

VIVIAN ROTUNO MOURE

**ESTUDO DA ENANTIOSELETIVIDADE DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia*  
LTEB11 NA RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS ALÍLICOS SECUNDÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador:  
Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Co-orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nadia Krieger

CURITIBA  
2009

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me concedido saúde e perseverança para superar as dificuldades e realizar todo o trabalho.

Aos meus orientadores, Prof. David A. Mitchell e Prof.<sup>a</sup> Nadia Krieger, pela orientação dedicada neste trabalho, pelas oportunidades, idéias e estímulo que me proporcionaram. Por tudo que aprendi, e ainda, pelo que vou aprender sou muito grata a vocês.

Ao Prof. Francisco Marques (Departamento de Química – UFPR) pela colaboração neste trabalho, pela livre entrada e permanência em seu laboratório e, sobretudo, pela livre utilização de seus reagentes e cromatógrafo gasoso. A sua contribuição foi muito além do que uma simples colaboração.

Aos meus pais, Adalberto e Vera, e irmão, Danilo, pelo amor, carinho, compreensão, apoio, paciência incondicionais. Ao Gláucio pela paciência, apoio e companherismo. Como não poderia deixar de ser, agradeço também ao meu cachorro, Teddy, pelo companherismo e distração.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise: Alessandra, Arnaldo, Arquimedes, Cryshelen, Dayane, Doumit, Érika, Kátia e Thaís, que além da colaboração, discussões de metodologias e resultados, fizeram do ambiente de trabalho um lugar mais divertido. Em especial, à Cristiane pela participação ativa no trabalho, pelas inúmeras horas de experimentos, fermentações e injeções, ao Marcelo Muller pela ajuda principalmente no início do trabalho. Aprendi muito com vocês!

Aos alunos Gustavo e Celso do Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais pelas horas de conversas, aprendizado, apoio e disposição.

Aos verdadeiros amigos que estiveram presentes nos bons e maus momentos em toda a minha vida e, como não poderia deixar de ser, também nestes últimos dois anos. Àqueles que conheci durante o período do mestrado... Ah! Se não fosse vocês...

Aos professores dos Departamentos de Bioquímica por terem me ensinado a estudar, especialmente durante as disciplinas do mestrado, período que conheci os colegas de turma, que foram essenciais para a realização tanto das disciplinas quanto do trabalho.

Ao Departamento de Química pela disponibilidade da utilização de sua estrutura física e equipamentos.

Ao Departamento de Bioquímica e coordenação do curso de pós-graduação.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

A todas as demais pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”

*Albert Einstein*

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o desempenho da lipase de *Burkholderia cepacia* LTBE11 na resolução cinética de álcoois alílicos secundários por reações de transesterificação com acetato de vinila, em termos de enantiosseletividade, expressa como razão enantiomérica ( $E$ ), e a velocidade de conversão. Inicialmente, foi realizada uma triagem de álcoois alílicos para avaliar a influência do grupo substituinte ( $R$ ) do substrato. A lipase mostrou melhor enantiosseletividade para os álcoois aromáticos do que para os alifáticos. Neste estudo, quando a equação proposta por Chen et al. foi utilizada para calcular  $E$  de amostras coletadas em um único tempo, o valor obtido dependeu do tempo de reação. O valor de  $E$  foi, a partir disso, determinado utilizando um modelo matemático que foi ajustado simultaneamente para várias amostras coletadas ao longo da reação. Com relação aos resultados obtidos para a adição direta de enzima, a enzima imobilizada em Accurel MP1000<sup>®</sup> apresentou um valor de  $E$  2 a 3,5 vezes maior do que a preparação livre, dependendo do substrato utilizado enquanto a velocidade de conversão foi menor. No estudo da influência da temperatura de reação, que foi realizado com a preparação imobilizada, um aumento de 29 para 45°C causou uma diminuição de 55% em  $E$  para os substratos *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol e (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol e um aumento de aproximadamente 3 vezes em  $E$  para 5-metilhex-1-en-3-ol. Para o substrato 1-fenilprop-2-en-1-ol, houve uma temperatura de inversão a 37°C, com aumento de  $E$  de 29 a 37°C e, depois, diminuição de 37 a 45°C. O aumento da quantidade de preparação enzimática imobilizada adicionada de 225 para 675 U aumentou a velocidade de reação de 0,3 para 0,75 %/h para a resolução de *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol a 29°C, sem afetar  $E$ . Na comparação de solventes, as reações em heptano, hexano e tolueno apresentaram os maiores valores de  $E$  para a resolução de *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol. Os valores de  $E$  obtidos foram correlacionados com as propriedades físico-químicas dos solventes de valor de log  $P$ , constante dielétrica e volume molecular. O alto valor de razão enantiomérica obtido ( $E$  igual a 75) sugere que a lipase de *B. cepacia* LTBE11 imobilizada em Accurel tem potencial para aplicação em resolução cinética de álcoois secundários.

Palavras-chave: Resolução cinética. Lipase. Enantiosseletividade. Álcoois alílicos secundários.

## ABSTRACT

The aim of this work was to study the performance of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTBE11 in the kinetic resolution of secondary allylic alcohols by transesterification reactions with vinyl acetate, in terms of the enantioselectivity, expressed as enantiomeric ratio ( $E$ ), and the conversion rate. Initially, several allylic alcohols were screened, in order to evaluate the influence of the substituent group (R) of the substrate. The lipase showed a greater enantioselectivity with aromatic alcohols than it did with aliphatic alcohols. In this study, when the equation proposed by Chen et al. was used to calculate  $E$  from samples collected at a single time, the value obtained depended on the reaction time. The value of  $E$  was therefore determined using a mathematical model that was fitted simultaneously to several samples collected during the reaction. In relation to the results obtained for the direct addition of enzyme powder, the enzyme immobilized on Accurel MP1000<sup>®</sup> presented a value of  $E$  that was 2 to 3.5 times higher than the free preparation, but the conversion rate was lower. In the study of the influence of reaction temperature, which was carried out with the immobilized preparation, an increase from 29 to 45°C caused a decrease of 55% in  $E$  for the substrates *p*-chlorophenylprop-en-2-1-ol and (*m*-methoxyphenyl)prop-2-en-1-ol and an approximately 3-fold increase in  $E$  for 5-methylhex-1-en-3-ol. For the substrate 1-phenylprop-2-en-1-ol, there was a temperature inversion at 37°C, with an increase in  $E$  from 29 to 37°C and then a decrease from 37 to 45°C. Increasing the amount of immobilized enzyme preparation added from 22 to 675 U increased the conversion rate from 0.3 to 0.75 %/h for the resolution of *p*-chlorophenylprop-en-2-1-ol in 29°C, without affecting  $E$ . In a comparison of solvents, the reactions in heptane, hexane and toluene showed the highest values of  $E$  for the resolution of *p*-chlorophenylprop-en-2-1-ol. The values of  $E$  obtained were correlated with the physicochemical properties of the solvents, namely the value of log P, the dielectric constant and the molecular volume. The high value obtained for the enantiomeric ratio ( $E$  equal to 75) suggests that the lipase of *B. cepacia* LTBE11 immobilized on Accurel has potential for application in the kinetic resolution of secondary alcohols.

Key words: Kinetic resolution. Lipase. Enantioselectivity. Secondary allylic alcohols.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Número de processos de biotransformação iniciados em escala industrial.....	17
FIGURA 2.2 – Reação de hidrólise catalisada por lipases.....	19
FIGURA 2.3 - Reações catalisadas por lipases.....	20
FIGURA 2.4 - Modelo estrutural de $\alpha/\beta$ hidrolases.....	21
FIGURA 2.5 - Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	23
FIGURA 2.6 - Mecanismo catalítico proposto para lipases.....	25
FIGURA 2.7 - Representação esquemática de estereoisômeros: diastereoisômeros e enantiômeros.....	26
FIGURA 2.8 - Aplicação da regra de Cahn, Ingold e Prelog (1966) para a nomenclatura de enantiômeros.....	27
FIGURA 2.9 - Regra de ataque de três pontos proposta por Ongston para o reconhecimento quiral por enzimas.....	28
FIGURA 2.10 - (a) Enantiômero de reação mais rápida e (b) enantiômero de reação mais lenta no modelo sítio ativo para lipases derivado da regra de Kazlauskas e col. (1991). ....	28
FIGURA 2.11 - Representação do diagrama reacional da reação catalisada por uma enzima com os dois enantiômeros.....	29
FIGURA 2.12 - Representação da variação da energia livre do sistema ( $\Delta G$ ) em função da reação catalisada pela enzima.....	30
FIGURA 2.13 - Métodos de obtenção de compostos enantiomericamente puros.....	32
FIGURA 2.14 - Resolução cinética de um álcool racêmico utilizando lipases.....	43
FIGURA 4.1 - Obtenção dos álcoois alílicos secundários pela reação de Grignard.....	51
FIGURA 4.2 - Transesterificação enzimática de álcoois alílicos secundários catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	53
FIGURA 4.3 - Mecanismo da reação da enzima substituída.....	54
FIGURA 4.4 - Reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila por lipases.....	61
FIGURA 5.1 - Atividade residual da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel MP1000 em solventes orgânicos polares e apolares.....	68
FIGURA 5.2 - Variação da razão enantiomérica ( <i>E</i> ) determinada pela equação de Chen et al. (1982) em relação ao tempo (h) para as reações de transesterificação com a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada.....	74

FIGURA 5.3 - Ajuste o modelo matemático desenvolvido aos dados experimentais . . . . .	75
FIGURA 5.4 - Influência da imobilização na razão enantiomérica (A) e velocidade de conversão (B) na resolução cinética de alcoóis alílicos secundários catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. . . . .	77
FIGURA 5.5 - Influência da temperatura na velocidade de conversão (%/h) da resolução cinética catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel MP1000 <sup>®</sup> . . . . .	79
FIGURA 5.6 - Influência da temperatura na enantiosseletividade da resolução cinética catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel MP1000. . . . .	82
FIGURA 5.7 - Correlação entre $\ln E$ (logaritmo neperiano de $E$ ) e $1/T$ ( $K^{-1}$ ) para a resolução dos substratos. . . . .	82
FIGURA 5.8 - Relação entre excesso enantiomérico do substrato (ees) e conversão (%) com diferentes quantidades da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel no meio reacional. . . . .	85
FIGURA 5.9 - Influência da quantidade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel no meio reacional enzima imobilizada no meio reacional na velocidade de conversão (%/h) do <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol. . . . .	86
FIGURA 5.10 - Razão enantiomérica da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel na transesterificação de ( <i>R,S</i> )- <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol em diferentes solventes orgânicos: tratados ou não com peneira molecular 4A por 48 h. . . . .	87
FIGURA 5.11 - Efeito das características físico-químicas do solvente orgânico na enantiosseletividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 na resolução de ( <i>R,S</i> )- <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol. . . . .	91

## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Processos industriais de resolução cinética catalisados por lipases. ....	35
TABELA 2.2 - Influência de fatores que afetam a enantioseletividade em processos catalisados por lipases em escala laboratorial. ....	37
TABELA 2.3 - Transesterificação enzimática dos álcoois alílicos secundários catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP100 <sup>®</sup> após 120 h de reação. ....	45
TABELA 4.1 - Álcoois alílicos secundários utilizados para a reação de transesterificação catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. ....	52
TABELA 4.2 - Tempos de retenção dos substratos utilizados e seus respectivos produtos em cromatografia gasosa com coluna quiral $\beta$ -ciclodextrina após resolução cinética catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 com acetato de vinila em hexano. ....	63
TABELA 4.3 - Tempos de retenção obtidos por cromatografia gasosa com coluna quiral $\beta$ -ciclodextrina do substrato ( <i>R,S</i> )- <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol e do produto de transesterificação com acetato de vinila catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 em diferentes solventes. ....	64
TABELA 5.1 - Atividade lipolítica do extrato bruto de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 frente a diferentes substratos. ....	66
TABELA 5.2 - Caracterização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel MP1000 <sup>®</sup> ....	67
TABELA 5.3 - Tempo de retenção ( <i>tr</i> ) em cromatografia gasosa com coluna quiral $\beta$ -ciclodextrina, rotação óptica específica e configuração do enantiômero em maior abundância relativa dos álcoois alílicos secundários após a resolução cinética catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em hexano. ....	70
TABELA 5.4 - Tempo de retenção ( <i>tr</i> ) em cromatografia gasosa com coluna quiral $\beta$ -ciclodextrina, rotação óptica específica e configuração do enantiômero dos produtos de transesterificação de álcoois alílicos secundários com acetato de vinila catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em hexano. ....	71
TABELA 5.5 - Transesterificação de álcoois alílicos secundários catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. ....	72

TABELA 5.6 - Parâmetros termodinâmicos para a resolução dos álcoois alílicos secundários <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol , ( <i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol e 5-metilhex-1-en-3-ol catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel. ....	83
TABELA 5.7 - Razão enantiomérica ( <i>E</i> ) e velocidade de conversão da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel na transesterificação de ( <i>R,S</i> )- <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol em diferentes solventes orgânicos.....	89

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$a_w$	Atividade de água
CAL-B	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
$E$	Razão enantiomérica
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LB	Meio de cultivo Luria Bertani
$\ln E$	Logaritmo neperiano de $E$
Log P	logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água
LTEB	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
m/v	Massa/volume
$p$ NP	$p$ -nitrofenol
$p$ NPP	Palmitato de $p$ -nitrofenila
$rac$	Racemato de álcool alílico secundário utilizado como substrato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
TC4:0	Tributirina
TC8:0	Tricaprilina
TC18:1	Trioleína
$T_{inv}$	Temperatura de inversão
tr	Tempo de retenção
$T_r$	Temperatura racêmica
Tris	Tris hidroximetil-aminometano
U	Unidade de atividade enzimática
$U \cdot mg^{-1}$	Unidade de atividade enzimática por mg de proteína (atividade específica) ou por mg suporte
$U \cdot mL^{-1}$	Unidade de atividade enzimática volumétrica
v/v	Volume/volume

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELA</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE SIGAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES</b> .....	<b>11</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>17</b>
2.1 APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM PROCESSOS INDUSTRIAIS DE BIOTRANSFORMAÇÃO .....	17
2.2 LIPASES .....	19
2.2.1 Definição e características de lipases .....	19
2.2.2 Estrutura de lipases e o fenômeno da ativação interfacial.....	21
2.2.2.1 Estrutura de lipases e presença da tampa hidrofóbica .....	21
2.2.2.1.1 Estrutura da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	22
2.2.2.2 Fenômeno de ativação interfacial.....	24
2.2.3 Mecanismo de catálise.....	24
2.2.4 Quiralidade e Reconhecimento quiral .....	25
2.2.4.1 Quiralidade e enantiômeros .....	25
2.2.4.2 Reconhecimento quiral por lipases.....	27
2.2.5 Enantiosseletividade enzimática.....	29
2.3 OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ENANTIOMERICAMENTE PUROS .....	32
2.3.1 Resolução cinética de racematos catalisada por lipases .....	34
2.3.1.1 Controle da enantiosseletividade de lipases .....	35
2.3.1.2 Resolução cinética de álcoois .....	43
2.3.1.2.1 Resolução cinética de álcoois alílicos secundários .....	44
<b>3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1 JUSTIFICATIVA.....	47
3.2 OBJETIVOS .....	48
3.2.1 Objetivo Geral .....	48
3.2.2 Objetivos Específicos .....	48
4.1 MICRORGANISMO.....	49
4.2 PRODUÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	49

4.2.1 Obtenção da enzima.....	49
4.3 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM ACCUREL.....	50
4.4 RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS ALÍLICOS SECUNDÁRIOS UTILIZANDO A LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 .....	50
4.4.1 Substratos .....	50
4.4.2 Procedimento para a reação de transesterificação dos substratos catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 .....	52
4.4.3 Determinação dos valores de conversão, velocidade de conversão, excessos enantioméricos e das razões enantioméricas .....	53
4.4.3.1 Modelo matemático para a determinação da razão enantiomérica (E).....	54
4.4.3.2 Determinação dos excessos enantioméricos dos substratos 1-octen-3-ol e 1-nonen-3-ol por acetilação química .....	57
4.4.4 Determinação das configurações absolutas .....	58
4.4.5 Estudo das reações de transesterificação catalisadas pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 para resolução dos álcoois alílicos secundários – influência de parâmetros na atividade e enantiosseletividade .....	58
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	60
4.5.1 Determinação de Atividade Lipolítica.....	60
4.5.1.1 Método da Hidrólise do <i>p</i> NPP em Meio Aquoso .....	60
4.5.1.2 Método Titulométrico (pH-Stat).....	61
4.5.1.3 Método de Lowry-Tinsley .....	62
4.5.2 Determinação de proteínas .....	62
4.5.3 Análises Cromatográficas.....	62
4.5.3.1 Cromatografia gasosa em coluna quirál .....	62
4.5.3.1.1 Tempos de retenção dos compostos .....	63
4.5.3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) preparativa.....	64
4.5.3.3 Polarimetria .....	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 .....	66
5.1.1 Produção e caracterização da enzima livre.....	66
5.1.2 Caracterização da enzima imobilizada em Accurel.....	67
5.1.3 Estabilidade da lipase imobilizada em solventes orgânicos .....	67
5.2 RESOLUÇÃO DOS ÁLCOOIS ALÍLICOS SECUNDÁRIOS CATALISADA PELA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	70
5.2.1 Determinação das configurações absolutas .....	70
5.2.2 Triagem de substratos para resolução cinética por reação de transesterificação catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	72
5.3 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS QUE AFETAM A ENANTIOSSELETIVIDADE DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	76

5.3.1 Efeito da imobilização .....	76
5.3.2 Efeito da temperatura.....	79
5.3.3 Efeito da quantidade de enzima.....	85
5.3.4 Efeito do solvente no meio reacional .....	87
5.3.4.1 Efeito do tratamento prévio do solvente com peneira molecular .....	87
5.3.4.2 Comparação entre solventes orgânicos para a resolução cinética.....	88
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>97</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>110</b>
APÊNDICE 1. MÉTODO MATEMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE $E$ .....	110
APÊNDICE 2. DEDUÇÃO DAS FRAÇÕES MOLARES A PARTIR DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS .....	121
<b>ANEXO.....</b>	<b>124</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho trata da aplicação da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 na resolução cinética de racematos de álcoois alílicos secundários produzidos por síntese química.

De acordo com a recomendação IUPAC, resolução cinética é definida como a realização de resolução completa ou parcial de um racemato em virtude da diferença nas velocidades de reação dos enantiômeros (*R* e *S*) proporcionadas por agente quiral (reagente, catalisador químico ou enzimático, solvente). Os enantiômeros interagem com o agente quiral para gerar dois estados de transição diastereoisoméricos. A variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) em cada estado de transição define a velocidade de conversão dos enantiômeros: um que reage rápido e o outro que reage lentamente (GHANEM, 2007).

O interesse pela produção de um único enantiômero a partir de intermediários quirais tem aumentado significativamente, impulsionado pela importância da quiralidade na eficácia de inúmeros produtos agroquímicos e farmacêuticos (SKORIDOU et al., 2004). A estimativa para o crescimento anual do mercado mundial para produtos químicos opticamente puros comercializados era de 13,2 % em 2001, com gastos de 16 bilhões de dólares até 2007 (STINSON, 2001). A indústria farmacêutica é a maior responsável por este crescimento, na qual as drogas quirais enantiopuras, ou seja, quando existe a presença de apenas um dos enantiômeros (*R*) ou (*S*), representando 36% do mercado global (ABATE et al., 2004).

O interesse na obtenção de álcoois alílicos secundários enantiomericamente puros justifica-se pela sua grande versatilidade em síntese química, especialmente na síntese de drogas, fragrâncias e feromônios quirais (SINGH; BANERJEE, 2007; PATEL, 2002; FUKUSAKI; SATODA, 1997). Os álcoois, na sua forma enantiopura, são usualmente obtidos por epoxidação de Sharpless (epoxidação assimétrica com titânio) ou via transformações mediadas por enzimas (GHANEM; SCHURIG, 2003). Entre os catalisadores enzimáticos empregados na resolução cinética de racematos, as lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são as mais utilizadas (GHANEM, 2007), principalmente devido a sua seletividade, estabilidade, possibilidade de reutilização e alta produção por vários microrganismos, como fungos e bactérias. Elas apresentam especificidade a diferentes substratos e catalisam várias reações em meios aquosos e aquo-restritos, tais como hidrólise e transesterificação, respectivamente (WANG et al., 2007; CHOJNACKA; OBARA; WAWRZENCZY, 2007; GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004; JAEGER; EGGERT, 2002; LIEBETON et al., 2000).

Estudos preliminares com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP100<sup>®</sup>, um suporte hidrofóbico, motivaram este trabalho, pois mostraram um alto excesso enantiomérico (*ee*) na resolução de alguns álcoois alílicos secundários (BARON et al., 2007). Entretanto, as condições de reação não foram otimizadas, e tampouco estudou-se o comportamento da lipase frente a diferentes álcoois e em diferentes condições.

Dentro deste contexto, este trabalho pretendeu contribuir para o conhecimento da resolução cinética de racematos de diferentes alcoóis alílicos secundários alifáticos e aromáticos catalisada pela lipase de *B. cepacia* LTEB11, estudando-se aspectos que influenciam sua enantiosseletividade, como os relacionados com o substrato (tipo de grupo substituinte, o tipo de cadeia), com a enzima (imobilização) e com o meio e condições reacionais (tipo de solvente e temperatura).

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM PROCESSOS INDUSTRIAIS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Enzimas são capazes de aceitar inúmeras moléculas como substrato e, sobretudo, podem ser seletivas, catalisando reações com altas seletividades quiral (enantio) e posicional (regio). Como resultado, elas podem ser utilizadas tanto em transformações simples quanto em complexas, sem a necessidade de etapas de bloqueio e desbloqueio de grupos substituintes, que são comuns em reações enantio e regioseletivas em síntese orgânica. Esta elevada seletividade também proporciona reações eficientes com baixa formação de subprodutos, tornando as enzimas uma alternativa econômica e ambientalmente viável aos catalisadores químicos convencionais (SCHMID et al., 2001).

Os processos industriais de biotransformação tiveram início no final da década de 50 e têm crescido rapidamente desde a última década (STRAATHOF et al., 2002) (FIGURA 2.1). O termo biotransformação pode ser aplicado para modificações específicas ou interconversões na estrutura química, realizadas por enzimas presentes nas células ou na forma isolada (para a utilização de enzimas isoladas o processo também pode ser chamado de biocatálise). Em biotransformação, um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas, diferentemente do que ocorre em processos de fermentação, onde o substrato é convertido em produtos através de um caminho metabólico bastante complexo na célula (DALLA-VECHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

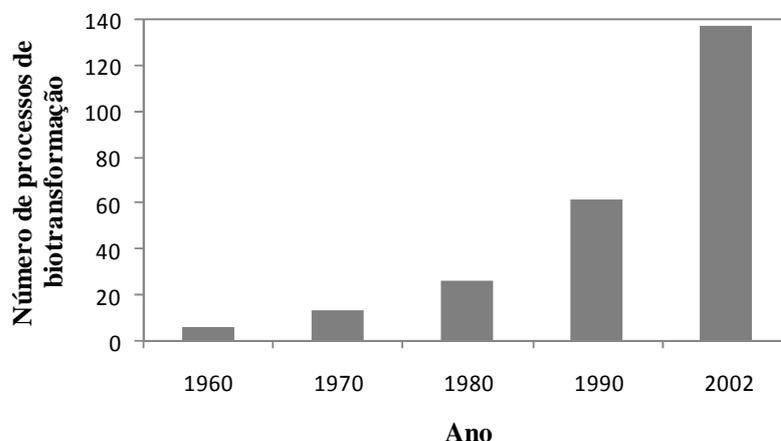


FIGURA 2.1 - Número de processos de biotransformação iniciados em escala industrial (STRAATHOF et al., 2002).

