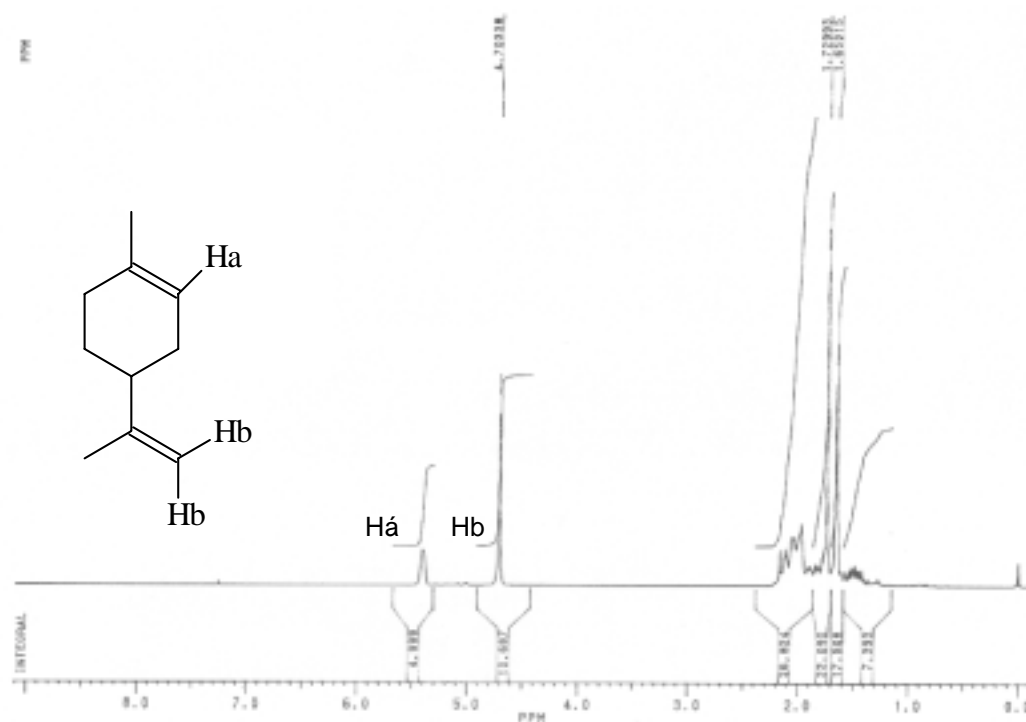


FIGURA 15 – Espectro de RMN- ^1H do D-limoneno, CDCl_3 (200MHz).