Este crescimento vem sendo impulsionado pelo aumento da exigência à comercialização de compostos cujas estruturas apresentem quiralidade, especialmente nos setores farmacêutico e agroquímico, estabelecida pelas legislações brasileira e de outros países. As exigências são em relação à separação dos enantiômeros em um racemato, ao estudo dos efeitos biológicos dos enantiômeros e a comprovação dos efeitos tóxicos e adversos dos enantiômeros e do racemato, dependendo do composto quiral. A FDA (*U.S. Food and Drug Administration*, Rockville, EUA) determina para um dado produto se ele pode ser comercializado como racemato ou como enantiopuro, baseado em protocolos estabelecidos para a classe ou utilização deste composto quiral (FDA, 2009). No Brasil, a comercialização de medicamentos quirais é regulamentada pela ANVISA através das RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) que dispõem sobre medicamentos (ANVISA, 2009).

A indústria química representa um dos maiores setores mundiais e nela as companhias européias possuem um papel dominante. Indústrias como BASF, DSM e Lonza realizam inúmeros bioprocessos que produzem centenas ou milhares de toneladas por ano, o que demonstra a viabilidade econômica destes processos biocatalíticos e o aumento na aceitação de biocatalisadores no setor industrial de síntese orgânica. Em 2002, o uso de bioprocessos para a obtenção de produtos químicos (básicos, intermediários e de química fina) e polímeros representou apenas 2% do mercado de produtos químicos, o que corresponde a uma movimentação de 25 bilhões de dólares (SCHMID et al., 2002), com uma estimativa de 13,2% de crescimento anual na sua comercialização (STINSON, 2001). Dentro deste segmento, a maior contribuição é dos produtos de química fina, definidos como os que são produzidos em, no máximo, 20.000 toneladas por ano e que possuem alto valor agregado (SCHMID et al., 2002).

Dentre os biocatalisadores, hidrolases são as mais empregadas nos processos de biotransformação industrial, com 80% de todas as enzimas utilizadas (KRISHNA, 2002). Dentre estas, as lipases são as mais utilizadas, o que pode ser devido a: (1) serem estáveis em solventes orgânicos, (2) não requererem cofatores, (3) possuírem especificidade a diferentes substratos e (4) apresentarem alta enantiosseletividade (CHOJNACKA; OBARA; WAWRZENCZY, 2007; JAEGER; REETZ, 1998).

## 2.2 LIPASES

### 2.2.1 Definição e características de lipases

Lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são carboxilesterases definidas classicamente como enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, cujos ácidos graxos sejam de cadeia longa, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; JAEGER et al., 1994), (FIGURA 2.2).

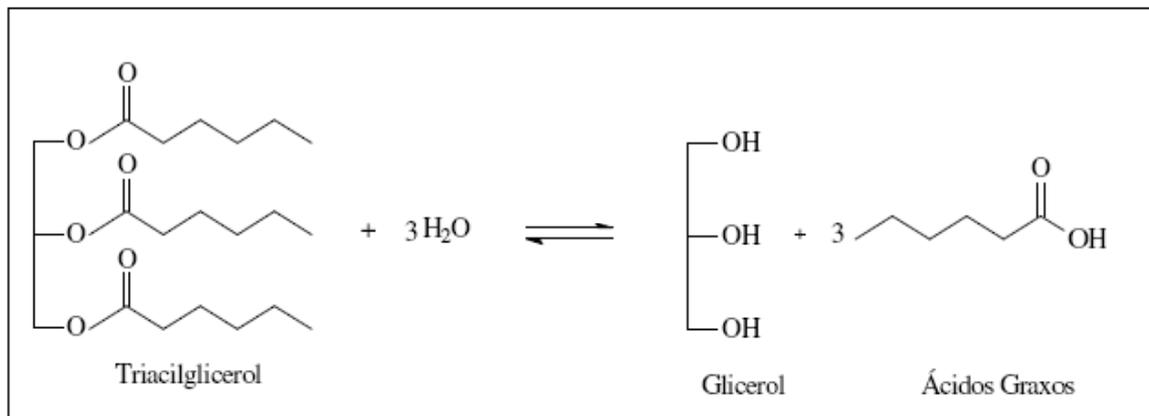


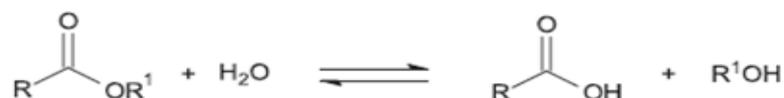
FIGURA 2.2 – Reação de hidrólise catalisada por lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos ou, na direção reversa, em ambientes com baixo teor de água, pode ser formado o éster (reação de síntese).

Não há uma classificação exata que defina o número de carbonos de uma cadeia longa; no entanto, alguns autores costumam definir como triacilgliceróis cujos ácidos graxos sejam de cadeia longa aqueles constituídos por ácidos graxos com mais de 10 carbonos, dentre os quais, a trioleína (trioleilglicerol, TC18) é o substrato considerado padrão para lipases ditas verdadeiras. A hidrólise ou síntese de triacilgliceróis, constituídos por ácidos graxos com menos do que 10 carbonos é catalisada tanto por lipases quanto por esterases. Desta forma, para esterases, o substrato considerado padrão é a tributirina (tributirilglicerol, TC4), que, por sua vez, também pode ser hidrolisada por lipases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. Os processos básicos que fundamentam o mecanismo catalítico (hidrólise e síntese de ésteres) podem ser associados pela enzima para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e

transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados e do solvente utilizado (FIGURA 2.3). Além de água e álcool, outros compostos podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem catalisar reações como aminólise, tiotransesterificação, lactonização e peroxidação, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (KRIEGER et al., 2004, CASTRO et al., 2004).

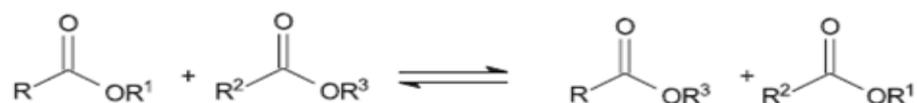
#### Hidrólise



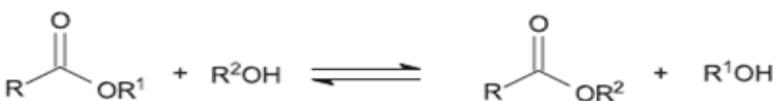
#### Esterificação



#### Interesterificação



#### Alcoólise



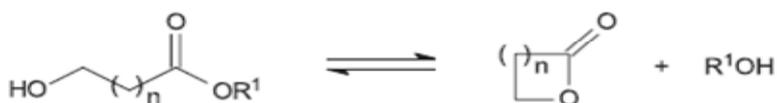
#### Acidólise



#### Aminólise



#### Lactonização



#### Peroxidação/formação de perácido



FIGURA 2.3 - Reações catalisadas por lipases (Fonte: GHANEM, 2007).

A diversidade de propriedades catalíticas das lipases, principalmente de enantio e regioseletividade, e a possibilidade de atuar em vários substratos com alta especificidade, em meios aquosos ou aquo-restritos, catalisando diferentes reações enzimáticas, propiciam a utilização destas enzimas em diferentes campos de aplicação: na produção de fármacos, cosméticos, couro, detergentes, alimentos, fragrâncias e outros materiais orgânicos sintéticos (VILLENEUVE, 2007; KRIEGER et al., 2004; GANDHI, 1997).

## 2.2.2 Estrutura de lipases e o fenômeno da ativação interfacial

### 2.2.2.1 Estrutura de lipases e presença da tampa hidrofóbica

As lipases caracterizadas até o momento apresentam massa molar entre 19 e 60 kDa, com uma estrutura terciária comum, o dobramento de  $\alpha/\beta$  hidrolase (FIGURA 2.4). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central formado por uma folha  $\beta$  central, consistindo de oito diferentes fitas  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ), conectadas com seis  $\alpha$  hélices (A-F) (POUDEROYEN et al., 2001). As fitas  $\beta$  têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente  $90^\circ$  entre si.

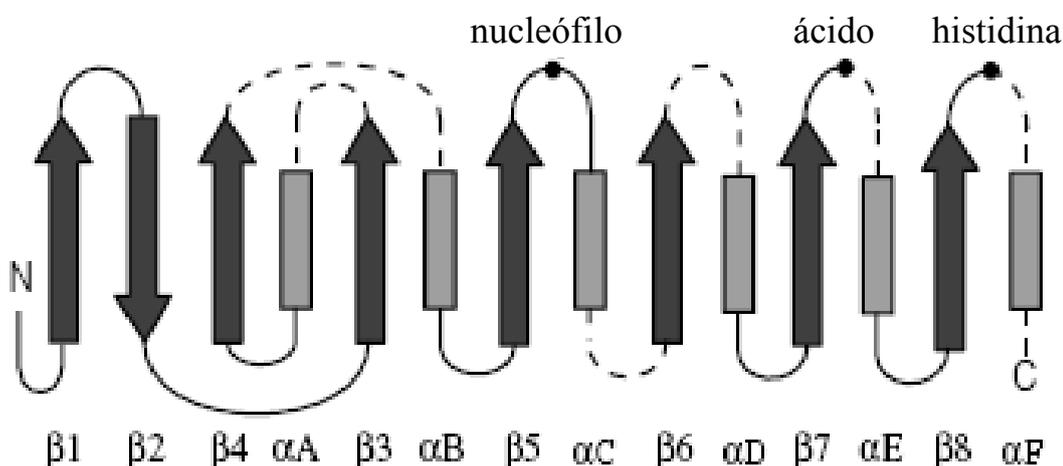


FIGURA 2.4 - Modelo estrutural de  $\alpha/\beta$  hidrolases (POUDEROYEN et al., 2001).

O sítio ativo de lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácido serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. A serina catalítica, localizada no C-terminal da fita  $\beta 5$ , faz parte de um pentapeptídeo altamente conservado GX SXG, onde

G= glicina; S= serina; X<sub>1</sub>= histidina e X<sub>2</sub>= ácido glutâmico ou aspártico (JAEGGER; REETZ, 1998).

Do ponto de vista estrutural, para a ligação com o substrato, além da região que compõe o sítio ativo, existe uma estrutura anfipática móvel que cobre o sítio ativo catalítico da maioria das lipases, chamada região de tampa hidrofóbica ou *lid*, que está envolvida na seletividade de lipases (SECUNDO et al., 2006). Em lipases, esta estrutura está presente na posição  $\beta 8$ , prolongando-se sobre o conjunto central de fitas  $\beta$  e sobre o sítio catalítico e, por isso é chamada de tampa hidrofóbica. Sua provável função é na interação com a interface lipídeo/água, no fenômeno de ativação interfacial (item 2.2.2.2), onde esta estrutura sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo e favorecendo a ligação com o substrato (GHANEM, 2007).

#### 2.2.2.1.1 Estrutura da lipase de *Burkholderia cepacia*

A cadeia polipeptídica da lipase de *Pseudomonas* (hoje *Burkholderia*) *cepacia* apresenta uma massa molar de aproximadamente 33 kDa e consiste de 320 resíduos de aminoácidos; sua seqüência é similar a da lipase de *B. (Pseudomonas) glumae* (NOBLE et al., 1993). Ambas as estruturas possuem três domínios, que podem ser divididos em um domínio maior e dois menores (FIGURA 2.5).

A topologia da lipase de *B. cepacia* (FIGURA 2.5) é muito similar ao protótipo  $\alpha/\beta$  hidrolase (FIGURA 2.4). Entretanto, as duas primeiras fitas  $\beta$  no modelo  $\alpha/\beta$  hidrolase não estão presentes na lipase de *B. cepacia*. Assim, a primeira fita  $\beta$  é equivalente a  $\beta 3$  no modelo. O resíduo Ser87 catalítico situa-se no final da região C-terminal da fita  $\beta 5$  na fita-volta-hélice. O resíduo ácido, também catalítico, Asp264, faz parte de uma volta que segue a fita  $\beta 7$  e o resíduo His286 está localizado na alça que segue a fita  $\beta 8$ . Existem onze  $\alpha$ -hélices, correspondentes às hélices A-F das  $\alpha/\beta$  hidrolases ( $\alpha 1=A$ ,  $\alpha 2=B$ ,  $\alpha 3=C$ ,  $\alpha 7=D$ ,  $\alpha 10=E$  e  $\alpha 11=F$ ), das quais quatro envolvem a folha  $\beta$  central. Além dos resíduos do sítio ativo, outra região importante é o sítio de ligação de  $Ca^{2+}$ , que está coordenado por seis átomos de oxigênio, sendo quatro átomos da proteína e dois de moléculas de água. Acredita-se que este seja um importante sítio para forçar a permanência de algumas ligações peptídicas na conformação *cis*, o que beneficiaria a proteína na manutenção de algumas ligações de hidrogênio intramoleculares (SCHRAG et al., 1997).

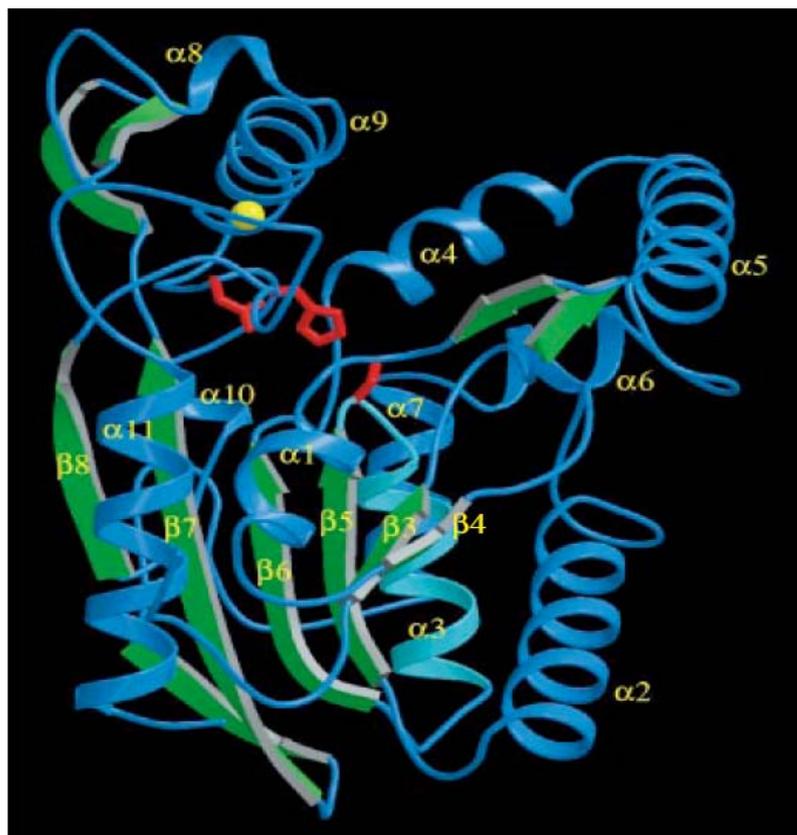


FIGURA 2.5 - Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de *Burkholderia cepacia*. As fitas  $\beta$  estão representadas como setas (verde) e as hélices em azul. A posição do íon  $\text{Ca}^{2+}$  está indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho (SCHRAG et al., 1997).

As estruturas tridimensionais determinadas por Schrag et al. (1997) da conformação aberta da lipase de *B. cepacia* são favorecidas pela presença de solventes ou de interface óleo-água. Ao contrário, em condições aquosas a estrutura fechada é preferida. Estas estruturas indicam que a ativação interfacial resulta de uma mudança conformacional na enzima, pela reorganização da estrutura terciária e de um amplo movimento da tampa hidrofóbica para expor o sítio ativo. A tampa hidrofóbica, por sua vez, tem seu maior contato com o resto da proteína na conformação fechada por interações, quase sempre van der Waals, da hélice  $\alpha 4$  com a hélice  $\alpha 9$  e as duas fitas  $\beta$  antiparalelas (FIGURA 2.5), englobando os resíduos 214-228 da molécula (SCHRAG et al., 1997; KIM et al., 1997).

### 2.2.2.2 Fenômeno de ativação interfacial

Como anteriormente explicado, lipases hidrolisam a ligação entre as cadeias longas de ácidos graxos e o glicerol dos triacilgliceróis, que são insolúveis em meio aquoso. Sua atividade é fortemente aumentada na presença desta interface lipídeo/água, um fenômeno conhecido como ativação interfacial (REETZ, 2002; OVERBEEKE et al., 2000). Apesar da presença da tampa hidrofóbica ser comumente relatada neste fenômeno, mais recentemente, descobriu-se que a presença desta estrutura não está necessariamente correlacionada com o fenômeno de ativação interfacial. Assim, todas as lipases que apresentam o fenômeno de ativação interfacial também possuem a tampa hidrofóbica, mas o contrário não é sempre verdadeiro. Por exemplo, as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *B. glumae* e *Candida antarctica* B possuem uma tampa hidrofóbica cobrindo seus sítios ativos, mas não apresentam a ativação interfacial. Portanto, pode-se concluir que a presença da tampa hidrofóbica e o fenômeno de ativação interfacial são critérios inadequados e inespecíficos para classificar uma enzima como lipase e diferenciá-la das esterases (JAEGER; REETZ, 1998), o que justifica a definição clássica para lipases verdadeiras (item 2.2.1), ou seja, enzimas que hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa.

### 2.2.3 Mecanismo de catálise

As lipases seguem um ciclo catalítico hidrolítico semelhante àquele já estabelecido para a quimiotripsina (FIGURA 2.6). A hidrólise do substrato ocorre em duas etapas: inicialmente, o resíduo de histidina da tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila do resíduo de serina do sítio catalítico. Ocorre, então, um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O anel imidazólico do resíduo de histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas pontes de hidrogênio formadas com as ligações amida entre os resíduos de aminoácidos específicos. Um álcool é liberado, deixando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; JAEGER et al., 1994).

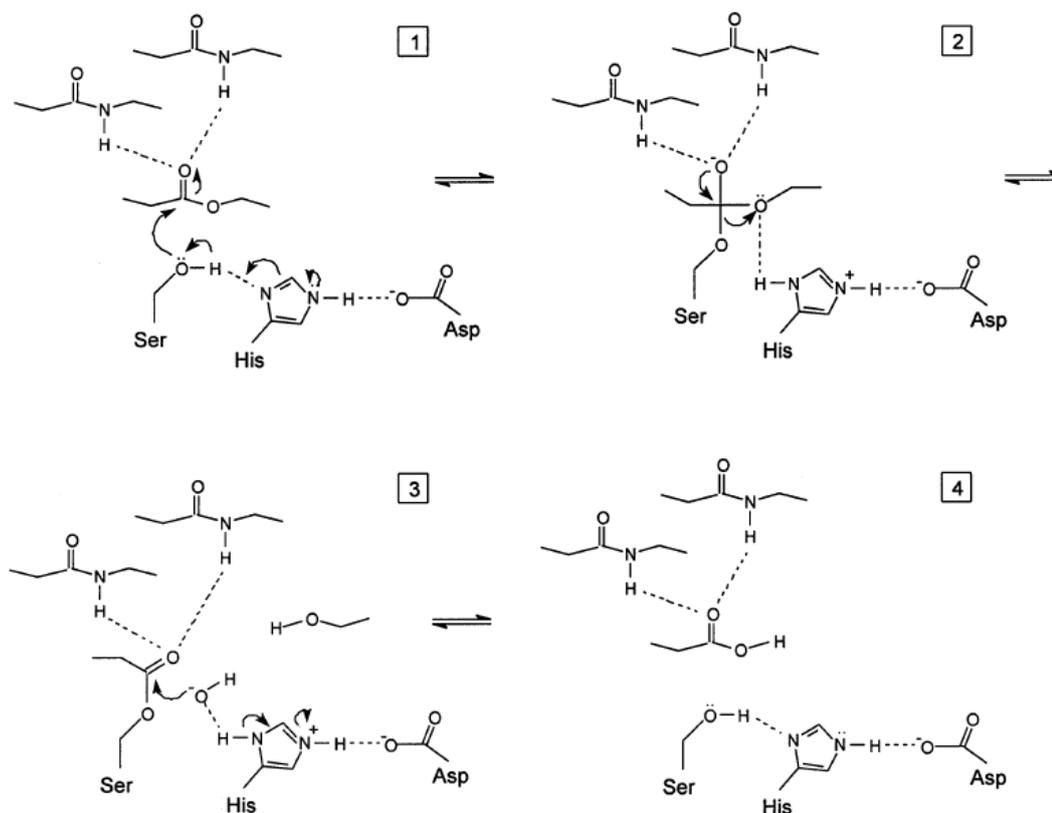


FIGURA 2.6 - Mecanismo catalítico proposto para lipases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

A cinética da reação depende fortemente do modo de organização dos substratos lipídicos, que, dependendo das condições, podem estar presentes em estruturas interfaciais como bicamadas, monocamadas, micelas, vesículas ou emulsões óleo-água (ALOULOU et al., 2006). Lipases mostram um aumento na atividade enzimática quando o limite de solubilidade do substrato é ultrapassado (substrato emulsificado), o que explica a relação da interface para a atividade da enzima (JAEGER et al., 1994).

## 2.2.4 Quiralidade e Reconhecimento quiral

### 2.2.4.1 Quiralidade e enantiômeros

A quiralidade é uma propriedade geométrica e diz-se que uma molécula que não pode ser sobreposta à sua imagem especular é quiral, enquanto que uma molécula aquiral é aquela em que sua imagem especular pode ser sobreposta à original sem a quebra e formação de

ligações. Assim, compostos que não possuem elemento de simetria no arranjo espacial de seus grupos ligantes, ou seja, que apresentam centro assimétrico, irão apresentar-se na forma de estereoisômeros. Este elemento de simetria frequentemente é o carbono tetraédrico no qual estão ligados quatro diferentes grupamentos, ou seja, carbono assimétrico. Os estereoisômeros são divididos em diastereoisômeros, cujas moléculas possuem diferentes arranjos espaciais de seus ligantes, porém não são imagens especulares sobreponíveis umas das outras, e enantiômeros, nos quais a molécula apresenta a geometria e a disposição espacial de seus átomos igual à imagem especular do seu par complementar, sendo que somente compostos quirais apresentam esta característica (FIGURA 2.7) (CAREY; SUNDBERG, 2007; MARCH, 1992).

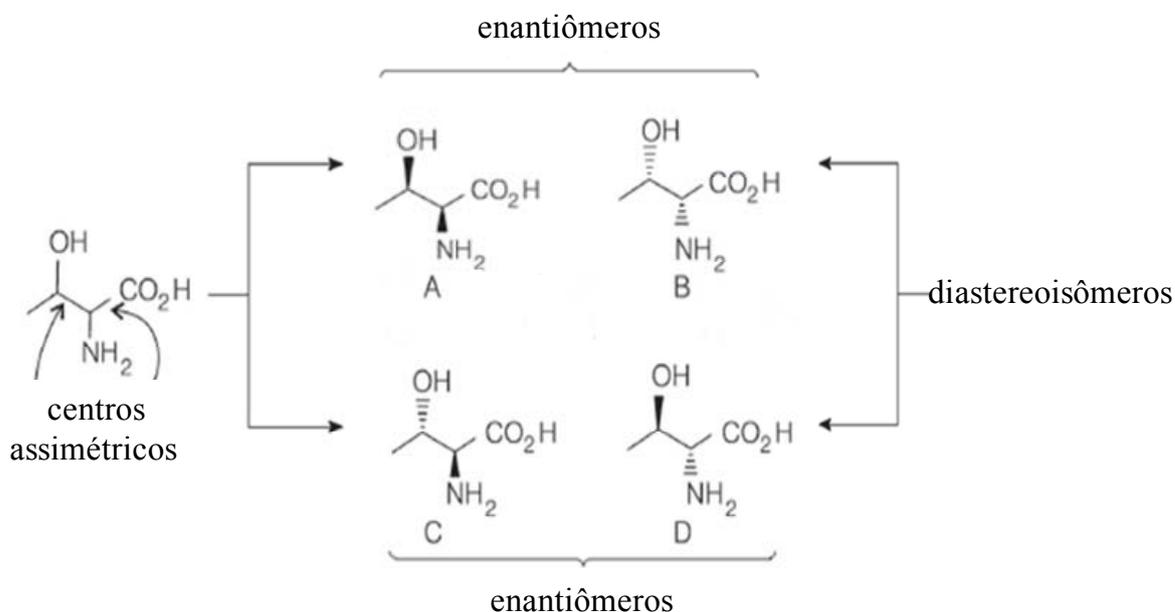


FIGURA 2.7 - Representação esquemática de estereoisômeros: diastereoisômeros e enantiômeros. Onde: A e B, C e D são enantiômeros; A e C; B e D, A e D; C e B são diastereoisômeros.

De acordo como o arranjo espacial, os enantiômeros recebem os prefixos *R* ou *S* seguindo o sistema de nomenclatura desenvolvido pelos químicos Cahn, Ingold e Prelog (1966), baseado nas prioridades dos grupos substituintes ligados ao centro assimétrico, e adotado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Por esta regra, os grupos substituintes no estereocentro são assinalados pela diminuição da prioridade, de forma que:  $1 > 2 > 3 > 4$  (FIGURA 2.8).

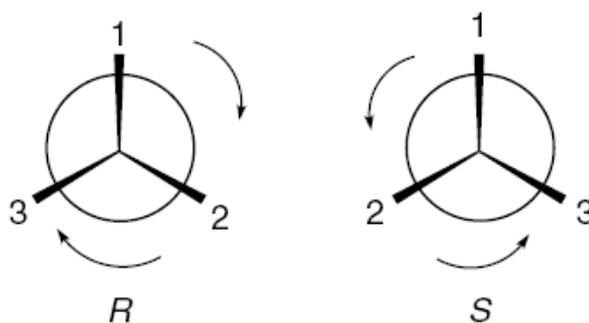


FIGURA 2.8 - Aplicação da regra de Cahn, Ingold e Prelog (1966) para a nomenclatura de enantiômeros, baseado nas prioridades dos grupos substituintes ligados ao centro assimétrico. Onde 1, 2 e 3 representam os grupos substituintes e *R* e *S* são as configurações dos enantiômeros (Fonte: CAREY e SUNDBERG, 2007).

Por serem moléculas quirais, enantiômeros possuem propriedades químicas semelhantes em ambiente aquiral, o que dificulta sua separação química por métodos convencionais. Em contrapartida, suas propriedades biológicas podem ser diferentes, já que eles reagem com diferentes velocidades com outras moléculas quirais, como enzimas (FABER, 2000; MARCH, 1992), o que justifica a importância de compostos enantiomericamente puros na produção de fármacos e na agroindústria.

#### 2.2.4.2 Reconhecimento quiral por lipases

Para entender o reconhecimento quiral por enzimas, existem modelos que descrevem o mecanismo de enantiosseletividade da reação enzimática, capacidade da enzima de reagir com diferentes velocidades com os dois enantiômeros, com formação preferencial de um enantiômero do produto em relação ao outro (FABER, 2000).

Os enantiômeros exibem o mesmo comportamento em ambientes aquirais, mas comportamentos diferentes em ambientes quirais. Para explicar o reconhecimento quiral por enzimas, Ongston (citado por FABER, 2000) desenvolveu um modelo de ataque de três pontos do substrato ao sítio ativo da enzima para alta enantiosseletividade. A FIGURA 2.9 apresenta o enantiômero que permite a melhor interação dos grupos substituintes por complementariedade com o sítio ativo da enzima e, portanto, será o enantiômero preferido.

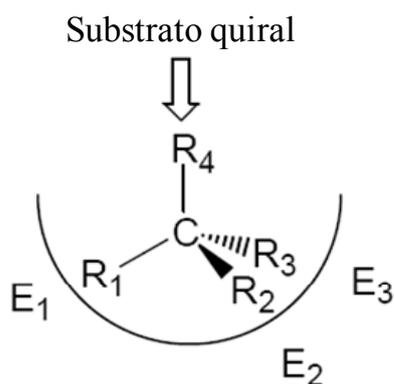


FIGURA 2.9 - Regra de ataque de três pontos proposta por Ongston para o reconhecimento quiral por enzimas. A complementariedade entre os substituintes R e os resíduos da enzima (E) permite a catálise preferencial de um enantiômero do substrato quiral (Fonte: FABER, 2000).

Mais especificamente para lipases, Kazlauskas e col. (1991) predisseram a enantiosseletividade de lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Candida rugosa* frente a álcoois secundários com base no tamanho e na forma das moléculas quando estas estão no sítio ativo da enzima. Isto está ilustrado pelo modelo de sítio ativo de lipases, que consiste de duas regiões de diferentes tamanhos, uma grande e outra pequena (FIGURA 2.10).

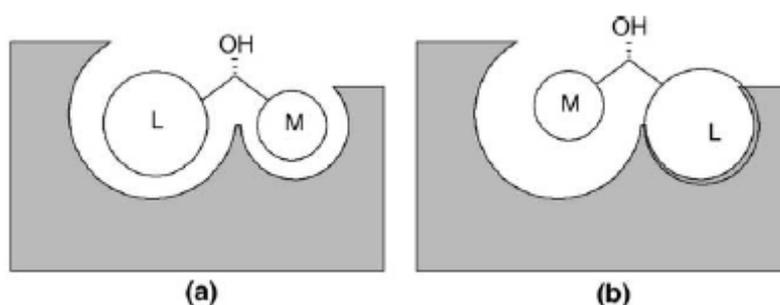


FIGURA 2.10 - (a) Enantiômero de reação mais rápida e (b) enantiômero de reação mais lenta no modelo sítio ativo para lipases derivado da regra de Kazlauskas e col. (1991) (Fonte: GHANEM, 2007).

A enantiosseletividade de lipases por substratos que contêm um substituinte pequeno e outro grande, como o álcool secundário apresentado na FIGURA 2.10, é explicada pela suposição de que, quando o álcool secundário é submetido à resolução por uma lipase, liga-se ao sítio ativo da enzima com uma maior eficiência do que o outro (FIGURA 2.10a). Quando o outro enantiômero reage com a enzima, o substrato é forçado a acomodar seu maior substituinte no menor espaço do sítio ativo (FIGURA 2.10b). Desta forma, o impedimento

estérico entre o substituinte grande e o bolso do sítio ativo menor supostamente perturbam a tríade catalítica, diminuindo a velocidade de reação para este enantiômero (GHANEM, 2007).

Além das diferenças de tamanho dos substituintes para a acomodação no sítio ativo da enzima, a enantiosseletividade de enzimas também é devida à relação hidrofiliicidade/hidrofobicidade, tanto no sítio ativo quanto no substrato (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

### 2.2.5 Enantiosseletividade enzimática

O fenômeno de enantiosseletividade enzimática ( $E$ ) pode ser explicado, cineticamente, pela razão entre as velocidades de reação de cada enantiômero com a enzima (Equação 2.1),

$$E = \frac{v_R}{v_S} \quad (2.1)$$

onde  $v_R$  é a velocidade de reação com o enantiômero  $R$  e  $v_S$  é a velocidade de reação com o enantiômero  $S$ .

A reação de cada enantiômero com a enzima forma ambos complexos enzima-substrato, um com cada enantiômero, e pode ser tratada como se fosse uma reação uni-uni (ou seja, que envolve somente um substrato e um produto) (FIGURA 2.11).

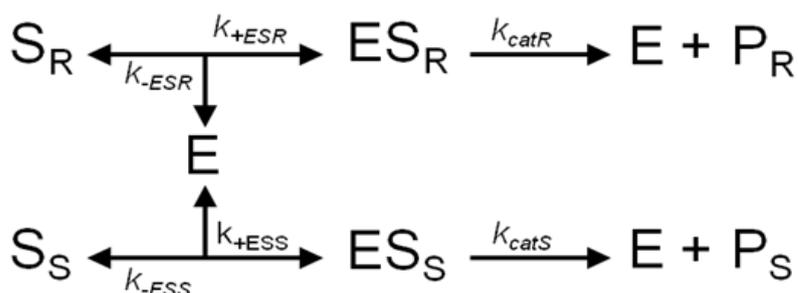


FIGURA 2.11 - Representação do diagrama reacional da reação catalisada por uma enzima com os dois enantiômeros. Onde:  $k$  representa a constante de velocidade, sendo  $k_{+ESR}$  = formação do complexo enzima – R-substrato;  $k_{-ESR}$  = dissociação do complexo enzima – R-substrato;  $k_{+ESS}$  = formação do complexo enzima – S-substrato;  $k_{-ESS}$  = dissociação do complexo enzima – R-substrato;  $k_{catR}$  = constante catalítica da reação para formação do R-produto e  $k_{catS}$  = constante catalítica da reação para formação do S-produto.

Devido ao ambiente quiral do sítio ativo da enzima, na presença do substrato é formado um complexo diastereoisomérico com cada enantiômero de diferentes valores de

energia livre ( $\Delta G$ ), nos respectivos estados de transição ( $[ES_S]$  e  $[ES_R]$ ). Como consequência, um dos enantiômeros será transformado mais rapidamente do que o outro (FIGURA 2.12).

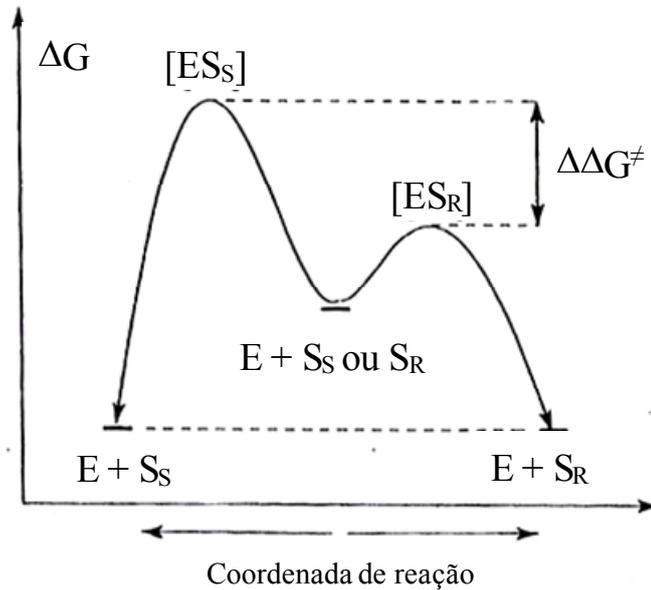


FIGURA 2.12 - Representação da variação da energia livre do sistema ( $\Delta G$ ) em função da reação catalisada pela enzima. Onde: E representa a enzima, S<sub>S</sub> é o enantiômero S do substrato, S<sub>R</sub> é o enantiômero R do substrato e  $\Delta\Delta G^\ddagger$  é a energia diferencial de ativação entre os enantiômeros.

Como pode ser observado pela FIGURA 2.12, enantiosseletividade depende diretamente da variação de energia livre entre os dois estados de transição, que é chamada de energia livre diferencial de ativação entre os enantiômeros ( $\Delta\Delta G^\ddagger$ ) (Equação 2.2),

$$E = -\exp\left(\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (2.2)$$

onde R é a constante dos gases, com valor de 8,31 J/mol.K e T é a temperatura em K (Kelvin).

A enantiosseletividade enzimática é descrita, numericamente, pela razão enantiomérica ( $E$ ) (FABER, 2000; STRAATHOF; JONGEAN, 1997; CHEN et al., 1987; CHEN et al., 1982). Para determinar  $E$ , cada constante de velocidade da Equação 2.1, para uma reação uni-uni, é descrita pelos valores de  $k_{cat}$  (número de moléculas convertidas por segundo por molécula de enzima) e  $K_M$  (constante de saturação do substrato) (Equação 2.3)

$$E = \frac{v_R}{v_S} = \frac{(k_{cat} / K_M)_R}{(k_{cat} / K_M)_S} \quad (2.3)$$

Chen e col. (1982) desenvolveram uma equação, baseada em reações uni-uni e irreversíveis, que pode ser utilizada para calcular  $E$  com os valores experimentais de excesso enantiomérico ( $ee_s$  ou  $ee_p$ ) a uma dada fração de conversão ( $c$ ) (Eq. 2.4).

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}{\ln[(1-c)(1+ee_p)]} \quad (2.4)$$

Os excessos enantioméricos ( $ee$ ) que aparecem em Eq. (2.4) descrevem a pureza enantiomérica de compostos quirais, e são expressos pela equação 2.5,

$$ee_R(\%) = [(R - S)/(R + S)] * 100 \quad \text{para } R > S \quad (2.5)$$

onde  $R$  é a concentração do enantiômero ( $R$ ) e  $S$  é a concentração do enantiômero ( $S$ ). Assim, para uma mistura racêmica, o valor de  $ee$  é zero e, para um composto enantiomericamente puro, é 100%.

A conversão da reação ( $c$ ) que aparece na Eq. (2.4) é definida como a fração de substrato que foi convertido em produto em um determinado tempo, é calculada pela equação 2.6, que, por sua vez, é baseada nos valores dos excessos enantioméricos de substrato e produto.

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (2.6)$$

Rakels e col. (1993), substituíram  $c$  em Equação 2.4 por Equação 2.6 e simplificaram os termos para obter a Equação 2.7

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1-ee_s}{1+(ee_s/ee_p)}\right]}{\ln\left[\frac{1+ee_s}{1+(ee_s/ee_p)}\right]} \quad (2.7)$$

onde  $ee_s$  e  $ee_p$  correspondem aos excessos enantioméricos do substrato e do produto, respectivamente.

Com estas equações, é possível observar que um valor de  $E$  igual a 1 corresponde a uma reação não-seletiva. Para uma resolução cinética ser considerada aceitável para dar continuidade às reações sintéticas, o valor de  $E$  deve ser, no mínimo, 20 (GHANEM, 2007; GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004).

Para a caracterização do sucesso da resolução cinética catalisada por lipases, são fundamentais as determinações precisas dos excessos enantioméricos de substrato e produto,

utilizando as concentrações dos compostos ou as proporções relativas. Dentre os métodos disponíveis - polarimétricos, cromatográficos e espectroscópicos - os mais convenientes e sensíveis utilizados são a cromatografia gasosa (CG) e a líquida de alta pressão (CLAE), com colunas quirais (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004).

### 2.3 OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ENANTIOMERICAMENTE PUROS

Os métodos para obtenção de compostos enantiomericamente puros podem ser divididos de acordo com o material de partida (FIGURA 2.13): através do uso de um composto quiral, da separação de racematos (metodologia química ou enzimática) e de sínteses assimétricas a partir de substratos pró-quirais, no qual as lipases também podem ser aplicadas. A escolha do método depende de fatores como o preço do material de partida, o número de etapas sintéticas e a disponibilidade de (bio)catalisador para o processo (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004; JAEGER; REETZ, 1998).

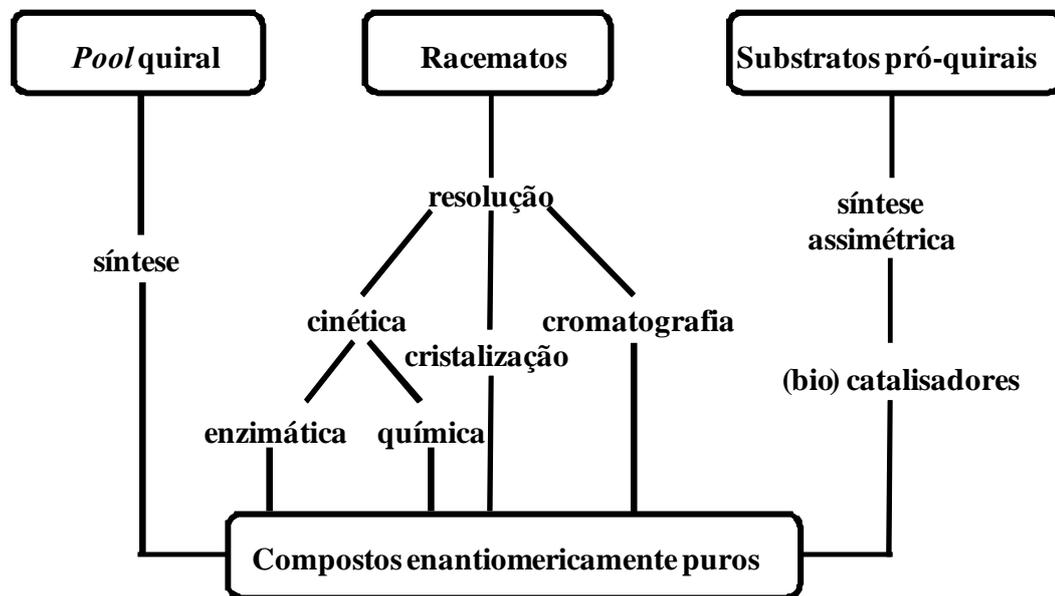


FIGURA 2.13 - Métodos de obtenção de compostos enantiomericamente puros (Fonte: GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004).

O composto quiral (*pool* quiral) refere-se a produtos naturais prontamente disponíveis, ou seja, isolados de fontes naturais ou produzidos através de fermentação. Estes compostos

podem ser convertidos em compostos sintéticos através de manipulações químicas e, por isso, diz-se que eles são utilizados como blocos de construção sintéticos para formar a molécula final. Quando um material de partida é um produto natural, na maioria dos casos somente um dos enantiômeros está disponível. Se em um dado caso, o enantiômero necessário seja o outro (não disponível), esta rota não é factível e tem-se que buscar outro método para obtê-lo (BLASER et al., 2001; PATEL et al., 1997). Antes de 2002, este método era o mais utilizado, ainda com a desvantagem de que para aplicações em grande escala nem sempre é possível encontrar o material de partida desejado de uma fonte natural (STRAATHOF et al., 2002).

A síntese assimétrica ou estereosseletiva é aquela na qual a um substrato pró-quiral são incorporados um ou mais elementos de quiralidade para a formação de produtos quirais com a utilização de auxiliares quirais. Estes substratos quirais possuem centros pró-quirais que têm dois ligantes idênticos, como dois átomos de hidrogênio, e são, portanto, aquirais. Se um destes substituintes for trocado por outro diferente, é formado um novo estereocentro, desde que os dois outros ligantes no centro pró-quiral também sejam diferentes. As duas posições em que se pode trocar os ligantes que são idênticos são chamadas enantiotópicas e o substrato é chamado de pró-*R* ou pró-*S*, dependendo da ordem de prioridade dos substituintes (CAREY; SUNDBERG, 2007; FABER, 2000).

A resolução de racematos ainda é a metodologia mais importante para a obtenção de compostos enantiomericamente puros e está dividida em três abordagens. A primeira é a resolução clássica por cristalização preferencial, viável somente para racematos que formam conglomerados (o que corresponde a menos de 20% dos casos). A segunda é a utilização de técnicas cromatográficas, principalmente via separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que ainda é restrita a uma escala industrial pequena (aproximadamente 100 kg por ano), para produtos de alto valor agregado (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004; BLASER et al., 2001). A terceira é a resolução cinética, um processo no qual um dos enantiômeros do racemato de partida é mais rapidamente transformado no produto do que sua imagem especular por um catalisador quiral. Se este catalisador quiral tem origem biológica, por exemplo, enzimas, este processo é chamado de resolução cinética enzimática ou resolução biocatalítica. Vários processos deste tipo de resolução cinética estão reportados na literatura e têm vantagens em relação aos métodos químicos (como, por exemplo, os métodos que utilizam catalisadores quirais metálicos): maior velocidade de reação ( $10^{12}$  vezes), melhor eficiência da resolução e quimio, regio e enantiosseletividade mais altas. Além disso, processos biocatalíticos apresentam vantagens também do ponto de vista ambiental: são

menos poluentes e menos perigosos (KAMAL et al., 2008; FABER, 2000).

### 2.3.1 Resolução cinética de racematos catalisada por lipases

A resolução cinética é definida como a realização de resolução de um racemato em virtude da diferença nas velocidades de reação de cada enantiômero com o catalisador, que pode ser químico ou enzimático. Dada a crescente necessidade de obtenção de compostos enantiomericamente puros, tem-se buscado alternativas para os métodos químicos, que, além do alto tempo requerido e dificuldade de execução, possuem custos elevados. Uma alternativa em ascensão é a utilização de enzimas. Dentre estas, as lipases são as mais utilizadas, especialmente de origem microbiana (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004). O uso de lipases em solventes orgânicos tem se mostrado uma excelente metodologia para a resolução de drogas quirais e vários compostos orgânicos, tais como ácidos, ésteres, aminas e álcoois, por reações de hidrólise, transesterificação e aminólise (FIGURA 2.3) (LI et al., 2007; GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006; ZANONI et al., 2001).

Mesmo que a utilização de lipases para resolução cinética em escala industrial seja menor do que em escala laboratorial, sua versatilidade e alta capacidade enantiosseletiva as tornam muito atrativas para as indústrias, principalmente química e farmacêutica, e alguns exemplos foram apresentados por Krishna (2002) (TABELA 2.1). Em todos os exemplos, pode ser observada esta capacidade enantiosseletiva, seja pelo alto valor de excesso enantiomérico, seja pelo alto valor de  $E$ .

Ainda assim, existem algumas limitações para a expansão da aplicação das lipases tanto em escala laboratorial, quanto industrial. Existem problemas quanto à enantiosseletividade insuficiente ou a falta de controle da enantiosseletividade e dificuldade de reutilização da enzima. Além disso, existe a limitação prática da resolução cinética pelo fato de que 50% de conversão é o máximo possível para obtenção de produto enantiopuro – dado que em uma mistura racêmica existe 50% de cada enantiômero. Ainda que o catalisador prefira um dos enantiômeros, com um alto tempo de reação, o outro enantiômero (de reação lenta) também reage com a enzima, resultando no aparecimento de racemato de produto. Para contornar a desvantagem do máximo de 50% de conversão, tem sido utilizada a metodologia de resolução cinética dinâmica. A diferença entre a resolução cinética convencional e a dinâmica é que, para a última, o substrato é continuamente enantiomerizado (racemizado) durante o processo de resolução e, desta forma, os enantiômeros ( $R$  e  $S$ ) permanecem em equilíbrio, o que possibilita a conversão de um dos enantiômeros do substrato ao

correspondente produto com rendimento teórico de 100% (GHANEM, 2007; REETZ, 2002; JAEGER; REETZ, 1998; WEHTJE; COSTES; ADLERCREUTZ, 1997).