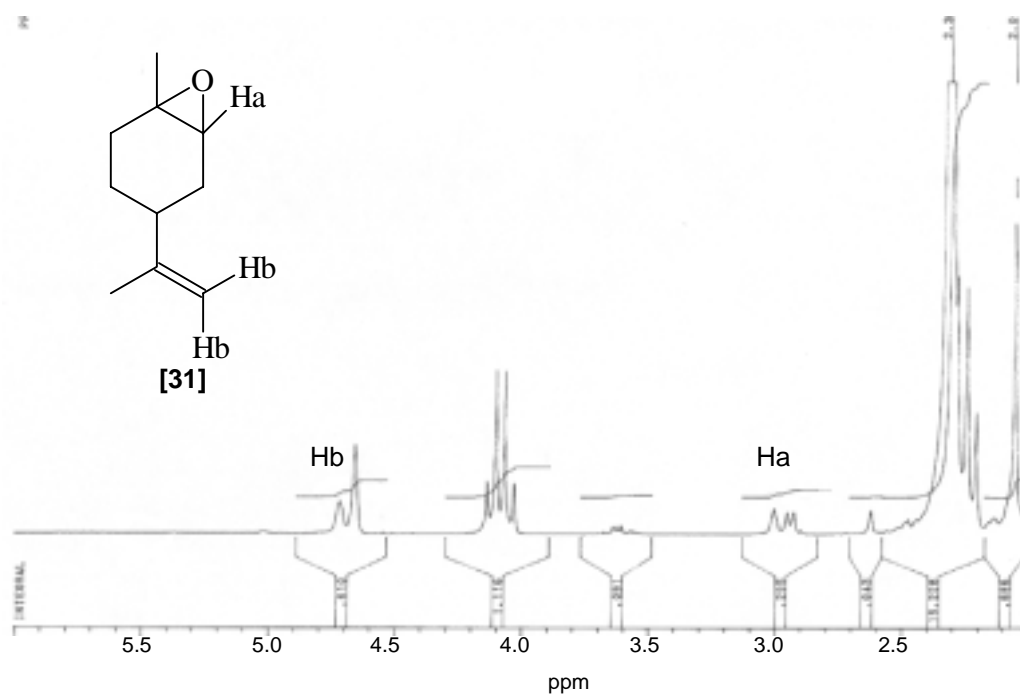


FIGURA 16 – Espectro ampliado de RMN- ^1H [2,0 – 6,0ppm] da fase orgânica da reação de epoxidação químico-enzimática do D-limoneno catalisada pela Novozyme 435[®] (50mg) a 30[°]C após 24 horas, CDCl_3 (200MHz).

Apesar da reação de epoxidação ser conduzida via perácido, a cadeia longa (8 carbonos) deste reagente possivelmente diminuiu sua capacidade de oxidação em relação aos ácidos comerciais (p. ex., MCPBA), fazendo que fosse possível distinguir entre as duplas ligações do D-limoneno que possuem velocidades de epoxidação distintas, como demonstrado na seção 1.6.1.

A síntese de peróxi-ácidos de cadeias longas pela via química tradicional exige o uso ácidos minerais e condições reacionais drásticas, fatores que limitam o uso deste reagente.⁶³

Porém estes peróxi-ácidos podem ser obtidos e utilizados *in situ* em condições brandas, como no experimento citado anteriormente (temperatura de 30⁰C, pH neutro), quando se aplica a catálise enzimática como via de obtenção dos mesmos.

5 – CONCLUSÃO

- O gel de ágar e o filme de caseinato de sódio não demonstraram ser bons suportes para imobilização de lipases para utilização em reações de epoxidação químio-enzimáticas do ciclohexeno. As conversões obtidas foram muito baixas (30%, para a Lipolase) ou não foram a ser detectadas por RMN-¹H.
- A lipase de *Candida antarctica* suportada em resina aniônica (Novozyme 453[®]) demonstrou ser um catalisador eficiente quando empregada na reação de epoxidação químio-enzimáticas do ciclohexeno, tanto com adições periódicas de peróxido de hidrogênio quanto no sistema bifásico onde o peróxido de hidrogênio foi adicionado de uma só vez.
- As lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Rhizopous orizae* apresentaram atividade catalítica considerável (aproximadamente 50% de conversão) para as reações de epoxidação químio-enzimáticas do ciclohexeno em sistema bifásico água/tolueno. As reações catalisadas pelas outras lipases apresentaram conversões ao produto muito baixas, ou não foram detectadas pelo método analítico empregado.
- A reação de epoxidação químio-enzimáticas do ciclohexeno, em sistema bifásico água/tolueno, apresentou conversões quantitativas em apenas 3 horas de reação, com o ácido octanóico como doador acila e com a lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 453[®]), sendo que a temperatura ideal para este sistema foi de 40-50⁰C.
- As melhores conversões do ciclohexeno em seu epóxido foram obtidas quando foram utilizados como solventes externos o tolueno e o octanoato de etila para a reação catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 453[®]), sendo que este último também era o doador acila do sistema reacional. Para a reação catalisada pela lipase de *Rhizopous orizae* (F-AP15) os melhores solventes foram; tolueno, tetracloreto de metila, xileno, octanoato de etila, hexano e heptano.

- Não foi possível detectar a formação dos epóxidos das reações que utilizaram o ácido hexadienóico, álcool alílico, cariofileno, 1-(R)-(+)-pineno, por RMN-¹H. A epoxidação do α -metilestireno apresentou conversão de 25% com a lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 453[®]).
- A reação de epoxidação químio-enzimática do D-limoneno foi regiosseletiva, havendo somente a epoxidação da dupla ligação endocíclica, quando catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 453[®]) em sistema bifásico água/tolueno