TABELA 2.1 - Processos industriais de resolução cinética catalisados por lipases (Fonte: KRISHNA, 2002).

<i>Indústria</i>	<i>Produtos (aplicações)</i>	<i>Lipase</i>	<i>Processo e meio</i>	<i>Observações</i>
Bristol-Myers-Squibb (BMS)	(3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> )-acetato de azetidiona (Taxol)	<i>P. cepacia</i> (imobilizada)	Hidrólise; aquoso	<i>ee</i> > 99 % (Kg)
Bristol-Myers-Squibb (BMS)	Hidroximetil coenzima A (anticolesterol)	<i>P. cepacia</i> (imobilizada)	Acetilação; tolueno	<i>ee</i> > 98 % (Kg)
Chiroscience	Intermediários: anti-HIV; anticolesterolêmico, antifúngico	<i>P. fluorescens</i>	Hidrólise; aquoso	<i>ee</i> > 92 % (Kg)
DSM ; Tanabe Seiyaku	Intermediário Diltiazem (anti-hipertensivo)	<i>Serratia marascens</i> (imobilizada)	Hidrólise; aquoso/tolueno	<i>ee</i> > 99 % (Kg)
Sepracor	<i>S</i> -ibuprofeno (antiinflamatório)	<i>C. cylindracea</i> (imobilizada em membranas)	Hidrólise; multifásico	<i>ee</i> > 99 % (Kg)
Uniquema	Miristato e palmitato de isopropila (cremes e sabonetes)	<i>C. antarctica</i> (imobilizada em membranas)	Esterificação; 2-propanol	Rendimento 99%
BASF	Alcoóis e amins quirais (intermediários de fármacos e pesticidas)	<i>B. plantarii</i> (imobilizada)	Hidrólise; MTEB- acetato de metóxi-etila	<i>E</i> > 500 (>100 ton)

\* *ee* = excesso enantiomérico  
*E* = razão enantiomérica

### 2.3.1.1 Controle da enantiosseletividade de lipases

O aumento da utilização de biotransformações enzimáticas depende, principalmente, de cinco fatores: (i) o desenvolvimento das técnicas para liberação de enzimas intracelulares de microrganismos em larga escala, por exemplo, com utilização de tecnologia de DNA recombinante (KRISHNA, 2002); (ii) a melhora dos métodos de triagem de novos biocatalisadores (SCHMID et al., 2001), (iii) o desenvolvimento das novas metodologias de imobilização enzimática, conhecida como engenharia conformacional (SHELDON, 2007; PERSSON et al., 2002(b)); (iv) a utilização de biocatalisadores em meios não-convencionais (engenharia do meio), tais como solventes orgânicos, sistemas aquosos de duas fases, líquidos iônicos e fluidos supercríticos (GHANEM, 2007; KRIEGER et al., 2004; KLIBANOV,

2001); e, mais recentemente, (v) engenharia protéica para produzir enzimas com maior atividade frente a novos substratos, alteração da seletividade e aumento da estabilidade a extremos de pH, temperatura, solventes orgânicos, conhecida como tecnologia de engenharia protéica (DALBY, 2007; KRISHNA, 2002; BORNSCHEUER, 2002).

Quando existe alteração da estrutura protéica, da estrutura do substrato ou do meio reacional, é muito provável que a enantiosseletividade seja afetada por alteração do sítio ativo, por efeitos difusionais e estéricos dos substratos ou por efeitos termodinâmicos. Dentro deste contexto, diversos autores têm reportado a avaliação destes parâmetros (EMA et al., 2005; KRISHNA, 2002; BORNSCHEUER, 2002; BERGLUND, 2001) e alguns exemplos estão apresentados na TABELA 2.2. O que se pode perceber é a grande influência do suporte de imobilização (quanto ao tamanho dos poros e do tipo do material), do solvente (hidrofobicidade), da temperatura e de substituintes no substrato (efeitos estéricos no sítio ativo da enzima) na enantiosseletividade. Outros fatores, como a atividade de água do sistema e a concentração do substrato, parecem afetar a velocidade de reação e não tanto a especificidade da enzima.

TABELA 2.2 - Influência de fatores que afetam a enantiosseletividade em processos catalisados por lipases em escala laboratorial.

<i>Parâmetro estudado</i>	<i>Lipase</i>	<i>Fonte</i>	<i>Processo</i>	<i>Comentário</i>	<i>Referência</i>
Imobilização	CAL-B	Novozyme	Resolução de álcoois secundários	A imobilização não influenciou na enantiosseletividade	JACOBSEN et al., 2005
	Diferentes CRL	Sigma	Resolução do ( <i>R,S</i> )-ácido 2-metilhexanóico	Imobilização em Accurel com as menores partículas e menores diâmetros dos poros apresentou os maiores valores de <i>E</i>	SABANNI et al., 2006
	Lipase MY	Meito Sangyo Co.	Síntese de ( <i>S</i> )- éster de ibuprofeno	A imobilização em Accurel MP1000 apresentou valor de <i>E</i> menor do que a preparação livre	CHEN; TSAI, 2000
	CRL	Sigma	Resolução do ( <i>R,S</i> )-ácido mandélico	O valor de <i>E</i> e a enantiopreferência dependeram do suporte e das condições utilizadas	PALOMO et al., 2002
	Lipase de <i>P. cepacia</i> (PSL)	Amano	Resolução de ( <i>R,S</i> )-1-cloro-2-acetóxi-3-(1-naftiloxi)-propano (intermediário da síntese de $\beta$ -bloqueadores)	A enzima aumentou 3 vezes a enantiosseletividade na forma imobilizada em alginato de cálcio que a forma nativa	MOHAPATRA; HSU, 1999

\*CAL-B= lipase B de *C. antarctica*; CRL= lipase de *C. rugosa*; MY= lipase de *Candida* sp.; PSL= lipase de *P. cepacia*; CRL-UAB= lipase de *C. rugosa* cedida pela Universitat Autònoma de Barcelona; ROL= lipase de *R. oryzae*; QLM= lipase termofílica; PPL= lipase pancreática de porco; CCL= lipase de *C. cylindracea* ; *E*= razão enantiomérica.

TABELA 2.2 - Influência de fatores que afetam a enantiosseletividade em processos catalisados por lipases em escala laboratorial. (Continuação)

<i>Parâmetro estudado</i>	<i>Lipase</i>	<i>Fonte</i>	<i>Processo</i>	<i>Comentário</i>	<i>Referência</i>
Solvente	CAL-B, CRL-UAB, ROL	Comerciais e não comercial, respectivamente	Resolução do ( <i>R,S</i> )-ácido 2-fenilpropionico	Com CAL-B, valor de <i>E</i> aprox. constante; para as outras duas lipases, aumento de <i>E</i> com a diminuição da polaridade do solvente	PERSSON et al., 2002a
	QLM	Meito Sangyo Co.	Resolução do ( <i>R,S</i> )-2-octanol e 2-pentanol	<i>E</i> teve correlação negativa com o volume molecular ( $A^3$ ) dos solventes	WANG et al., 2008a
	ChiroCLEC-PC e Chirazymes	Altus Biologics e Roche, respectivamente	Resolução do ( <i>R,S</i> )-1-feniletanol	Com o aumento da hidrofobicidade do solvente houve aumento na velocidade inicial da reação e não houve influência na enantiosseletividade	CHUA et al., 2006
	PPL	Sigma	Resolução do ( <i>R,S</i> )-álcool <i>sec</i> -(2-naftil)etil	A enantiosseletividade foi alterada com o solvente, sem correlação com momento dipolar e hidrofobicidade	FITZPATRICK; KLIBANOV, 1991
	PSL	Amano	Resolução de ( <i>R,S</i> )-1-cloro-2-acetóxi-3-(1-naftiloxi)-propano (intermediário da síntese de $\beta$ -bloqueadores)	A enantiosseletividade diminuiu com o aumento da polaridade do solvente orgânico	MOHAPATRA; HSU, 1999
	PSL	Amano	Resolução de ( <i>R,S</i> )-2-octanol por transesterificação	Aumento da enantiosseletividade com o aumento da hidrofobicidade do solvente	YU et al., 2007a

\*CAL-B= lipase B de *C. antarctica*; CRL= lipase de *C. rugosa*; MY= lipase de *Candida* sp.; PSL= lipase de *P. cepacia*; CRL-UAB= lipase de *C. rugosa* cedida pela Universitat Autònoma de Barcelona; ROL= lipase de *R. oryzae*; QLM= lipase termofílica; PPL= lipase pancreática de porco; CCL= lipase de *C. cylindracea*; *E*= razão enantiomérica.

TABELA 2.2 - Influência de fatores que afetam a enantiosseletividade em processos catalisados por lipases em escala laboratorial. (Continuação)

<i>Parâmetro estudado</i>	<i>Lipase</i>	<i>Fonte</i>	<i>Processo</i>	<i>Comentário</i>	<i>Referência</i>
Solvente	PSL	Amano	Resolução de vários alcoóis secundários por esterificação	Aumento da conversão com aumento da hidrofobicidade do solvente	CATONI et al., 1996
	Lipase de <i>Pseudomonas</i> sp.	comercial	Hidrólise de substrato pró-quiral 1,4-diidropiridina	Reversibilidade da enantiopreferência enzimática pela alteração do solvente	HIROSE et al., 1992
	PPL e PSL	comercial	Transesterificação do ( <i>R,S</i> )-sulcatol(6-metil-5-hepten-2-ol) e do ( <i>R,S</i> )-3-bromo-5-hidroximetil isoxazolina	Influência do solvente na enantiosseletividade, embora sem correlação com as propriedades de hidrofobicidade e constante dielétrica	SECUNDO et al., 1992
	CAL-B	Novozyme	Resolução do ( <i>R,S</i> )-3-metil-2-butanol por transesterificação	Correlação positiva de <i>E</i> com o volume de van der Waals das moléculas de solvente	OTTONSSON et al., 2002
	PSL	Amano	Transesterificação do ( <i>R,S</i> )-sulcatol(6-metil-5-hepten-2-ol)	<i>E</i> foi maior com solventes lineares do que com ramificados	NAKAMURA et al., 1995
	Lipases de <i>P. aeruginosa</i>	Triagem de microrganismos	Resolução do ( <i>R,S</i> )-1-cloro-3-(3,4-difluorofenoxi)-2-propanol por transesterificação	Não houve uma correlação com a hidrofobicidade do solvente; hexano como melhor solvente	SINGH; BANERJEE, 2007
	Lipase de <i>Candida</i> sp.	isolada	Esterificação de ( <i>R,S</i> )-ibuprofeno	Correlação de <i>E</i> com hidrofobicidade; isooctano como melhor solvente	LIU et al., 2008
	PSL	Amano	Resolução de alcoóis secundários por transesterificação	Aumento da atividade enzimática com aumento da hidrofobicidade do solvente	CERNIA et al., 1998

\*CAL-B= lipase B de *C. antarctica*; CRL= lipase de *C. rugosa*; MY= lipase de *Candida* sp.; PSL= lipase de *P. cepacia*; CRL-UAB= lipase de *C. rugosa* cedida pela Universitat Autònoma de Barcelona; ROL= lipase de *R. oryzae*; QLM= lipase termofílica; PPL= lipase pancreática de porco; CCL= lipase de *C. cylindracea*; *E*= razão enantiomérica.

TABELA 2.2 - Influência de fatores que afetam a enantiosseletividade em processos catalisados por lipases em escala laboratorial. (Continuação)

<i>Parâmetro estudado</i>	<i>Lipase</i>	<i>Fonte</i>	<i>Processo</i>	<i>Comentário</i>	<i>Referência</i>
Temperatura	CAL-B, RML, ROL e CRL-UAB	Comerciais e não comercial, respectivamente	Resolução do ( <i>R,S</i> )-ácido 2-fenilpropiónico em heptanol	O valor de <i>E</i> das reações aumentou com a diminuição da temperatura, com preferência do enantiômero ( <i>S</i> )	PERSSON et al., 2002a
	CRL imobilizada	Meito Sangyo Co.	Síntese de ( <i>S</i> )- éster de ibuprofeno	O aumento da temperatura diminuiu a enantiosseletividade ( $T_r > 60^\circ\text{C}$ )	CHEN; TSAI, 2000
	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416		Resolução do acetato de mentil por hidrólise para síntese do <i>L</i> -mentol	Aumento da conversão entre 25 e 40°C, acima desta temperatura, houve diminuição significativa de conversão	YU et al., 2007b
	PSL	Amano	Resolução de ( <i>R,S</i> )-2-octanol por transesterificação	Aumento da enantiosseletividade com a diminuição da temperatura; T ótima em 50°C	YU et al., 2007a
	Lipase de <i>P. aeruginosa</i>	isolada	Resolução do ( <i>R,S</i> )-1-cloro-3-(3,4-difluorofenoxi)-2-propanol por transesterificação	Acima e abaixo de 30°C, uma diminuição dos valores de conversão foi observado	SINGH; BANERJEE, 2007
	CCL	Sigma	Resolução de ( <i>R,S</i> )-ésteres de ibuprofeno	O aumento da temperatura aumentou a velocidade de reação e a enantiosseletividade	LEE et al., 1995

\*CAL-B= lipase B de *C. antarctica*; CRL= lipase de *C. rugosa*; MY= lipase de *Candida* sp.; PSL= lipase de *P. cepacia*; CRL-UAB= lipase de *C. rugosa* cedida pela Universitat Autònoma de Barcelona; ROL= lipase de *R. oryzae*; QLM= lipase termofílica; PPL= lipase pancreática de porco; CCL= lipase de *C. cylindracea*; *E*= razão enantiomérica.

TABELA 2.2 - Influência de fatores que afetam a enantiosseletividade em processos catalisados por lipases em escala laboratorial. (Continuação)

<i>Parâmetro estudado</i>	<i>Lipase</i>	<i>Fonte</i>	<i>Processo</i>	<i>Comentário</i>	<i>Referência</i>
Atividade de água (a <sub>w</sub> )	CAL-B, CRL-S, RML, CRL-UAB, ROL	Commercial e não commercial	Resolução do ( <i>R,S</i> )-ácido 2-fenilpropionico	Para a maioria das lipases, não houve influência da a <sub>w</sub> na enantiosseletividade	PERSSEON et al., 2002a
	CRL, MJL, ROL, PRL	Amano	Síntese de butirato de butila por transesterificação	Presença de correlação direta entre a <sub>w</sub> e velocidade de reação	CHOWDARY; PRAPULLA, 2002
	PSL	Amano	Resolução de ( <i>R,S</i> )-2-octanol por transesterificação	O valor de <i>E</i> permaneceu aproximadamente constante para todas as a <sub>w</sub> avaliadas	YU et al., 2007a
	ChiroCLEC-PC e Chirazymes	Altus Biologics e Roche, respectivamente	Resolução do ( <i>R,S</i> )-1-feniletanol	Com o aumento do conteúdo de água inicial houve diminuição na velocidade de reação e não houve influência na enantiosseletividade	CHUA et al, 2006
Concentração de substrato	PSL	Amano	Resolução de ( <i>R,S</i> )-2-octanol por transesterificação	A enantiosseletividade não foi afetada pela razão de substratos (acetato de vinila:2-octanol)	YU et al., 2007a
	Lipases de <i>P. aeruginosa</i>	Triagem de microrganismos	Resolução do ( <i>R,S</i> )-1-cloro-3-(3,4-difluorofenoxi)-2-propanol por transesterificação	Houve um aumento na velocidade de conversão de 2 a 5 mM; acima de 5 mM houve toxicidade do substrato	SINGH; BANERJEE, 2007

\*CAL-B= lipase B de *C. antarctica*; CRL= lipase de *C. rugosa*; MY= lipase de *Candida* sp.; PSL= lipase de *P. cepacia*; CRL-UAB= lipase de *C. rugosa* cedida pela Universitat Autònoma de Barcelona; ROL= lipase de *R. oryzae*; QLM= lipase termofílica; PPL= lipase pancreática de porco; CCL= lipase de *C. cylindracea*; *E*= razão enantiomérica.

TABELA 2.2 - Influência de fatores que afetam a enantiosseletividade em processos catalisados por lipases em escala laboratorial. (Continuação)

<i>Parâmetro estudado</i>	<i>Lipase</i>	<i>Fonte</i>	<i>Processo</i>	<i>Comentário</i>	<i>Referência</i>
Substrato/substituente	PSL	Amano	Resolução de derivados de glicerol (( <i>R,S</i> )-1,2-cetal gliceróis)	Modificação da estrutura do substrato com bis(4-bromofenil) cetal aumentou a enantiosseletividade	KAWANAMI et al., 2005
	PSL	Amano	Hidrólise de ( <i>R,S</i> )-ésteres com diferentes tamanhos de cadeia acila	Previsão da alteração da enantiosseletividade pelo comprimento da cadeia de ácidos graxos por um modelo proposto	TAFI et al., 2004
	CAL-B	Novozyme	Resolução de diferentes álcoois alílicos e propargílicos por transesterificação	Os substratos foram eficientemente resolvidos em hexano como solvente e alguns apresentaram <i>E</i> >99%	RAMINELLI et al., 2004
	CAL-B, PSL e CCL	Novozyme, Amano e Sigma, respectivamente	Resolução de diferentes álcoois alílicos secundários	A enantiosseletividade e enantiopreferência dependeram do biocatalisador e substrato utilizados	CHOJNACKA et al., 2007
	PSL	Amano	Resolução de álcoois secundários por transesterificação e esterificação	A utilização de substratos modificados, induzidos por grupos substituintes no anel aromático, não melhorou significativamente os valores de conversão	CERNIA et al., 1998
	CAL-B	Novozyme	Resolução de diferentes álcoois primários e secundários	A enantiosseletividade com os álcoois secundários foi maior do que com os primários; quanto maior a diferença de tamanho dos substituintes ligados ao centro assimétrico, maior <i>E</i> .	WANG et al., 2008b

\*CAL-B= lipase B de *C. antarctica*; CRL= lipase de *C. rugosa*; MY= lipase de *Candida* sp.; PSL= lipase de *P. cepacia*; CRL-UAB= lipase de *C. rugosa* cedida pela Universitat Autònoma de Barcelona; ROL= lipase de *R. oryzae*; QLM= lipase termofílica; PPL= lipase pancreática de porco; CCL= lipase de *C. cylindracea*; *E*= razão enantiomérica.

### 2.3.1.2 Resolução cinética de álcoois

Os álcoois pertencem a uma classe versátil de compostos utilizados para aplicações sintéticas, dada sua facilidade de serem funcionalizados. Esta versatilidade é utilizada, principalmente, para a síntese de drogas quirais ou intermediários de síntese e fragâncias (OMORI et al., 2007; GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA, GOTOR, 2006; ABATE et al., 2004).

A metodologia mais utilizada na resolução cinética de álcoois catalisada por lipases é a que utiliza a reação de transesterificação em solventes orgânicos, envolvendo um éster e um álcool (alcoólise, FIGURA 2.3), como também pode ser observado na TABELA 2.2. A enzima, na presença de um doador de acila adequado, em um solvente orgânico e temperatura apropriados, transforma seletivamente um enantiômero da mistura racêmica no seu correspondente éster, enquanto que o outro enantiômero permanece sem reagir, na forma enantiomericamente pura. Os enantiômeros podem, então, ser separados por técnicas cromatográficas. Alternativamente, o produto da reação de esterificação pode, posteriormente, ser submetido à reação de hidrólise, para a qual uma enzima também pode ser utilizada. Desta forma, o substrato e o produto podem ser obtidos separadamente na sua forma enantiopura, com altos excessos enantioméricos, geralmente superiores a 99% (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004; GHANEM; SCHURIG, 2003) (FIGURA 2.14).

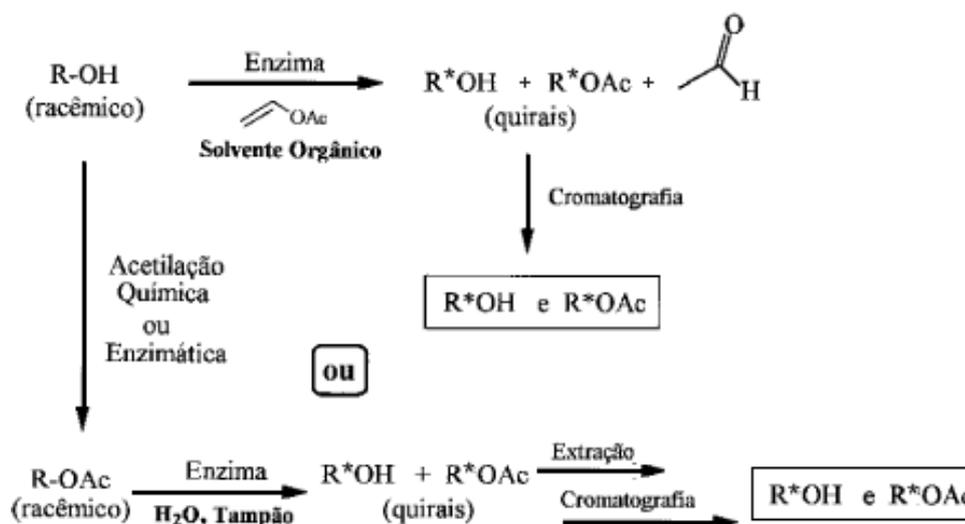


FIGURA 2.14 - Resolução cinética de um álcool racêmico utilizando lipases (Fonte: COSTA; AMORIM, 1999).

Lipases, em geral, são mais eficientes para a resolução cinética de álcoois secundários, do que de álcoois primários ou terciários (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004). Este fato é justificado por diferenças na acomodação destes substratos no sítio ativo, como anteriormente explicado no item 2.2.4.2.

Apesar desta diferença de enantiosseletividade, a lipase comercial de *Burkholderia cepacia* (Amano<sup>®</sup>) é considerada eficiente, tanto para a resolução de uma grande variedade de álcoois primários, quanto para álcoois secundários (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004). Para os primeiros, apresentou razões enantioméricas (*E*) de até 9,3 para acilação de alquil-fenil-pentanóis (SABBANI; HENDENSTROM; ANDERSSON, 2007); de aproximadamente 20, para cicloalquil-pentanóis; 10, para alceno-álcoois, e superior a 100, para aril-propanóis, como revisado por Ghanem e Aboul-Enein (2004) e Ghanem (2007). O valor de *E* também foi superior a 100 quando foram utilizadas as lipases de *B. cepacia* (Amano<sup>®</sup>) e de *C. antarctica* B (Novozymes 435<sup>®</sup>) imobilizadas na resolução de álcoois secundários, como os derivados de fenil-2-propanol (derivados de fármacos benzodiazepínicos) (KISS et al., 2006). Um outro exemplo com esta lipase comercial e *E* superior a 100 foi a acilação de álcoois propargílicos (ligação tripla adjacente ao carbono ligado à hidroxila), utilizados posteriormente para síntese de feromônios de besouro (FUKUSAKI; SATODA, 1997).

#### 2.3.1.2.1 Resolução cinética de álcoois alílicos secundários

Os álcoois alílicos secundários são álcoois secundários onde o carbono secundário, ao qual o grupo hidroxila está ligado, é adjacente à dupla ligação no radical. Estes substratos enantiomericamente puros são auxiliares quirais muito empregados em síntese orgânica, por serem facilmente funcionalizados e apresentarem propriedades odoríferas. Os enantiômeros separados (*R*) e (*S*) são usualmente obtidos por síntese assimétrica, principalmente por epoxidação de Sharpless (epoxidação assimétrica com titânio), mas, dado o alto valor agregado a este tipo de resolução, as lipases têm-se mostrado uma boa alternativa, por apresentarem resultados semelhantes aos do processo químico em um tempo de reação menor (CHOJNACKA; OBARA; WAWRZENCZY, 2007; GHANEM; SCHURIG, 2003).

Ghanem e Schurig (2003) utilizaram lipases comerciais de diferentes microrganismos para a obtenção de álcoois fenil-3-buten-2-ol nas suas formas (*R*) e (*S*) enantiomericamente puras e os melhores resultados foram de *ee* (%) maior que 99% e razão enantiomérica (*E*)

maior que 150, obtidos com a lipase de *P. cepacia* imobilizada em terra diatomácea (Amano®). Baseando-se na mesma reação, Raminelli et al. (2004) utilizaram a lipase de *C. antarctica* (Novozymes 435) para a resolução de dois diferentes álcoois alílicos secundários e obtiveram excessos enantioméricos (*ee*) de 99 e 96 % para os produtos (*R*)-dec-3-en-5-in-2-acetilóxi e (*R*)-6-fenil-hex-3-en-5-in-2-acetilóxi, com *E* de 354 e 77, respectivamente. Em um outro trabalho, para a resolução cinética catalisada por diferentes lipases comerciais desta classe de álcoois com radicais alifáticos (*R,S*)-hept-1-en-3-ol; 5-metilhex-1-en-3-ol; 6-metilhept-2-en-4-ol; 6,6-dimetilhept-2-en-4-ol e 1-fenilbut-3-en-2-ol, foram obtidos valores de *ee* (%) entre 9 e 95% para os substratos remanescentes e de 40 a maior que 99% para os ésteres, com valores de razão enantiomérica (*E*) entre 2,5 e 150, dependendo do radical presente (CHOJNACKA; OBARA; WAWRZENCZY, 2007).

Oliveira (2007) utilizou a lipase de *C. antarctica* (Novozymes 435) para a resolução enzimática de álcoois alílicos secundários (*R,S*)-1-fenilprop-2-en-1-ol, *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol, (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol, 5-metilhex-1-en-3-ol e 1-nonen-3-ol. Foram obtidos excessos enantioméricos superiores a 99% para os substratos e de 97 e 99% para os ésteres alifáticos e aromáticos, respectivamente, após 11 h de reação.

De maior relevância para este trabalho, foram os resultados obtidos por Baron e col. (2007), apresentados na TABELA 2.3. Os autores estudaram a resolução de álcoois alílicos secundários, os mesmos utilizados por Oliveira (2007), com a utilização da lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada.

TABELA 2.3 - Transesterificação enzimática dos álcoois alílicos secundários catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP100® após 120 h de reação (Fonte: BARON et al. (2007)).

	Álcoois (%) <sup>a</sup>		Ésteres (%) <sup>a</sup>		<i>ee</i> (%) <sup>b</sup>	
	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	<i>ee<sub>S</sub></i>	<i>ee<sub>P</sub></i>
1-fenilprop-2-en-1-ol	2,5	97,4	90,2	9,8	94,9	80,4
5-metilhex-1-en-3-ol	43,7	56,3	72,8	27,2	12,6	45,6
<i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol	13	86,9	91,9	3,1	73,9	83,8
1-nonen-3-ol	12,3	87,7	75,8	24,1	75,4	51,7
( <i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol	12,8	87,2	83,7	16,3	74,4	67,5

<sup>a</sup> Porcentagens relativas de substrato e produto determinadas por cromatografia gasosa quiral.

<sup>b</sup> Excesso enantiomérico calculado pela diferença entre as proporções relativas dos enantiômeros determinadas por cromatografia gasosa.

Os resultados mostraram a alta enantiosseletividade da lipase de *B. cepacia* LTEB11, principalmente, para a transesterificação dos substratos 1-fenilprop-2-en-1-ol e *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol, com excessos enantioméricos do produto de 80 e 84%, respectivamente, apesar do tempo de resolução de 120 h (BARON et al., 2007).

### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

#### 3.1 JUSTIFICATIVA

Existe o interesse na resolução de álcoois alílicos secundários por duas razões. A primeira é a correlação destes substratos, produzidos como racematos, com interessantes propriedades odoríferas, o que aumenta sua aplicabilidade em síntese orgânica, especialmente na síntese de feromônios (ABATE et al., 2004). A segunda razão é a utilização de enantiômeros puros de álcoois alílicos na primeira etapa de síntese de hidroxilactonas enantiomericamente puras, as quais apresentam atividade inibitória de alimentação contra insetos por mecanismos que envolvem o seu sistema olfativo.

A resolução cinética destes álcoois alílicos por lipases tem sido extensivamente pesquisada, impulsionada pelo alto custo e dificuldade na realização dos métodos químicos de resolução e pelos resultados obtidos com similar e até maior excesso enantiomérico em tempos consideravelmente menores. Ainda assim, a utilização de lipases comerciais limita a aplicabilidade em larga escala desta metodologia e, por isso, faz-se necessária a obtenção de lipases com menor custo, altas produção, estabilidade e capacidade enantiosseletiva. Para isso, a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11, caracterizada anteriormente por Lima (2004), foi utilizada neste trabalho como modelo enzimático para o estudo da atividade e enantiosseletividade na resolução cinética dos substratos propostos.

Esta lipase apresenta algumas características que justificam sua escolha para esta aplicação. Estudos prévios mostraram que atividade volumétrica ( $50 \text{ U.mL}^{-1}$ ) frente ao *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila) produzida no meio de fermentação é considerada alta. Com relação à utilização da lipase de *B. cepacia* LTEB11 em biocatálise, uma das suas características mais importantes é a sua estabilidade em solventes orgânicos polares e apolares, além da sua alta atividade de esterificação (LIMA, 2004; SALUM et al., 2008). Além disso, houve um estudo preliminar que comprova sua capacidade enantiosseletiva, apesar do elevado tempo de resolução (BARON et al., 2007).

## 3.2 OBJETIVOS

### 3.2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do trabalho é estudar a enantiosseletividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 na resolução de álcoois alílicos secundários produzidos por síntese química.

### 3.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a estabilidade da lipase imobilizada em Accurel MP1000<sup>®</sup> em solventes orgânicos;
- Definir a metodologia para determinação da enantiosseletividade enzimática;
- Avaliar a influência do grupo substituinte R do substrato na enantiosseletividade enzimática;
- Avaliar a influência da imobilização enzimática na enantiosseletividade e velocidade de conversão dos substratos;
- Avaliar o efeito da temperatura na velocidade de conversão e enantiosseletividade para diferentes substratos;
- Avaliar a influência da quantidade de enzima no meio reacional sobre a velocidade de conversão e confirmar a manutenção da enantiosseletividade enzimática;
- Avaliar o efeito do solvente no meio reacional sobre a velocidade de conversão e enantiosseletividade;
- Definir a melhor condição reacional para a resolução cinética de, pelo menos, um substrato.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa de *Burkholderia cepacia* LTEB11 isolada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise e caracterizada pelo IRD (ex-ORSTOM), Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, CESB/ESIL, Marseille, France.

### 4.2 PRODUÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

A cepa foi cultivada em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio Luria Bertani (LB) Miller (cloreto de sódio - 0,1 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura - 0,05 g.L<sup>-1</sup> e triptona bacteriológica - 0,1 g.L<sup>-1</sup>), a 29°C e 150 rpm. Após, aproximadamente, 8 h, 1 mL da cultura, correspondente a 10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>, foi inoculado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio composto de de KNO<sub>3</sub> - 3,54 g.L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1,0 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5 g.L<sup>-1</sup>, NaCl - 0,38 g.L<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,01 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup> e 1% (v/v) de óleo de oliva comercial (azeite de oliva, marca Gallo).

Para a manutenção, a cepa de *B. cepacia* foi inoculada em 50 mL do meio líquido LB Miller e cultivada a 29°C, 200 rpm, durante tempo necessário para atingir 10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>. Este meio foi centrifugado (centrífuga, Jouan BR4) e, ao sedimento de células, foi adicionado solução de glicerol 50 % (v/v), previamente esterilizado em autoclave. A cepa foi, então, armazenada em glicerol (50 %, v/v) sob refrigeração a -18°C.

#### 4.2.1 Obtenção da enzima

Após o cultivo da bactéria durante 72 h, os frascos foram mantidos por 12 h a 4°C. Depois deste tempo, o meio de cultivo foi centrifugado a 12500×g durante 20 min a 4°C em centrífuga refrigerada (Jouan BR4). O sobrenadante foi removido e armazenado a 4°C com adição de azida sódica (0,05%, m/v) e foi denominado do extrato bruto. Para a obtenção da enzima livre utilizada neste trabalho, sobrenadante de cultura foi congelado e posteriormente

liofilizado (liofilizador Jouan LP3<sup>®</sup> modelo 60), com perda de aproximadamente 10% de atividade lipolítica em relação ao extrato bruto.

### 4.3 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM ACCUREL

Este procedimento está baseado em Al-Duri e Yong (2000). O suporte hidrofóbico Accurel MP 1000<sup>®</sup> com as seguintes características: polipropileno em pó, densidade de 1.992 g.cm<sup>-3</sup>, área de superfície de 55.9855 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> de suporte, tamanho do poro menor que 1500 µm, foi fornecido pela Accurel Systems (Membrana GmbH, Obenburg, Germany). O material previamente imerso em etanol por 30 min e posteriormente lavado com uma mistura de etanol:água 50% (v/v) e, em seguida, com água deionizada. Após o preparo do suporte, este foi adicionado ao sobrenadante de cultura de *B. cepacia* LTEB11 na proporção de 25 mg de proteína por 1 g de suporte, conforme determinado por Salum et al. (2008). A mistura foi, então, mantida em agitador orbital (150 rpm) a 25°C por aproximadamente 12 h e depois filtrada a vácuo. Para evitar interferência de lipídeos que podem estar presentes no suporte, foi necessário um procedimento de delipidação da enzima imobilizada. A cada grama de enzima imobilizada, foram adicionados 20 mL de uma solução clorofórmio:butanol (9:1). Esta mistura foi mantida em agitação a 200 rpm a 25 °C por 10 min. Esta etapa de delipidação foi realizada até que a fase orgânica separada por filtração não contivesse mais ácidos graxos livres e triglicerídeos, o que foi acompanhado por cromatografia em camada delgada, CCD, em fase móvel hexano: éter etílico: ácido acético (7:3:0,1). Após a delipidação completa, a enzima imobilizada foi mantida em dessecador a 4°C por 48 h.

### 4.4 RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS ALÍLICOS SECUNDÁRIOS UTILIZANDO A LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

#### 4.4.1 Substratos

A reação para a síntese dos substratos baseia-se na reação de Grignard e foi realizada pelo Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais do Departamento de

Química desta Universidade, coordenado pelo Prof. Dr. Francisco de Assis Marques, colaborador neste trabalho (FIGURA 4.1), com o rendimento entre 80 e 92%.

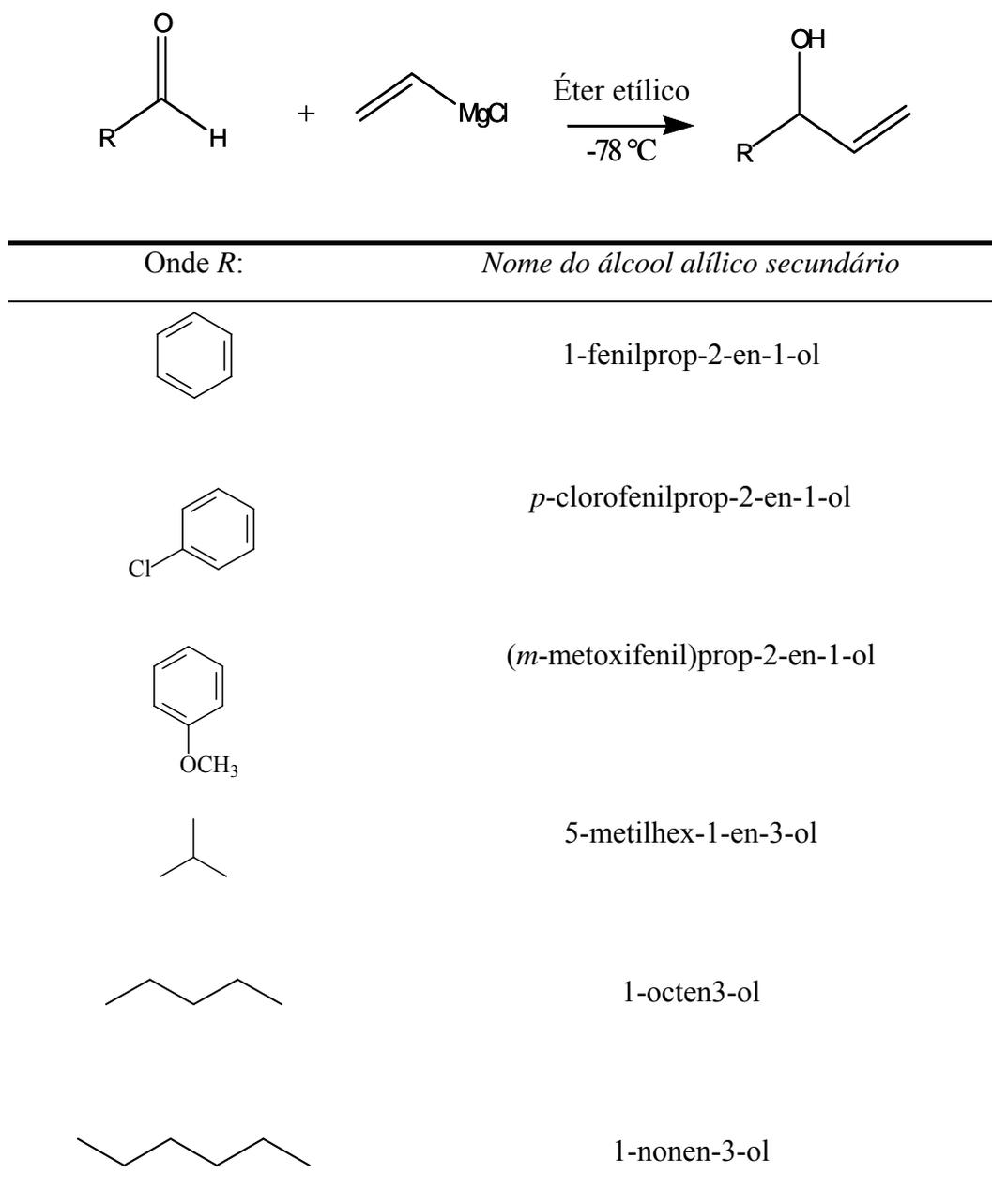


FIGURA 4.1 - Obtenção dos álcoois alílicos secundários pela reação de Grignard.

Após a síntese dos substratos, as amostras foram submetidas à purificação em coluna (Sílica Flash) com eluição em fase móvel éter de petróleo: éter etílico (6:1) e acompanhamento por cromatografia em camada delgada, conforme item 4.5.3.2.

Para facilitar a referência de cada substrato, cada álcool alílico secundário foi denominado como *rac* (racemato) e numerado de 1 a 6 (TABELA 4.1).

TABELA 4.1 - Álcoois alílicos secundários utilizados para a reação de transesterificação catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

<i>Álcool alílico secundário</i>	<i>Nomenclatura utilizada</i>
1-fenilprop-2-en-1-ol	<i>rac-1</i>
<i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol	<i>rac-2</i>
( <i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol	<i>rac-3</i>
5-metilhex-1-en-3-ol	<i>rac-4</i>
1-octen-3-ol	<i>rac-5</i>
1-nonen-3-ol	<i>rac-6</i>

Os compostos foram caracterizados anteriormente por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) por Oliveira (2007) e confirmados no presente trabalho por polarimetria e tempos de retenção conforme mostrado adiante (TABELA 4.2, para ambos os enantiômeros e TABELA 5.3, para os enantiômeros de maior abundância relativa).

#### 4.4.2 Procedimento para a reação de transesterificação dos substratos catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11

As condições das reações variaram conforme requerido nos experimentos. Em um procedimento típico, definiram-se as condições das reações de transesterificação catalisadas pela lipase como: 450 U (unidades de atividade enzimáticas adicionadas ao meio reacional, método de hidrólise do *p*NPP, item 4.5.1.1) de enzima (livre ou imobilizada), 0,5 mmol de substrato (álcool alílico secundário), 22 mmol de acetato de vinila (Acros Organics<sup>®</sup>) e 7 mL de hexano (solvente orgânico, Vetec<sup>®</sup>) (FIGURA 4.2). A reação foi mantida sob agitação a 180 rpm a 37°C e foi baseada nas quantidades utilizadas por Baron e col. (2007).

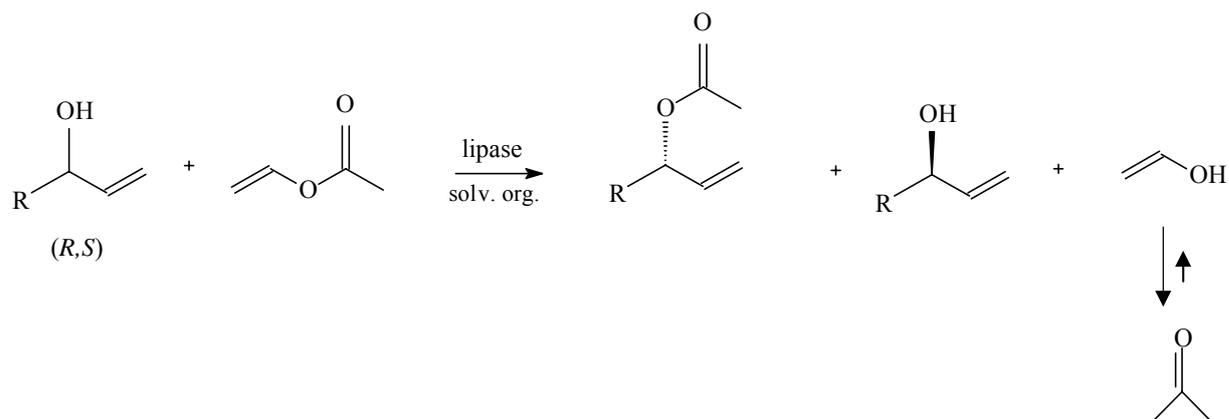


FIGURA 4.2 - Transesterificação enzimática de álcoois alílicos secundários catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

#### 4.4.3 Determinação dos valores de conversão, velocidade de conversão, excessos enantioméricos e das razões enantioméricas

O método utilizado para determinação da pureza enantiomérica foi a cromatografia gasosa quiral. Este método foi escolhido porque, além de não ser afetado por traços de impurezas, e de ser rápido e simples. Além disso, era facilmente disponível, pois já era utilizado no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais. Neste método, os enantiômeros sofrem interações diastereoisoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária de ciclodextrina, sendo eluídos em velocidades diferentes, e, portanto, com tempos de retenção diferentes. Após resolução quantitativa dos enantiômeros sob a fase estacionária quiral ser alcançada, a inspeção do cromatograma fornece diretamente a composição enantiomérica da amostra. Tais mensurações podem ser efetuadas com um alto grau de precisão ( $\pm 0,05\%$ ), o que garante a confiabilidade dos resultados (SCHURIG, 2002; SCHURIG, 2001; VETTER; SCHURIG, 1997).

Os excessos enantioméricos de substrato ( $ee_s$ ) e produto ( $ee_p$ ) foram determinados pela diferença de porcentagens relativas de cada enantiômero, conforme equação 2.4 do item 2.2.4.5.

Os valores de conversão ( $c$ ) e razão enantiomérica ( $E$ ), quando a determinação foi pontual, ou seja, utilizando-se um único tempo de reação, foram determinados segundo Chen e col. (1982) considerando-se o valor de conversão e  $ee_s$ , a partir das seguintes Equações 4.1 e 4.2:

$$c(\%) = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \times 100 \quad (4.1)$$

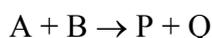
$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad (4.2)$$

onde  $ee_s$  corresponde ao excesso enantiomérico do substrato (%),  $ee_p$  corresponde ao excesso enantiomérico do produto (%),  $c$  corresponde à conversão (%) e  $E$  é a razão enantiomérica.

A velocidade de conversão (%/h) foi determinada pela divisão da conversão (%) determinada pelo tempo da análise. Posteriormente, foi realizada em relação tempo *versus* conversão (%)/h e foi obtida uma média de velocidade de conversão onde esta relação fosse linear.

#### 4.4.3.1 Modelo matemático para a determinação da razão enantiomérica ( $E$ )

Um modelo foi desenvolvido para uma reação que envolve dois substratos e dois produtos. A reação com cada enantiômero pode ser representada como segue:



A reação enzimática catalisada pelas lipases segue o mecanismo de “pingue-pongue” (ou seja, o mecanismo da enzima substituída). É pressuposto que o valor da constante de equilíbrio é suficientemente grande para que a reação possa ser tratada como se fosse irreversível. Com este pressuposto, o mecanismo da reação é dado pelo seguinte esquema (FIGURA 4.3):

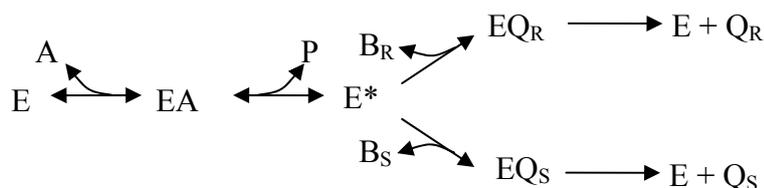


FIGURA 4.3 - Mecanismo da reação da enzima substituída.

Neste esquema, o substrato quiral (B) é o segundo substrato a entrar e o produto quiral (Q) é o segundo produto a sair. O símbolo  $E^*$  representa a enzima substituída, que contém um grupo que foi removido do substrato A durante sua conversão para produto P este grupo é doado para o substrato B durante sua conversão para o produto Q. Nas reações de transesterificação estudadas no presente trabalho, A representa acetato de vinila, P representa acetaldeído (produto remanescente após a retirada do grupo acetato do acetato de vinila, que permanece em equilíbrio ceto-enólico com etanol),  $E^*$  representa a enzima acetilada, B representa o álcool quiral e Q representa o éster quiral.

Este modelo de reação bi-bi (envolvendo dois substratos) pode ser utilizado para a determinação de  $E$  porque na presença de um grande excesso estequiométrico de doador de acila (de 44 vezes) e com um valor de constante de equilíbrio alta (determinada como maior que 100 pelo programa ASPEN Plus<sup>®</sup>) a equação simplifica e torna-se idêntica à equação de Chen et al. (1982) para reações uni-uni irreversíveis, como apresentado na FIGURA 2.11 (p. 29).