6 – PERSPECTIVAS

Para a continuidade deste projeto se faz necessário um estudo de outros parâmetros físico-químicos, tais como a cinética da reação de perhidrólise enzimática e a determinação da constante de Michaelis deste sistema. Estas informações são importantes para que através da melhor compreensão desta reação possam ser gerados perácidos carboxílicos com diferentes propriedades oxidativas e então aplicados em epoxidações régio- e/ou estéreo-seletivas. Resultados obtidos na epoxidação do D-limoneno, evidenciaram a regioseletividade que pode ser alcançada com perácidos obtidos através de reações biocatalisadas.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; HARPER; **Bioquímica, Atheneus**, SP, 6a ed., cap.7, 1990.
- 2 Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E.; **The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research***, 28, 235-242, 2000.
- 3 JONES, J. B.; **Tetrahedron**, 42, 3351, 1986.
- 4 FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**. Springer-Verlag New York INC., New York, 1997.
- 5 GERMAN FEDERAL MINISTRY OF EDUCATION AND RESEARCH. **Relimo Project**. Disponível em: <cartan.gmd.de/relimo/relimo_project.html>. Acesso em: 24 novembro 2002.
- 6 VOET, D.; VOET, J. G.; **Biochemistry** – 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1995.
- 7 UNIVERSITY OF LONDON – INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Enzyme Nomenclature** (desenvolvida por G. P. Moss). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 10 dezembro 2002.
- 8 WHITESIDES, G. M.; WONG, C. H.; **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, 24, 617, 1985.
- 9 BOLAND, W., FRÖBI, C., LORENZ, M.; **Synthesis**, 12, 1991.
- 10 CUI, Y., M.; WEI, D., Z.; YU, J. T.; **Biotech. Lett.**, 19, 865, 1996.
- 11 FROM, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B.; **Biotech. Lett.**, 19, 315, 1997.
- 12 LOUGHLIN, W.; **Bioresource Technology** 74, 49-62, 2000.
- 13 MENGER, F. M.; **Acc. Chem. Res.**, 26, 2215-2216, 1997.
- 14 SWEERS, H. M.; WONG, C. –H.; **J. Am. Chem. Soc.**, 108, 6421-6422, 1986.

-
- 15 FADNAVIS, N. W.; BABU, R. L.; SHEELU, G.; DESHPANDE A., **Tetrahedron: Assymetry** 11, 3303-3309, 2000.
- 16 MORISSO, F. D. P.; COSTA, V. E. U.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 12, 2641-2647, 2001.
- 17 KLIBANOV, A. M., **Nature**, 409, 241-246, 2001.
- 18 **Biotimes** – Revista Bioindustrial Trimestral da Novozymes 1998-2002.
- 19 CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J.D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQUI, A. N.; GUPTA, A. K.; **J. Am. Chem. Soc.**, 116, 3180-3186, 1994.
- 20 OVERBEEKE, P. L. A.; JONGEJAN, J. A., **J. Mol. Cat. B: Enz.**, 770, 1-3, 2002.
- 21 KLAAS, M. R.; STEFFENS, K.; PATETT, N., J. A., **J. Mol. Cat. B: Enz.**, 19-20, 499-505, 2002.
- 22 NAGAYAMA, K.; YAMASAKI, N.; IMAI, M.; **Bioch. Eng. J.**, 12, 231–236, 2002.
- 23 SOLYMÁR, M.; LILJEBLAD, A.; LÁZÁR, L.; FÜLÖP, F.; KANERVA, L. T.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 13, 1923–1928, 2002.
- 24 SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y.; **J. Mol. Cat. B: Enz**, 17, 133–142, 2002.
- 25 FOMUSO, L. B.; AGO, C. C.; **Food Research International**, 35, 15-21, 2002.
- 26 LEE, K.T.; AKOH, C.C.; DAWE, D.L.; **Journal of Food Bio-chemistry**, 23, 197-208, 1999.
- 27 KARRA-CHAABOUNI, M.; PULVIN, S.; TOURAUD, D.; THOMAS, D., **Biotech. Lett.**, 18, 9, 1083, 1996.
- 28 BURG-GARROS, S.; RAZAFINDRAMBOA, N.; PAIVA, A. A., **J. Am. Oil Chem. Soc.** 74, 11, 1471, 1997.