A partir do esquema de reação apresentado na FIGURA 4.3, é possível deduzir as seguintes equações:

$$\frac{dQ_R}{dG} = \frac{E \cdot B_R}{E \cdot B_R + B_S} = -\frac{dB_R}{dG} \quad (4.3a)$$

$$\frac{dQ_S}{dG} = \frac{B_S}{E \cdot B_R + B_S} = -\frac{dB_S}{dG} \quad (4.3b)$$

onde  $E$  é a razão enantiomérica ou constante de enantiosseletividade,  $B_R$ ,  $B_S$ ,  $Q_R$  e  $Q_S$  são as frações molares dos espécies  $B_R$ ,  $B_S$ ,  $Q_R$  e  $Q_S$ , respectivamente, e  $G$  é o grau da reação. A dedução deste conjunto de equações encontra-se no Apêndice 1.

As frações molares usadas em equações (4.3a) e (4.3b) são definidas pelas seguintes expressões:

$$B_R = \frac{[B_R]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (4.4a)$$

$$B_S = \frac{[B_S]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (4.4b)$$

$$Q_R = \frac{[Q_R]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (4.4c)$$

$$Q_S = \frac{[Q_S]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (4.4d)$$

O grau de reação, equivalente a conversão, é definido por:

$$G = \frac{[G]}{[B_R]_o + [B_S]_o} = \frac{[Q_R] + [Q_S]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (4.5)$$

onde  $[B_R]_o$  e  $[B_S]_o$  são as concentrações iniciais dos dois enantiômeros dos substratos quirais.  $G$  pode variar de 0 (nenhum produto quiral formado) até 1 (todo o substrato quiral convertido em produtos quirais). O Apêndice 2 apresenta o método usado para calcular as frações molares  $B_R$ ,  $B_S$ ,  $Q_R$  e  $Q_S$  a partir dos dados fornecidos pela análise de cromatografia gasosa.

Foram realizados experimentos em que 5 a 6 amostras eram removidas a cada 24 h durante a reação e analisadas por CG. A estratégia para usar equações (4.3a) e (4.3b) para determinar  $E$  a partir deste conjunto de dados foi descrita por Mitchell et al. (2008) e envolve as seguintes etapas:

- admite-se que as frações molares originais sejam  $B_R = B_S = 0,5$  e  $Q_R = Q_S = 0$
- define-se um vetor de valores de  $E$  (por exemplo, 0, 0,1, 0,2 ... 200)
- para cada valor de  $E$  (iterativamente)
  - integra-se as equações para obter perfis de  $B_R$  e  $B_S$  (esta etapa é feita por um programa escrito em FORTRAN que usa a subrotina DRKGS. Esta subrotina emprega o método de Runge-Kutta para realizar a integração numérica)
  - calcula-se a soma dos quadrados dos desvios entre os dados experimentais de  $B_R$  e  $B_S$  e os valores obtidos na integração para estas variáveis
- identifica-se o valor de  $E$  que dê o menor valor para a soma dos desvios quadrados. Este valor representa o  $E$  para a reação nas condições do experimento.

Este método é semelhante a uma das metodologias para determinação de *E* revisadas por Straathof e Jongejan (1997), que se baseia no método de progressão do excesso enantiomérico *versus* grau de conversão, com utilização de análise de regressão.

#### 4.4.3.2 Determinação dos excessos enantioméricos dos substratos 1-octen-3-ol e 1-nonen-3-ol por acetilação química

Como a coluna quiral foi ineficiente na separação dos enantiômeros dos substratos 1-octen-3-ol e 1-nonen-3-ol, um procedimento de acetilação química, posterior à reação de transesterificação enzimática e à determinação das purezas ópticas do produto, foi necessário para determinar as proporções relativas de cada enantiômero dos substratos. Após 120 h de reação de transesterificação enzimática (conforme item 4.4.2), a mistura foi submetida à CCD (item 4.5.3.2) para separação do substrato e do produto. A banda correspondente ao substrato, mediante comparação com padrão, foi retirada da sílica e extraída com éter de petróleo, que depois foi evaporado em rotaevaporador. O álcool obtido foi, então, submetido ao procedimento de acetilação química, como realizado por Oliveira (2007). Proporcionalmente, para 1 mmol de álcool foram adicionados 5 mL de piridina em balão volumétrico de 50 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio. Após a adição de piridina, a mistura foi resfriada a 0°C e houve adição lenta de 3 mmol anidrido acético com agitação até a mistura atingir a temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD até que todo o material de partida, correspondente ao álcool fosse consumido (aproximadamente 30 min). A esta mistura, acrescentou-se acetato de etila (30 mL); a mistura foi lavada com solução saturada de CuSO<sub>4</sub> (2 x 10 mL) em funil de separação e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. As proporções relativas de cada enantiômero deste produto acetilado determinadas em CG quiral correspondem, portanto, às proporções relativas de cada enantiômero do substrato na reação de resolução enzimática.

#### 4.4.4 Determinação das configurações absolutas

As configurações absolutas dos enantiômeros de reação mais rápida dos *rac*-1 a 6 (TABELA 4.2) foram determinadas por comparação das rotações específicas em polarímetro automático AUTOPOL<sup>®</sup> III (Rudolph Researches) (item 4.5.3.3) e dos tempos de retenção obtidos em CG (item 4.5.3.1.1) com coluna quiral  $\beta$ -ciclodextrina por Oliveira (2007), que utilizou estes substratos para a resolução cinética catalisada pela lipase comercial B de *C. antarctica* (CAL-B, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark).

#### 4.4.5 Estudo das reações de transesterificação catalisadas pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para resolução dos álcoois alílicos secundários – influência de parâmetros na atividade e enantiosseletividade

Para estudar o comportamento da lipase de *B. cepacia* LTEB11 frente à resolução de álcoois alílicos secundários, foram avaliados os seguintes parâmetros: efeito da imobilização (enzima livre e imobilizada), da temperatura (29, 37 e 45°C), da quantidade de enzima no meio reacional (225, 450, 675, 900 e 1350 U) e do solvente (acetonitrila, diclorometano, hexano, heptano, tetrahidrofurano e tolueno).

Para avaliar a influência da imobilização na atividade e enantiosseletividade enzimática, tanto a enzima livre quanto a imobilizada em Accurel MP1000<sup>®</sup> foram utilizadas nas mesmas reações de transesterificação com diferentes álcoois alílicos secundários alifáticos e aromáticos, com as condições reacionais descritas no item 4.4.2. Inicialmente, todos os substratos propostos foram utilizados em ambas as preparações enzimáticas. Posteriormente, somente os substratos 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac*-1), *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) e 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac*-4) foram utilizados para comparar as velocidades de conversão e enantiosseletividades das preparações enzimáticas.

Para avaliar o efeito da temperatura na velocidade de conversão e enantiosseletividade enzimática, foram utilizadas três temperaturas: 29, 37 e 45°C, com 450 U de enzima imobilizada, sob as condições de procedimento reacional inicial (item 4.4.2). Os substratos avaliados foram: 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac*-1), *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2), (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (*rac*-3) e 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac*-4).

A quantidade da lipase na reação inicial foi de 450 U, determinadas pelo método de hidrólise do *p*NPP. Quantidades de unidades enzimáticas (225, 450, 675, 900 e 1350 U) em preparação imobilizada adicionadas ao meio reacional foram utilizadas para a resolução cinética de 0,5 mmol de *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) na presença de 10 mL de hexano e 22 mmol de acetato de vinila a 29°C.

Inicialmente, o solvente orgânico utilizado para as reações de transesterificação foi o hexano, mesmo solvente utilizado por Oliveira (2007) e por Baron et al. (2007). Dada a reconhecida influência do solvente na enantiosseletividade, outros solventes orgânicos (grau analítico, Vetec<sup>®</sup>) foram avaliados, em triplicata, para a reação de resolução cinética de (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) catalisada pela lipase imobilizada (675 U): heptano, acetonitrila, tetrahidrofurano, tolueno e diclorometano. Para evitar que a presença da água de hidratação, diferente para cada solvente, afetasse as reações, foi adicionada peneira molecular 4A (com tamanho de poro de 4 Å, Acros<sup>®</sup>) (previamente seca em estufa a 210°C por 24 h) em todos os solventes 48 h antes do seu uso.

Para cada solvente orgânico, foram realizados experimentos para determinação da estabilidade da enzima imobilizada, nos quais 50 mg de enzima imobilizada foram adicionados a 3 mL do solvente, sendo a mistura foi mantida em agitação em agitador orbital (100 rpm) por 12 h a 29°C. Após este tempo, a enzima foi retirada do solvente por filtração e foi determinada sua atividade lipolítica (método de hidrólise do *p*NPP) e com o sobrenadante foi realizada atividade de esterificação (método de Lowry-Tinsley). A estabilidade enzimática foi avaliada em relação a hidrofobicidade dos solventes, descrita pelos valores de log P, onde P é o coeficiente de partição do solvente em um sistema padrão octanol-água.

## 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.5.1 Determinação de Atividade Lipolítica

#### 4.5.1.1 Método da Hidrólise do *p*NPP em Meio Aquoso

Este método espectrofotométrico foi utilizado ao longo de todo o trabalho para determinar a atividade lipolítica. Foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100, em proporções 1:9. Para este procedimento, a 1 mL de solução A (palmitato de *p*-nitrofenila – Sigma (Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, EUA) – em isopropanol, em uma concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup>) foram misturados 9 mL da solução B (2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 M em pH 7,0). Desta solução, foram colocados 0,9 mL em cubeta e, após a estabilização da temperatura a 37°C, foi adicionada a solução de enzima (0,1 mL). A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela, foi monitorada a 410 nm (FIGURA 4.3). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol.min<sup>-1</sup> de *p*NP (*p*-nitrofenol). O coeficiente de extinção molar do *p*NPP em pH 7,0 ( $9,78 \times 10^3$  L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura.

Para dosagem da atividade de preparações enzimáticas imobilizadas, a reação foi iniciada com a adição de 1 mg de enzima imobilizada ao meio reacional (10 mL) descrito acima. A mistura foi mantida sob agitação manual e, a cada 30 s, 1 mL da solução foi retirado para leitura em espectrofotômetro, seguindo-se a reação durante 2 minutos.

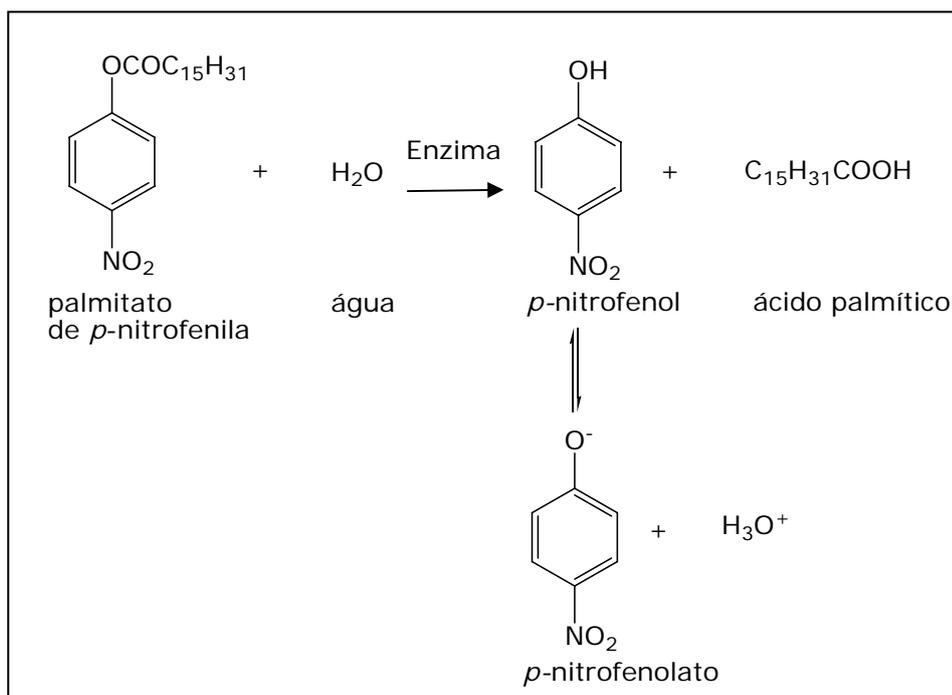


FIGURA 4.4 - Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases.

#### 4.5.1.2 Método Titulométrico (pH-Stat)

Este método foi utilizado para complementar o método da hidrólise do *p*NPP na caracterização da lipase produzida pela *B. cepacia* LTEB11, pois utiliza substratos naturais (triacilgliceróis) das lipases.

Primeiramente, foi feita uma emulsão de goma arábica proposta por Diaz e col. (2006) contendo 2,5 mM de tampão Tris-HCl pH 7,0, 150 mM de NaCl, 3 % goma arábica (m/v), 2 mM de CaCl<sub>2</sub> e 66 mM de cada substrato (tributirina ou tricaprilina ou trioleína). Sob agitação forte (300 rpm), no próprio agitador do equipamento (capacidade de 50 mL e termostatizado), volumes de 0,5 mL a 1 mL da solução enzimática ou 10 mg da enzima liofilizada foram adicionadas em 15 mL da emulsão a 37°C e a reação foi seguida por 5 min. Os ácidos graxos liberados pela reação enzimática foram titulados pelo equipamento pH-Stat (titulador automático) durante este intervalo de tempo, mantendo-se o pH em 7,0 com uma solução de NaOH 0,05 mol.L<sup>-1</sup>. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol de ácidos graxos por min, a 37 °C. A atividade foi calculada segundo a Equação 4.6.

$$A = \frac{\Delta V \times [NaOH] \times fc}{t \times Enz} \quad (4.6)$$

onde:  $\Delta V$  é a variação do volume de NaOH consumido na titulação em mL;  $[\text{NaOH}]$  é a concentração de NaOH em  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $f_c$  é o fator de correção do NaOH;  $t$  é o tempo em min e  $\text{Enz}$  é o volume da solução enzimática em mL utilizado para a reação.

#### 4.5.1.3 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry e Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar indiretamente o teor de ésteres formados, a partir do teor residual de ácido caprílico (ácido graxo) produzido durante a síntese de ésteres catalisada pela enzima imobilizada e foi utilizado para determinação da atividade de esterificação da enzima. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres, solúveis em fase orgânica. A atividade, em  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  do meio reacional, foi calculada a partir da curva de calibração construída com concentrações de 5 a 80 mM de ácido caprílico, preparadas nas mesmas condições de ensaio. Com a curva de calibração foi possível obter a quantidade de ácidos graxos ( $\mu\text{mol}$ ) a partir das absorvâncias mensuradas. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que promove o consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos por min.

#### 4.5.2 Determinação de proteínas

Para a determinação de proteínas para o cálculo da atividade específica dos extratos lipolíticos foi utilizado o método de Bradford (1976).

#### 4.5.3 Análises cromatográficas

##### 4.5.3.1 Cromatografia gasosa em coluna quiral

O cromatógrafo gasoso utilizado foi o Varian<sup>®</sup> modelo 3800, equipado com detector de ionização de chama (FID) e com coluna quiral de fase estacionária de  $\beta$ -ciclodextrina, (Chirasil-Dex, Astec, EUA), com dimensões de 10 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,12  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula. As condições cromatográficas foram: injeção (1

$\mu\text{L}$ ) modo *split* (razão 1:50), detector por ionização de chama (280 °C), gás de arraste (He) a  $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com gradiente de temperatura entre 40 e 170 °C, a  $2 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### 4.5.3.1.1 Tempos de retenção dos compostos

Os tempos de retenção dos enantiômeros de substratos (álcoois) e produtos (ésteres) obtidos por cromatografia gasosa neste trabalho estão apresentados na TABELA 4.2 e foram os mesmos valores reportados por Oliveira (2007) para estes compostos. Estes tempos de retenção são relativos a ambos enantiômeros, sem considerar aquele de maior abundância relativa. Os cromatogramas para representar estes tempos de retenção para cada composto encontram-se no Anexo.

TABELA 4.2 - Tempos de retenção dos substratos utilizados e seus respectivos produtos em cromatografia gasosa com coluna quiral  $\beta$ -ciclodextrina após resolução cinética catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 com acetato de vinila em hexano.

<i>Composto</i>	<i>tr (min) enantiômeros</i>
1-fenilprop-2-en-1-ol (1)	36,1 e 36,9
<i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol (2)	48,8 e 49,4
( <i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol (3)	49,3 e 49,8
5-metilhex-1-en-3-ol (4)	13,1 e 13,5
1-octen-3-ol (5)	21,1
1-nonen-3-ol (6)	27,0 e 27,2
(1)-acetato	30,7 e 31,8
(2)-acetato	43,4 e 44,0
(3)-acetato	44,9 e 45,4
(4)-acetato	11,8 e 12,7
(5)-acetato	20,4 e 22,2
(6)-acetato	26,7 e 28,3

A utilização de diferentes solventes orgânicos para estudo da reação de transesterificação proposta (item 4.4.5) tornou necessária a determinação dos tempos de

retenção do substrato (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol e do seu respectivo produto de acetilação enzimática para cada solvente (TABELA 4.3).

TABELA 4.3 - Tempos de retenção obtidos por cromatografia gasosa com coluna quiral  $\beta$ -ciclodextrina do substrato (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol e do produto de transesterificação com acetato de vinila catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 em diferentes solventes.

<i>Solvente</i>	<i>tr (min)</i>	<i>enantiômeros</i>
	<i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol (2)	(2)-acetato
Acetonitrila	48,4 e 49,2	43,4 e 44,0
Diclorometano	49,0 e 49,8	43,5 e 44,2
Heptano	49,0 e 49,6	43,5 e 44,1
Tetrahidrofurano	48,5 e 49,4	43,5 e 44,1
Tolueno	48,5 e 49,3	43,5 e 44,0

#### 4.5.3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) preparativa

Cada placa foi preparada com a dissolução de 20 g de sílica gel em 55 a 60 mL de água destilada. Após a secagem da placa a temperatura ambiente por aproximadamente 4 h, esta foi mantida por 12 h a 100°C para ativação. Após o resfriamento, as amostras foram aplicadas. A eluição ocorreu em éter de petróleo:éter etílico em proporção 6:1 (v/v). Para a visualização e marcação das bandas, as placas foram colocadas no ultravioleta (quando os compostos eram aromáticos) ou a placa foi borrifada com bisaldeído (compostos alifáticos). As bandas correspondentes ao substrato (com  $R_f$  – fator de retenção – entre 0,4 e 0,5) e produto (com  $R_f$  de aproximadamente 0,7), como previamente comprovado Oliveira (2007) por RMN, foram retiradas da placa e extraídas em éter de petróleo para análise das rotações ópticas.

#### 4.5.3.3 Polarimetria

A rotação óptica foi realizada no polarímetro automático AUTOPOL<sup>®</sup> III (Rudolph Researches) com comprimento de onda em 589 nm e padrão interno de calibração com leitura  $33,9732^\circ \pm 0,0001^\circ$  com cubeta de comprimento de 1 dm e faixa de concentração de

leitura de 0,1-1,0%. Para as medições, inicialmente as amostras foram submetidas à CCD preparativa para separação dos substratos e produtos, que foram concentrados separadamente para determinação da sua massa (em g). Para a leitura das rotações específicas a 20°C, cada amostra foi ressuspendida em 2 mL de clorofórmio. A equação abaixo (Equação 4.7) foi utilizada para o cálculo dos desvios ópticos (CAREY; SUNDBERG, 2007):

$$\alpha_D^{20} = \frac{r_o \times 100}{c \times l} \quad (4.7)$$

onde:  $r_o$  é a rotação específica observada,  $c$  é a concentração da amostra (g em 100 mL) e  $l$  é o comprimento da cubeta de leitura (dm).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

#### 5.1.1 Produção e caracterização da enzima livre

A TABELA 5.1 apresenta os valores de atividade lipolítica do extrato bruto, preparado a partir de um cultivo de *Burkholderia cepacia* feito em meio LB, frente a diferentes substratos, utilizando dois métodos diferentes: hidrólise do *p*NPP (4.5.1.1) e titulométrico (4.5.1.2). O resultado de atividade específica frente ao substrato *p*NPP ( $46,4 \pm 3,1 \text{ U.mg}^{-1}$ ) está de acordo com os apresentados por Lima (2004) e Baron (2008), que obtiveram valores de aproximadamente  $50 \text{ U.mg}^{-1}$ . Quando foi utilizado o método titulométrico, percebe-se que a atividade hidrolítica aumentou com o decréscimo da cadeia acílica. A maior atividade foi observada com a tributirina ( $61,2 \pm 1,2 \text{ U.mg}^{-1}$ ), sendo a atividade contra este substrato aproximadamente oito vezes maior do que a obtida contra trioleína ( $8,0 \pm 0,1 \text{ U.mg}^{-1}$ ). Baron (2008) obteve a atividade da tributirina ( $40 \pm 3 \text{ U.mg}^{-1}$ ) quatro vezes maior que a obtida com trioleína, diferença entre os resultados obtidos neste presente trabalho que pode ser explicada pela não utilização de emulsão na utilização de tributirina por Baron (2008), o que pode ter acometido em uma área superficial de substrato menor presente na solução na ausência de emulsão e resultado em uma atividade específica menor do que a obtida neste presente trabalho. Apesar da relativamente baixa atividade contra a trioleína, este resultado comprova a existência de lipases ditas verdadeiras, como descritas por Jaeger et al. (1999) no extrato bruto do cultivo de *B. cepacia* LTEB11.

TABELA 5.1 - Atividade lipolítica do extrato bruto de *Burkholderia cepacia* LTEB11 frente a diferentes substratos.

<i>Substrato</i>	<i>Atividade específica (U.mg<sup>-1</sup>)</i>
<i>p</i> NPP	$46,4 \pm 3,1$
Tributirina C4	$61,2 \pm 1,2$
Tricaprilina C8	$32,0 \pm 0,2$
Trioleína C18:1 ( $\Delta^9$ )	$8,0 \pm 0,1$

### 5.1.2 Caracterização da enzima imobilizada em Accurel

Após a caracterização do sobrenadante lipolítico de *B. cepacia* LTEB11 e imobilização em suporte hidrofóbico (conforme item 4.3), foi feita a caracterização da enzima imobilizada frente a diferentes reações: de hidrólise frente a *p*NPP e de esterificação, utilizando o ácido caprílico e etanol, e seguindo metodologia de Lowry-Tinsley (TABELA 5.2).

TABELA 5.2 - Caracterização da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel MP1000®

<i>Substratos</i>	<i>Atividade (U.g<sup>-1</sup> suporte)</i>
<i>p</i> NPP (hidrólise)	1500 ± 360
Ácido caprílico + etanol (esterificação)	29,3

Esta atividade de hidrólise da enzima imobilizada (1500 U.g<sup>-1</sup> suporte, em média) pode ser considerada alta, já que Baron (2008), com a mesma imobilização convencional, obteve, em média, 1000 U.g<sup>-1</sup> suporte. Além disso, foi observada uma ativação da enzima causada pela imobilização, provavelmente pela adsorção pelo suporte ser mais específica para a lipase do que para as outras proteínas, conforme já descrito por Salum et al. (2008).

A atividade de esterificação do ácido caprílico com a lipase imobilizada foi de 29,3 U.g<sup>-1</sup> suporte, um valor aproximadamente 30 vezes menor do que para a reação de hidrólise do éster correspondente apresentada na TABELA 2.1, quando foi considerado que foram imobilizadas 25 mg de proteína por g de suporte (item 4.3). Esta razão de 30 vezes obtida corresponde à comparação dos resultados de hidrólise e esterificação do ácido oléico (8,0 U.g<sup>-1</sup> suporte) obtida por Baron (2008), quando foi utilizado o método de imobilização convencional com o suporte Accurel EP100 (tamanho de poro de 200 a 1000 µm) na mesma proporção de proteína por g de suporte.

### 5.1.3 Estabilidade da lipase imobilizada em solventes orgânicos

A estabilidade de lipases em solventes orgânicos é um fator importante em biocatálise, considerando que sistemas aquo-restritos são necessários a fim de deslocar o equilíbrio termodinâmico da reação em favor da síntese (KLIBANOV, 2001). Avaliou-se a estabilidade

da enzima imobilizada em solventes com diferentes hidrofobicidades, que foram determinadas pelos valores de log P dos solventes: acetonitrila (log P -0,33), tetrahydrofurano (log P 0,5), diclorometano (log P 1,0), tolueno (log P 2,5), hexano (log P 3,5) e heptano (log P 4,0). Para isto, a enzima imobilizada foi mantida em agitador orbital (180 rpm) a 29°C com cada solvente orgânico por 12 h. Após a incubação, determinou-se a atividade residual de hidrólise da enzima frente ao *p*NPP (FIGURA 5.1).

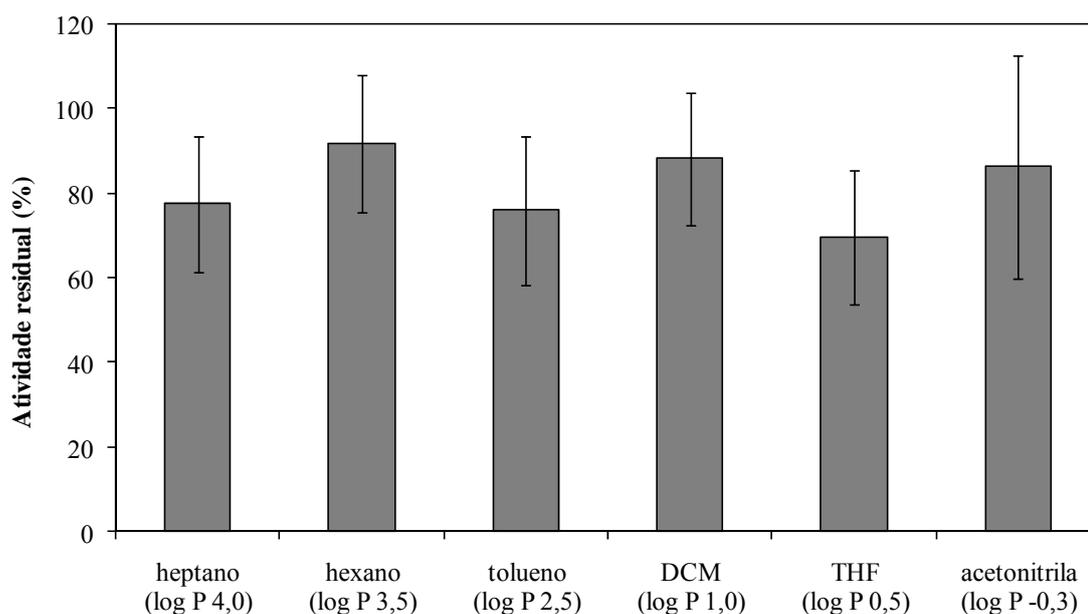


FIGURA 5.1 - Atividade residual da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel MP1000 em solventes orgânicos polares e apolares. Incubação por 12 h, 180 rpm, T= 29°C, solventes: heptano, hexano, tolueno, DCM (diclorometano), THF (tetrahydrofurano) e acetonitrila. Método: hidrólise do *p*NPP em meio aquoso.

Como pode ser observado na FIGURA 5.1, apesar do alto desvio padrão apresentado nos experimentos, devido à dificuldade de execução da metodologia em determinação de atividade em reproduzir as determinações de atividade hidrolítica frente ao *p*NPP, a enzima imobilizada em Accurel foi estável em todos os solventes orgânicos avaliados, apresentando aproximadamente 90% de atividade residual média quando incubada em hexano, DCM e acetonitrila, e menor atividade residual para heptano (78%), tolueno (76%) e tetrahydrofurano (70%).

Para avaliar a influência da hidrofobicidade do solvente na estabilidade enzimática, o parâmetro log P (logaritmo de P, calculado pelo logaritmo do coeficiente de partição de um

dado solvente em um sistema padrão octanol/água) foi escolhido para comparar as atividades residuais da enzima imobilizada. Com estes resultados, pode-se afirmar que a lipase de *B. cepacia* imobilizada é estável em solventes orgânicos com ampla faixa de log P (de -0,33 a 4,0).

A estabilidade apresentada nos solventes hidrofóbicos, que apresentam valores de log P superiores a 2,0, é mais comumente encontrada em lipases do que em solventes hidrofílicos, e pode ser explicada sob dois aspectos. Primeiro, estes solventes não retiram a água de solvatação da estrutura protéica, e, desta forma, previnem a desnaturação, mantendo a estrutura conformacional da enzima. Segundo, moléculas do solvente podem interagir com a estrutura protéica e exercer efeitos ativadores ou estabilizadores, efeitos esses que também podem estar relacionados com a presença do suporte quando se trabalha com enzimas imobilizadas (PENCREACH; BARATTI, 1997). Nesta interação com a estrutura protéica ainda deve ser considerado que solventes apolares podem manter a enzima em sua conformação aberta, ou seja, na presença destes solventes, a tampa hidrofóbica não estaria cobrindo o sítio ativo, o que poderia manter ou até aumentar a atividade enzimática (RÚA et al., 1993). Esta ativação enzimática ocorreu com a lipase de *B. cepacia* LTEB11 em sua preparação livre na presença de heptano, como relatado por Lima (2004) e por Baron (2008), após de 3 h de incubação.

A lipase de *B. cepacia* imobilizada foi estável também em solventes hidrofílicos, ao contrário do que é normalmente reportado para outras lipases (KLIBANOV, 2001). Zaks e Klibanov (1988) e Sztajer et al. (1992) justificaram a ausência de estabilidade de lipases em solventes hidrofílicos pela capacidade destes solventes em retirar a água de hidratação da proteína, necessária para manter sua conformação nativa. A alta estabilidade observada em acetonitrila, tetrahidrofurano, diclorometano e tolueno (FIGURA 2.1) poderia ser, portanto, explicados pelas hipóteses de que os solventes foram incapazes de retirar a água de solvatação da enzima imobilizada ou talvez a retirada da água residual não tenha sido suficiente para desestruturar a proteína. Esta estabilidade em solventes hidrofílicos encontrada também está de acordo com os resultados apresentados por Lima (2004) e Baron (2008). Nestes trabalhos, a enzima livre recuperou 100% da atividade com butanol (log P 0,8) e isopropanol (log P - 0,28) e etanol (log P -0,24), com atividades residuais de aproximadamente 100% após 3 h de incubação com cada solvente. Até estes trabalhos com esta lipase de *B. cepacia*, o único

exemplo de lipase microbiana estável em solventes polares era de *P. mendocina* PK12CS, com atividade residual de 83% após incubação em etanol por 2,5 h (JINWAL et al., 2003).

## 5.2 RESOLUÇÃO DOS ÁLCOOIS ALÍLICOS SECUNDÁRIOS CATALISADA PELA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

### 5.2.1 Determinação das configurações absolutas

A propriedade que um enantiômero tem para desviar a rotação da luz plano-polarizada é chamada atividade óptica e a magnitude desta rotação pode ser determinada em polarímetro. A rotação observada, que é característica de cada enantiômero de um dado composto quiral, é chamada de rotação específica, sendo igual para ambos enantiômeros, mas com sinal contrário. Este dado,  $[\alpha]_D$ , é utilizado não somente como critério de identificação de uma substância, mas também para avaliar a sua pureza óptica ou a sua porcentagem em uma mistura (CAREY; SUNDBERG, 2007).

Neste trabalho, foram utilizados os valores de rotação específica e dos tempos de retenção das amostras obtidas de substrato e produto para comparar com os dados apresentados por Oliveira (2007). Nesta comparação, os valores de excessos enantioméricos fornecidos pelo autor foram utilizados para avaliar a rotação específica das amostras deste presente trabalho. A partir disso, foi possível obter a configuração absoluta dos álcoois remanescentes e dos respectivos produtos (acetatos) (TABELA 5.3 e 5.4).

TABELA 5.3 - Tempo de retenção (tr) em cromatografia gasosa com coluna quiral  $\beta$ -ciclodextrina, rotação óptica específica e configuração do enantiômero em maior abundância relativa dos álcoois alílicos secundários após a resolução cinética catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em hexano.

<i>Substrato</i>	<i>tr (min)</i>	<i>Rotação específica <math>[\alpha]_D^{20}</math> (°)</i>	<i>Configuração</i>
1-fenilprop-2-en-1-ol (1)	36,9	-0,81	(S)
<i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol (2)	49,4	-10,75	(S)
( <i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol (3)	49,8	-15,75	(S)
5-metilhex-1-en-3-ol (4)	13,5	nd	(R)
1-octen-3-ol (5)	21,1	+7,47	(R)
1-nonen-3-ol (6)	27,2	+1,7	(R)

\*  $[\alpha]_D^{20}$  = rotação específica da amostra em clorofórmio a 20 °C.

tr = tempo de retenção (min)

nd = não determinado

TABELA 5.4 - Tempo de retenção (tr) em cromatografia gasosa com coluna quiral  $\beta$ -ciclodextrina, rotação óptica específica e configuração do enantiômero dos produtos de transesterificação de alcoóis alílicos secundários com acetato de vinila catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em hexano.

<i>Produto</i>	<i>tr (min)</i>	<i>Rotação específica <math>[\alpha]_D^{20}</math> (°)</i>	<i>Configuração</i>
(1)-acetato	31,8	+3,0	( <i>R</i> )
(2)-acetato	44,0	+25,3	( <i>R</i> )
(3)-acetato	45,4	+50,0	( <i>R</i> )
(4)-acetato	12,7	nd	( <i>S</i> )
(5)-acetato	22,2	nd	( <i>S</i> )
(6)-acetato	28,3	-1,0	( <i>S</i> )

\*  $[\alpha]_D^{20}$  = rotação específica da amostra em clorofórmio a 20 °C.

tr = tempo de retenção (min)

nd = não determinado

Todos os resultados de rotação específica obtidos foram semelhantes aos apresentados por Oliveira (2007), quando são comparados os mesmos excessos enantioméricos para as duas amostras. O que se pode observar é que os sinais foram invertidos quando são considerados os substratos (TABELA 5.3) e os respectivos produtos de transesterificação (TABELA 5.4), o que está de acordo com a transesterificação preferencial de um dos enantiômeros e conseqüente abundância relativa do outro como substrato.

Com estes dados, por comparação com os obtidos por Oliveira (2007), as configurações absolutas das amostras (*R* ou *S*) foram obtidas. As configurações absolutas determinaram que as reações de transesterificação dos alcoóis alílicos propostos com acetato de vinila catalisadas pela lipase de *B. cepacia* LTEB11 seguiram a regra de Kazlauskas e col. (1991). Por esta regra, o ataque nucleofílico preferencial do doador de acila ocorre no oxigênio do álcool que está para trás do plano (FIGURA 4.2, pag. 53). Como resultado de reação, o produto (*R*) ou (*S*) é originado, dependendo do tamanho do grupo substituinte R presente no substrato (TABELA 4.1), de forma que os produtos dos álcoois aromáticos têm a configuração *R* como maior abundância relativa e os alifáticos têm a configuração *S*.

### 5.2.2 Triagem de substratos para resolução cinética por reação de transesterificação catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11

Inicialmente, foi realizada uma triagem dos substratos a serem resolvidos por catálise enzimática por reações de transesterificação. Kazlauskas e col. (1991) demonstraram a importância na diferença do tamanho dos substituintes de álcoois secundários para o reconhecimento quiral por lipases. Baseado nesta diferença de tamanho entre os substituintes, seis álcoois foram propostos (TABELA 5.5). Foram utilizadas as preparações enzimáticas livre e imobilizada em Accurel, com exceção do substrato 1-octen-3-ol, para o qual foi utilizada somente a enzima imobilizada. As amostras foram analisadas por CG a cada 24 h para determinação do tempo em que houvesse conversão de aproximadamente 50%, o que corresponde ao máximo de rendimento teórico para a resolução cinética, visto que o substrato é um racemato (GHANEM, 2007). A partir deste tempo, foram determinados os valores de razão enantiomérica para cada reação pela utilização da Equação 4.2, proposta por Chen et al. (1982).

TABELA 5.5 - Transesterificação de álcoois alílicos secundários catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

<i>Lipase</i>	<i>Substrato</i> ( <i>R,S</i> )	<i>tempo</i> ( <i>h</i> )	<i>C</i> (%) <sup>a</sup>	<i>ee<sub>s</sub></i> (%) <sup>b</sup>	<i>ee<sub>p</sub></i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
Livre	1-fenilprop-2-en-1-ol ( <i>rac-1</i> )	120	50	82,0 ( <i>S</i> )	74 ( <i>R</i> )	17,0
Livre	<i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol ( <i>rac-2</i> )	96	50	77,0 ( <i>S</i> )	7,6 ( <i>R</i> )	18,2
Livre	( <i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol ( <i>rac-3</i> )	120	-	<i>rac</i>	-	-
Livre	5-metilhex-1-en-3-ol ( <i>rac-4</i> )	72	6,2	4,0 ( <i>R</i> )	60,0 ( <i>S</i> )	4,2
Livre	1-nonen-3-ol ( <i>rac-6</i> )	72	41	24,4 ( <i>R</i> )	35,2 ( <i>S</i> )	2,1
Imobilizada	1-fenilprop-2-en-1-ol ( <i>rac-1</i> )	120	37	57,6 ( <i>S</i> )	93,6 ( <i>R</i> )	54,2
Imobilizada	<i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol ( <i>rac-2</i> )	120	42	68,0 ( <i>S</i> )	92,8 ( <i>R</i> )	54,6
Imobilizada	( <i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol ( <i>rac-3</i> )	120	34	46,8 ( <i>S</i> )	92,0 ( <i>R</i> )	38,1
Imobilizada	5-metilhex-1-en-3-ol ( <i>rac-4</i> )	120	13	10,8 ( <i>R</i> )	71,6 ( <i>S</i> )	6,7
Imobilizada	1-octen-3-ol ( <i>rac-5</i> )	120	47	50,0 ( <i>R</i> )	55,4 ( <i>S</i> )	5,6
Imobilizada	1-nonen-3-ol ( <i>rac-6</i> )	120	66	44,2 ( <i>R</i> )	22,4 ( <i>S</i> )	2,3

\* Condições: 0,5 mmol de substrato, 22 mmol de acetato de vinila, 450 U de enzima, hexano, 37°C, 180 rpm. Onde: - corresponde a ausência e *rac* corresponde a racemato.

<sup>a</sup> Conversão calculada a partir dos excessos enantioméricos do substratos (*ee<sub>s</sub>*) e do produto (*ee<sub>p</sub>*).

<sup>b</sup> Excesso enantiomérico determinado por CG.

<sup>c</sup> Razão enantiomérica determinada pela Equação de Chen et al. (1982).

Na TABELA 5.5 é possível observar que os melhores resultados foram obtidos com a lipase imobilizada para os substratos *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) e 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac*-1), com percentagens de conversão em torno de 40%, respectivamente, excessos enantioméricos do produto em torno de 93%, em 120 h de reação, e os maiores valores de *E* (aproximadamente 54).

Os dados mostram que o grupo substituinte R ligado ao carbono assimétrico influencia a enantiosseletividade da enzima. A razão enantiomérica da enzima (*E*) foi 10 vezes maior com os substratos aromáticos (*rac*-1, 2 e 3) do que com os alifáticos (*rac*-4, 5 e 6), em média, para ambas as preparações enzimáticas (livre e imobilizada). Trabalhos com lipases comerciais também apresentaram a mesma preferência para os substratos aromáticos em relação aos alifáticos. Oliveira (2007), utilizando CAL-B (lipase B de *C. antarctica*) relatou um valor de *E* aproximadamente 4 vezes maior para o substrato *rac*-1 do que para o *rac*-4, calculados com base nos excessos enantioméricos relatados. Com a utilização da lipase Amano PS (*P. cepacia*), o *E* para o substrato álcool alílico secundário com radical *n*-butil foi de 10,6, enquanto que o substrato com radical benzil o *E* foi maior que 150 (CHOJNACKA; OBARA; WAWRZENCZY, 2007). Os autores sugerem que esta diferença pode ser explicada pelo melhor ajuste dos substratos aromáticos ao sítio ativo da enzima.

Na presença de um radical alifático ramificado (*rac*-4), *E* foi maior em aproximadamente três vezes em relação a um linear (*rac*-6) utilizando a preparação imobilizada. Esta mesma razão foi obtida com os grupos substituintes *iso*-butil (ramificado) e *n*-butil (linear) para a enantiosseletividade da lipase Amano PS (*P. cepacia*, comercial) por Chojnacka; Obara e Wawrzency (2007). A enantiosseletividade da lipase livre também foi afetada pela presença de um radical carbônico linear (*rac*-6), embora em menor escala, apresentando duas vezes maior *E* em relação ao radical ramificado (*rac*-4). Além disso, o aumento da cadeia alifática de cinco para seis átomos de carbono no radical (comparação entre os substratos *rac*-5 e 6 na preparação imobilizada), diminuiu o valor de *E* (em aproximadamente 2,5 vezes), provavelmente devido a impedimento estérico, pois as cadeias alifáticas lineares são maiores e dificultam o ajuste no sítio ativo, de acordo com o que foi sugerido por Chojnacka; Obara e Wawrzency (2007) para a resolução de álcoois alílicos secundários catalisadas por lipases comerciais.

Verificou-se também que, com a enzima livre, não houve formação de produtos mesmo após 120 h de reação com o substrato (*m*-metoxifenil)-prop-2-en-1-ol (*rac*-3). Isto

pode ter ocorrido pela formação grumos no meio reacional (verificados visualmente), por provável desnaturação protéica, que podem ter diminuído a dispersão das moléculas de enzima e impedido a reação.

Para cada experimento citado na TABELA 5.5, embora tenha sido mostrado o resultado onde se obteve conversão mais próxima possível de 50%, as amostras foram coletadas a cada 24 h e analisadas, obtendo-se a cinética para cada reação. A partir destas análises, foi observado que os valores calculados de razão enantiomérica ( $E$ ), com a equação de Chen et al. (1982), variaram ao longo do tempo, conforme apresentado na FIGURA 5.2. Esta variação não era esperada, pois este parâmetro enzimático é uma constante de especificidade da enzima e, portanto, deve manter-se constante ao longo de toda a reação, desde que não seja alterado o meio reacional (STRAATHOF; JONGEJAN, 1997).

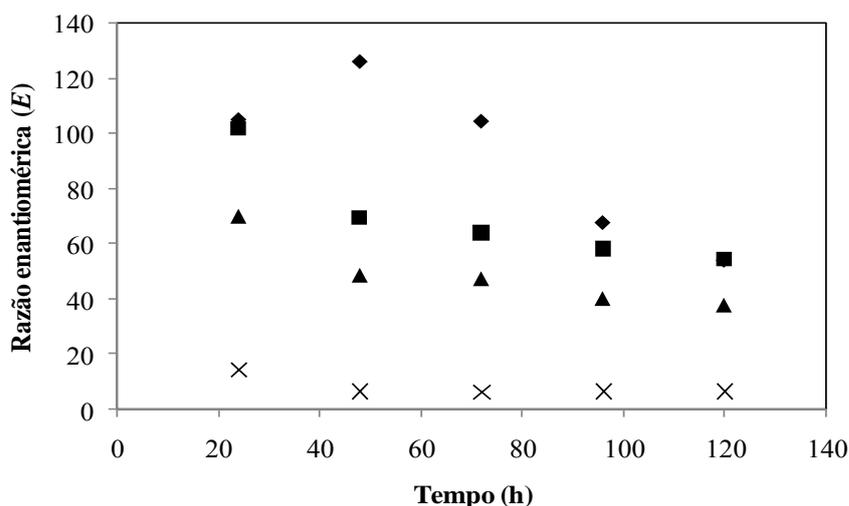


FIGURA 5.2 - Variação da razão enantiomérica ( $E$ ) determinada pela equação de Chen et al. (1982) em relação ao tempo (h) para as reações de transesterificação com a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada (450 U) e dos substratos: 1-fenilprop-2-en-1-ol (◆) e *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (■), (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (▲) e 5-metilhex-1-en-3-ol (x). Condições reacionais: 450 U de enzima imobilizada; 0,5 mmol de substrato; 22 mmol de doador de acila - acetato de vinila; hexano; 37°C; 180 rpm.

Algumas simulações foram feitas para testar a confiabilidade do valor de  $E$  dada pela equação de Chen et al. (1982). Observou-se que pequenas alterações na determinação das porcentagens relativas de cada enantiômero originavam uma variação relativamente alta no valor estimado de  $E$ . A conclusão destas simulações foi que era arriscado fazer uma

estimativa de  $E$  com base em dados de uma amostra coletada em um único ponto (tempo), como é o caso da determinação de  $E$  pela equação de Chen et al. (1982). Por isso, foi desenvolvido um método que se baseasse em várias amostras coletadas ao longo da reação, onde o  $E$  é determinado pelas frações molares dos substratos e produtos em relação à conversão (FIGURA 5.3). Este método está descrito no item 4.4.3.1 de Materiais e Métodos e maiores detalhes estão nos Apêndices 1 e 2.