-
- 29 GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D. K., **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 74, 5, 589, 1997.
- 30 KWON, D. Y.; SONG, H. N.; YOON, S. H., **J. Am. Oil Chem. Soc.** 74, 10, 1287, 1997.
- 31 BASHEER, S.; SNAPE, J. B.; MOGI, K.; NAKAJIMA, M., **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 72, 2, 231, 1995.
- 32 LINKO, Y.Y.; LÄMSÄ, M.; HUHTALA, A.; LINKO, P., **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 71, 12, 1411, 1994.
- 33 DJEGHABA, Z.; DELEUZE, H.; DEJESO, B., **Tetrahedron Lett.**, 32 (6), 761, 1991.
- 34 MARGOLIN, A. L.; KLIBANOV, A. M., **J. Am. Chem. Soc.**, 109, 3802, 1987.
- 35 GOTOR, V.; BRIEVA, R.; REBOLLEDO, F.; **Tetrahedron Lett.**, 29(52), 6973, 1988.
- 36 GODTFREDSSEN, S. E.; KIRK, O.; BJÖRKLING, F.; **J. Chem. Soc. Chem. Commun.** 1301, 1990.
- 37 TUCCIO, B.; FERRÉ, E.; COMEAU, L.; **Tetrahedron Lett.**,32(24),2763, 1991.
- 38 REETZ, M.; JAEGER, K. E.; **Chem. and Phys. of Lipids**, 93, 3, 1997.
- 39 FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; **Chem. and Phys. of Lipids**, 93, 185, 1998.
- 40 CATONI, E.; CERNIA, E.; PALOCCI, C., **J. Mol. Catalysis**, 105, 79, 1996.
- 41 MERÇON, F.; ERBES, V. L.; SANT'ANNA JR., G. L.; NOBREGA, R.; **Braz. J. of Chem. Eng.**, 14(1), 1997.
- 42 PANCREACH, G.; BARATTI, J. C., **Appl. Microbiol. Biotechnol.**,47(6) 630, 1997.
- 43 YANG, B.; SHINODA, N.; GOTO, S.. **Colloids and Sup. B: Biointerfaces.** 10, 127, 1998.

-
- 44 KAMORI, M.; HORI, T.; YAMASHITA, Y.; HIROSE Y.; NAOSHIMA, Y., **J. Mol. Cat. B: Enz.**, 9, 269-274, 2000.
- 45 KNIGHT, K.; PIMENTEL, M. C. B.; MORAIS, M. M. C.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L.; MAIA, M. M. D., **Braz. J. of Microbiology**, 31, 220-222, 2000.
- 46 KALBE, J.; HOCKER, H.; BERNDT, H.; **Chromatografia**, 28,193, 1989.
- 47 KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITON, H.; **Biotechnol**, 14, 239, 1991.
- 48 MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A . R.; JOEKES, I.; BRENELLI, E. C. S.; LEITE, R. A .; **Biocatalysis**, 9, 321, 1994.
- 49 SORRILHA, A . E. P. M.: MARQUES.; JOEKES, I.;MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; **Tetrahedron**, 47, 2073, 1991.
- 50 NASCIMENTO, M. G.; LIMA, C.; SILVA, P. L. F.; REZENDE, M. C.; **J. Braz. Chem. Soc.**; 7 173, 1996.
- 51 QUEIROZ, N.; NASCIMENTO, M. G.; **Tetrahedron Lett.**, 43, 5225-5227, 2002.
- 52 ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; NASCIMENTO, M. G.; MORAN, P. J. S.; **Quím. Nova**, 25, 4, 567-571, 2002.
- 53 CLARK, A.H.R.-M., S. B., **Advances in Polymer Science**, 83, 107-125, 1987.
- 54 SRIVASTAVA, R.C.M., D. B.; VYAS, V. V., **Biotech. Bioeng.**, v. 29, p. 901-902, 1987., 1987.
- 55 MRANI, I.F., G.; BÉNET, J. C., **J. Phys. III**, 5, 985-998, 1985.
- 56 NETO, P.R.C., MAZZUCO, L. M., NASCIMENTO, M. G.; **Biotecnologia & Ciência e Desenvolvimento**, 19, 28-31, 2001.
- 57 F. BOBBIO; P. A. BOBBIO, **Química do Processamento de Alimentos**, Campinas, Fund. Cargill, 1984.

-
- 58 SGARBIERI, V. C.; **Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. Livraria Varela Ltda. São Paulo-SP, 146-147,1996.
- 59 BRADY, K., SIMOM, L. M., SZAJÁNI, B., **J. Am. Chem. Soc.**, 65, 917-921, 1988.
- 60 CRESPO, J.S., **Imobilização de lipases em materiais poliméricos**, Dissertação de Mestrado, Departamento de Química. Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. 1999.
- 61 CREMONESI, P.; CERREA, G.; SPORTOLETTI, G.; **Arch. Biochem. Biophys.**, 159,7-10, 1973.
- 62 BUCKLAND, B. C.; DUNNIL, P.; LILLY, M. D.; **Biotech. Bioeng.**, 18, 815-826, 1975.
- 63 DEN HOLLANDER, J. L.; ZOMERDIJK, M.; STRAATHOF, A. J. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; **Chem. Eng. Sci.** 57, 9, 1591-1598, 2002.
- 64 SLAYDEN, S. W.; LIEBMAN, J. F.; SAWAKI, Y; **The Chemistry of Hydroxyl, Ether and Peroxide Groups**. ED. Patai, S., Chichester: J. Wiley; 103-133, 587-656, 1993.
- 65 SCHIRMANN,J.P.; DELAVARENNE,S.Y., **Hydrogen Peroxide in Organic Chemistry**, (S.E.T.E. Lyon), 1979.
- 66 KLAAS, M. R.; WARWEL, S., **J. Mol. Cat. A: Chem.**, 117, 311-319, 1997.
- 67 GODTFREDSSEN, S. E.; FRYKMAN, H.; BJÖRKLING, F.; **Tetrahedron**, 48 (22), 4587, 1992.
- 68 LAURET, C.; ROBERTS, S. M.; **Aldrichimica Acta**, 35, 2, 2002.
- 69 BJÖRKLING, F.; GODTFREDSSEN, S. E.; KIRK, O.; **Trends in Biotechnology**, 9, 360-363, 1991.
- 70 CUPERUS, F. P.; BOUWER, S.Th.; KRAMER, G. F. K.; DERKSEN, J. T. P.; **Biocatalysis**, 9, 89-96, 1994.
- 71 KLAAS, M. R.; WARWEL, S., **J. Mol. Cat. B: Enz.**, 1, 29-35, 1995.

-
- 72 KLAAS, M. R.; WARWEL, S.; **Industrial Crops and Products**, 9, 125, 1999
- 73 HILKER, I.; BOTHE, D.; PRÜSS, J.; WARNECKE, H. J.; **Chem. Eng. Sci.**, 56, 427, 2001.
- 74 ENNIS, M. D.; OLD, D. W.; **Tetrahedron Lett.**, 33(42), 6283, 1992.
- 75 GU, Q. M.; CHEM, C. S.; SIH, C. J.; **Tetrahedron Lett.**, 27(16), 1986.
- 76 BEVINAKATTI, H. S.; BANERJI, A. A.; A.; **J. Org. Chem.**, 57, 6003, 1992.
- 77 OTTOLINA, G.; CARREA, G.; RIVA, S.; **J. Amer. Chem. Soc.**, 55, 2366, 1990.
- 78 MOREIRA, M. A.; BARRETO, P. L. M.; SOLDI, V.; NASCIMENTO, M. G., **VIII Encontro de Química da Região Sul**, QO-35, 2000.
- 79 BORTOLANZA, T.; CRESPO, J.; Trabalho de Conclusão de Curso-UFSC, 1998.
- 80 MOREIRA, M. A.; QUEIROZ, N.; VECCHIA, R. D.; SOLDI, V., NASCIMENTO, M. G., **X Seminário de Iniciação Científica da UFSC**, 2000.
- 81 VOGEL, A.; **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 4a. ed., 1978.
- 82 SEBRÃO, D.; MOREIRA, M. A.; SOLDI, V.; NASCIMENTO, M. G.; **26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, QO-162, 2003.
- 83 PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D.; **Chem. and Phys. of Lipids**, 93, 67-80, 1998.
- 84 LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C.; **Biotech. Bioeng.**, 30, 81-87, 1987.
- 85 **Novozymes Product Sheet** – Novozyme 435, 2001
- 86 VILLA DE P., A. L.; TABORDA A., F.; CORREA, C. M.; **J. Mol. Cat. A.: Chem.**, 185, 269-277, 2002.