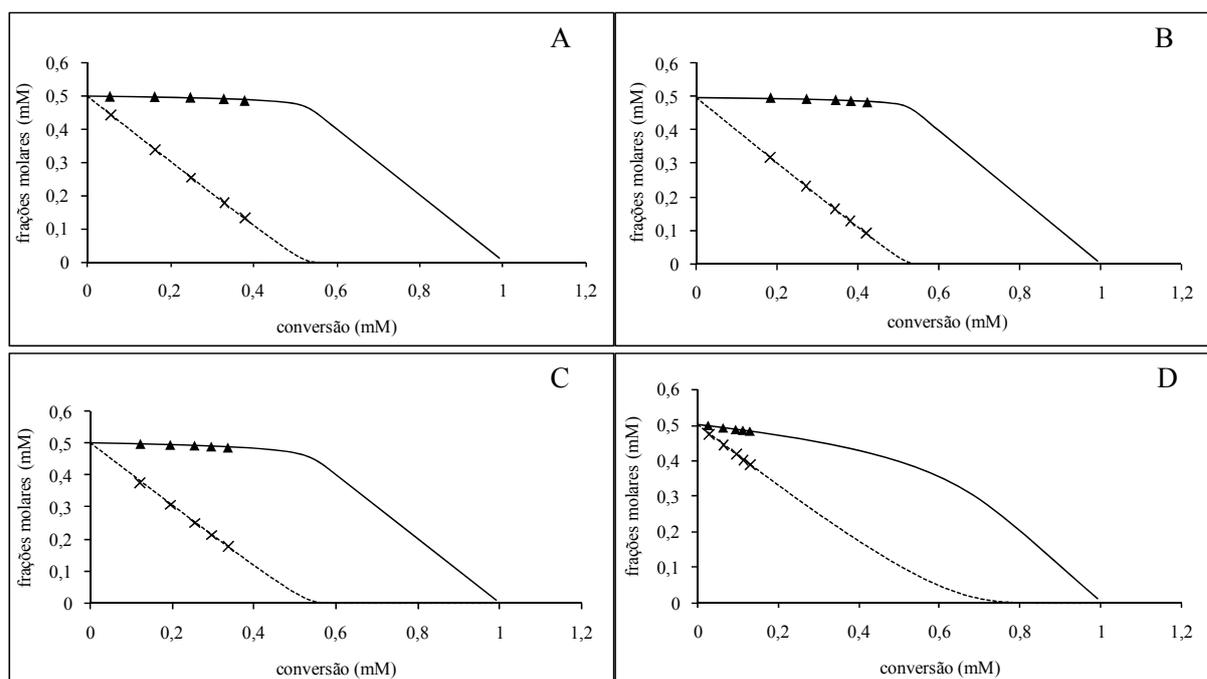


FIGURA 5.3 - Ajuste do modelo matemático desenvolvido (linhas) aos dados experimentais (pontos). Onde: (▲) representa os dados experimentais do enantiômero de reação mais lenta do substrato e (X) do do enantiômero de reação mais rápida do substrato; (-) representa o ajuste das equações por regressão não linear do do enantiômero de reação mais lenta do substrato e (- -) do enantiômero de reação mais rápida do substrato. A, B, C e D representam o ajuste aos dados experimentais de transesterificação de 1-fenilprop-2-en-1-ol ( $E = 64$ ), *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol ( $E = 59$ ), (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol ( $E = 42$ ) e 5-metilhex-1-en-3-ol ( $E = 7$ ), respectivamente. Condições reacionais: 450 U de enzima imobilizada; 0,5 mmol de substrato; 22 mmol de doador de acila - acetato de vinila; hexano; 37°C; 180 rpm.

A FIGURA 5.3 mostra que, utilizando o novo método de cálculo de  $E$ , este parâmetro permanece constante, pois caso houvesse uma variação em  $E$  durante o experimento, a linha do modelo não teria se ajustado em todos os pontos. A variação aparente de  $E$  em FIGURA 5.2 deve ser um artefato da falta de confiabilidade do uso da equação de Chen et al. (1982). A partir destes resultados, este modelo foi utilizado em todas as reações seguintes para

determinar a razão enantiomérica, parâmetro utilizado para descrever a enantiosseletividade da lipase de *B. cepacia* LTEB11.

### 5.3 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS QUE AFETAM A ENANTIOSSELETIVIDADE DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

Nestes experimentos, foram avaliados os efeitos da imobilização, da temperatura, do solvente e da quantidade da enzima adicionada ao meio reacional nos parâmetros de velocidade de conversão e enantiosseletividade da lipase de *B. cepacia* LTEB11.

#### 5.3.1 Efeito da imobilização

O primeiro efeito avaliado foi o da imobilização, pois os resultados apresentados na TABELA 5.5 já mostraram que este era um parâmetro importante na resolução de álcoois secundários. Para a comparação das duas diferentes preparações enzimáticas, ou seja, enzima livre e imobilizada, foram utilizados os três substratos que apresentaram os melhores resultados anteriormente: *rac*-1, *rac*-2 e *rac*-4 (respectivamente, 1-fenilprop-2-en-1-ol, *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol e 5-metilhex-1-en-3-ol) (FIGURA 5.4).

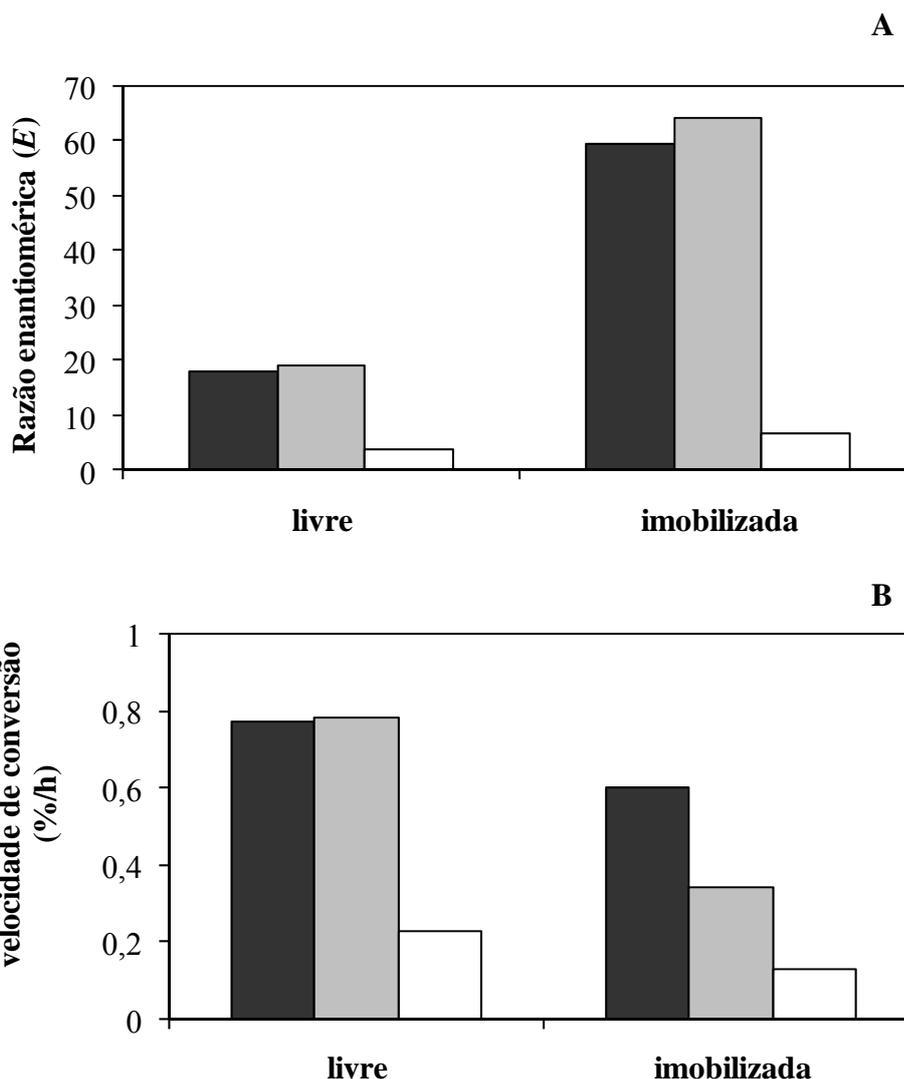


FIGURA 5.4 - Influência da imobilização na razão enantiomérica (A) e velocidade de conversão (B) na resolução cinética de alcoóis alílicos secundários catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições reacionais: enzima (450 U); substratos (0,5 mmol): 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac-1*, cinza), *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac-2*, preto) e 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac-4*, branco); 22 mmol de doador de acila - acetato de vinila; hexano; 37°C; 180 rpm.

Como pode ser observado na FIGURA 5.4 A, a imobilização da enzima aumentou de 1,8 a 3,4 vezes o valor de *E* para os substratos *rac-4* (4 para 7), *rac-2* (18 para 60) e *rac-1* (19 para 64). Este aumento de *E* com a imobilização já foi reportado na literatura, embora o fenômeno mais comum seja o da redução da enantiosseletividade (CHEN; TSAI, 2000). Yu et al. (2007a) obteve *E* duas vezes maior quando a lipase de *Pseudomonas* sp. foi imobilizada SBA-15 (um suporte à base de sílica) para a resolução de 2-octanol. Em um outro trabalho, o

valor de  $E$  para a hidrólise de mandelato de metila aumentou de 20 para 300 com a imobilização iônica em polietilenimina (PEI) e de 10 para 40 com a imobilização em octyl-sepharose da lipase de *C. rugosa* (PALOMO et al., 2002). Segundo estes autores, este efeito é normalmente atribuído às mudanças conformacionais provocadas pela adsorção no suporte, pelas interações fracas suporte-proteína que afetam a rigidez protéica e o ambiente reacional. Estas alterações na conformação, por sua vez, influenciam as propriedades catalíticas de atividade, especificidade e enantiosseletividade. Em relação à enantiosseletividade, a restrição de mobilidade de enzimas na presença do suporte pode diminuir a reatividade com o enantiômero lento. Este enantiômero é aquele que força seu substituinte maior ligado ao carbono assimétrico (ligado ao grupo hidroxila) a se encaixar na cavidade menor do sítio ativo da enzima, como apresentado na FIGURA 2.10. Com a rigidez protéica quando a enzima é adsorvida no suporte, o enantiômero lento (de reação mais lenta) é mais impedido estericamente de interagir com a enzima. Este fato aumenta, conseqüentemente, a reatividade com o enantiômero rápido (de reação mais rápida), aquele que seu substituinte maior se liga à cavidade maior do sítio ativo, o que aumenta  $E$  (FITZPATRICK; KLIBANOV, 1991).

Em contrapartida, houve redução da velocidade de conversão (%/h) com a imobilização de 56, 22 e 43% para os substratos *rac*-1, 2 e 4, respectivamente (FIGURA 5.4 B). Esta menor velocidade de reação com a enzima imobilizada pode ser devida à menor difusão do substrato na presença do suporte (efeito difusional). Com a enzima imobilizada, a presença do suporte dificulta a agitação do meio reacional, em comparação com utilização de enzima livre no mesmo volume reacional. Outra contribuição para a restrição de difusão neste sistema é que as moléculas do substrato podem ser adsorvidas por interações fracas em poros da superfície do suporte que não contenham enzimas, diminuindo a concentração de substrato no meio reacional, acarretando em diminuição da velocidade de conversão. A adsorção do substrato no suporte já foi descrita como sendo mais pronunciada quando o material é hidrofóbico e poroso, como o Accurel (SABBANI et al., 2006; SALIS et al., 2003). Além disso, a redução na flexibilidade provocada pela imobilização pode não somente afetar a enantiosseletividade, como também resulta em uma energia de ativação maior para a reação, com conseqüente redução na eficiência de catálise (BAYRAMOGLU et al., 2004).

Considerando que o critério mais importante na resolução é uma alta enantiosseletividade, a preparação imobilizada foi selecionada para avaliar os efeitos dos outros fatores que afetam  $E$ , apesar da diminuição da velocidade de conversão. Além disso,

são reconhecidas as vantagens da utilização de enzimas imobilizadas: possibilidade de realizar processos contínuos, a facilidade em separar o biocatalisador do produto de reação e a possibilidade de reciclagem da enzima, o que aumenta a viabilidade econômica dos processos biocatalíticos que utilizam esta preparação (SALIS et al., 2003).

### 5.3.2 Efeito da temperatura

Diferentes reações catalisadas pela mesma enzima geralmente possuem diferentes energias de ativação e a seletividade enzimática pode depender, portanto, da temperatura, uma vez que a energia de ativação varia com a temperatura (PERSSON et al., 2002a). Para avaliar este efeito na resolução de álcoois alílicos secundários, *rac*-1, 2, 3 e 4 foram submetidos à reação de transesterificação com acetato de vinila catalisada pela lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada e os resultados de velocidade de conversão (FIGURA 5.5) e razão enantiomérica (FIGURA 5.6) foram avaliados.

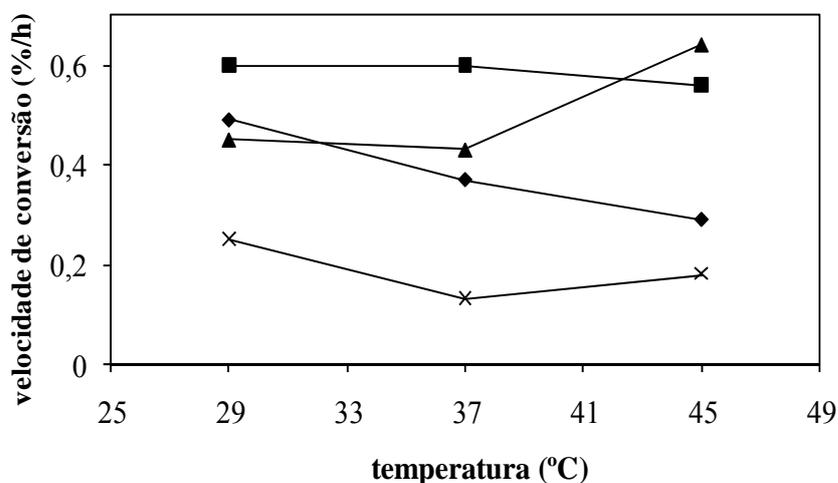


FIGURA 5.5 - Influência da temperatura na velocidade de conversão (%/h) da resolução cinética catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel MP1000<sup>®</sup>. Condições reacionais: enzima (450 U); 22 mmol de doador de acila – acetato de vinila; substratos (0,5 mmol de cada): 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac*-1, ◆) e *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2, ■), (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (*rac*-3, ▲) e 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac*-4, x); hexano; 180 rpm.

A FIGURA 5.5 mostra que o efeito da temperatura na velocidade de conversão depende de substrato utilizado. Com o substrato *rac*-3 houve aumento da velocidade da

reação entre 37 e 45°C. Este aumento pode ser explicado pelo aumento do número de colisões entre as moléculas de substrato e enzima, com aumento da velocidade da formação de complexo enzima-substrato quando a temperatura da reação é elevada. A diminuição gradativa da velocidade de conversão com o aumento da temperatura para os substratos *rac-1* (perda de 41% com aumento de 16 °C) e *rac-4* (perda de 48% com a variação da temperatura de 29 para 37°C) pode ter ocorrido pelo rompimento das interações intramoleculares não-covalentes induzidas pelas vibrações térmicas, que pode afetar a conformação enzimática. Esta alteração conformacional pode ter ocorrido de forma que a proteína assumia outra conformação que tenha uma atividade menor, como sugerido por Yu et al. (2007a) para explicar a diminuição na velocidade de conversão a partir de 40°C para a reação de hidrólise de acetato de mentila catalisada pela lipase de *B. cepacia* ATCC 25416. Para o substrato *rac-2*, pode-se considerar que não houve variação de velocidade de conversão entre 29 e 45°C, assim como ocorreu para o substrato *rac-4* de 37 a 45°C. A manutenção da velocidade de conversão com o aumento da temperatura também foi reportada para a reação de transesterificação do álcool benzílico com acetato de vinila catalisada pela lipase de *P. cepacia* MTCC 5113 entre as temperaturas 30 a 60°C (SINGH et al., 2008). O substrato *rac-2* proporcionou maior estabilidade da enzima tanto para o efeito da temperatura quanto para o efeito da imobilização (FIGURA 5.4 B), com a velocidade de conversão mantendo-se praticamente constante com a variação da temperatura. O aspecto da estabilidade enzimática pode ser considerado pois a determinação da velocidade de conversão é baseada em uma média de conversão (%/h) em até 72 h de reação para este substrato.

Para a lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel, o efeito da temperatura na enantiosseletividade também dependeu do substrato, dentro do intervalo de 29 a 45°C (FIGURA 5.6). O valor de *E* diminuiu com o aumento da temperatura para os substratos *rac-2* e 3 (aproximadamente 55%), aumentou com o substrato *rac-4* (aproximadamente três vezes) e apresentou o maior valor para a temperatura de 37°C com o substrato *rac-1*.

No que diz respeito à enantiosseletividade de lipases, para a maioria dos trabalhos na literatura, seu aumento está relacionado com a diminuição da temperatura de reação (WANG et al., 2008a; SAKAI, 2004; CHEN; TSAI, 2000). Entretanto, existem exemplos para os quais a enantiosseletividade aumenta com o aumento da temperatura (PERSSON et al., 2002a).

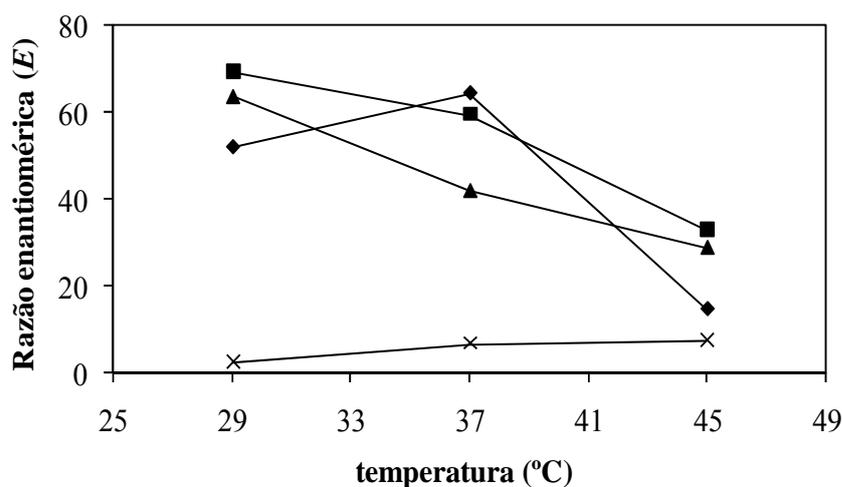


FIGURA 5.6 - Influência da temperatura na enantiosseletividade da resolução cinética catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel MP1000<sup>®</sup>. Condições reacionais: enzima (450 U); 22 mmol de doador de acila – acetato de vinila; substratos: 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac*-1, ◆) e *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2, ■), (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (*rac*-3, ▲) e 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac*-4, x); hexano; 180 rpm.

Para explicar a dependência do substrato para o valor de  $E$  da enzima com o aumento da temperatura, no presente trabalho foram feitas análises termodinâmicas, baseadas nas análises de Phillips (1996), que estudou o efeito da temperatura na oxidação de álcoois racêmicos catalisada por uma álcool desidrogenase. Estas análises estão descritas a seguir.

Sabendo que a razão enantiomérica ( $E$ ) depende da variação da energia livre diferencial de ativação, como descrito pela Equação 2.2, podemos escrever que:

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln E \quad (5.1)$$

onde  $R$  é a constante dos gases com valor de 8,31 J/mol.K e  $T$  é a temperatura em K (Kelvin).

$\Delta\Delta G^\ddagger$ , por sua vez, pode ser descrito em termos de dois outros fatores termodinâmicos. O primeiro fator é a diferença na entalpia de ativação entre os dois enantiômeros. Esta diferença é chamada de entalpia diferencial de ativação e é representada por  $\Delta\Delta H^\ddagger$ . O segundo fator envolve a diferença na entropia de ativação entre os dois enantiômeros. Esta diferença, assim como a anterior, é chamada de entropia diferencial de ativação e é representada por  $\Delta\Delta S^\ddagger$ . A relação dos fatores com  $\Delta\Delta G^\ddagger$  é dada por Equação 5.2:

$$\Delta\Delta G^\ddagger = \Delta\Delta H^\ddagger - T.\Delta\Delta S^\ddagger \quad (5.2)$$

Desta forma, pode-se relacionar os parâmetros termodinâmicos com a razão enantiomérica pela Equação 5.3:

$$\ln E = \frac{\Delta\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (5.3)$$

onde  $\ln E$  corresponde ao logaritmo neperiano de  $E$ .

A Equação (5.3) representa a equação de uma reta, com coeficiente angular de  $\Delta\Delta H^\ddagger/R$  e coeficiente linear de  $\Delta\Delta S^\ddagger/R$ . A FIGURA 5.6 apresenta o gráfico  $\ln E$  versus  $1/T$  para os vários substratos estudados no presente trabalho.

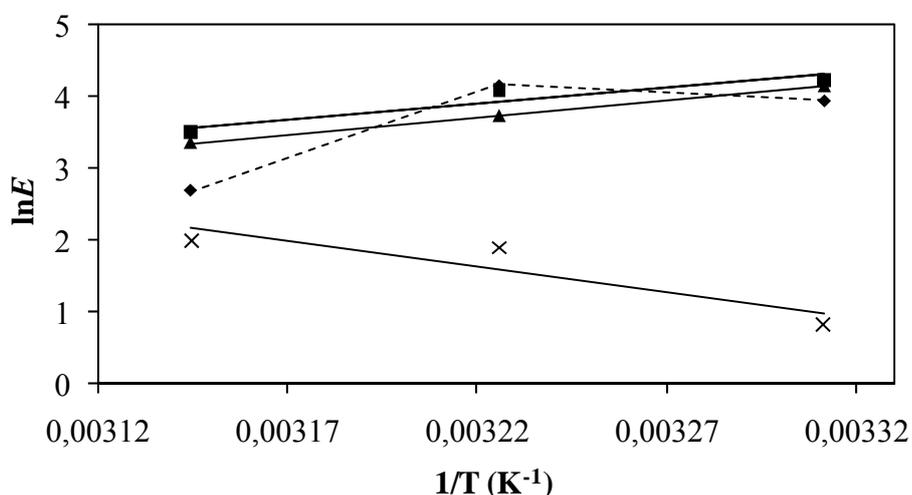


FIGURA 5.7 - Correlação entre  $\ln E$  (logaritmo neperiano de  $E$ ) e  $1/T$  ( $K^{-1}$ ) para a resolução dos substratos: 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac*-1, ◆) e *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2, ■), (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (*rac*-3, ▲) e 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac*-4, x).

A partir destes parâmetros termodinâmicos, é possível determinar a temperatura na qual não existe enantiosseletividade para cada substrato. Nesta temperatura, os efeitos de entalpia e entropia são cancelados e o valor de  $E$  é igual a 1. Matematicamente, esta temperatura corresponde ao intercepto da linha na abscissa. Esta temperatura é a chamada temperatura racêmica e é definida como (Equação 5.4):

$$T_r = \frac{\Delta\Delta H^\ddagger}{\Delta\Delta S^\ddagger} \quad (5.4)$$

Dependendo se a reação ocorre acima ou abaixo desta temperatura racêmica, uma diminuição da temperatura reacional causará uma diminuição ou um aumento na enantiosseletividade (PERSSON et al., 2002a).

Os parâmetros termodinâmicos,  $\Delta\Delta G^\ddagger$  a 29°C (302 K),  $\Delta\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta\Delta S^\ddagger$ , as temperaturas racêmicas ( $T_r$ ) e o valor de  $E$  também a 29°C estimados para os substratos *rac*-2, 3 e 4 estão apresentadas na TABELA 5.6.

TABELA 5.6 - Parâmetros termodinâmicos para a resolução dos álcoois alílicos secundários *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2), (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (*rac*-3) e 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac*-4) catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel.

<i>substrato</i>	<i>E</i> 302 K	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol) 302 K	$\Delta\Delta H^\ddagger$ (kJ/mol)	$T\Delta\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol) 302 K	$\Delta\Delta S^\ddagger$ (J/mol.K)	$T_r$ (°C)
<i>rac</i> -2	69,4	-10,8	-37,2	-26,4	-87,3	153,1
<i>rac</i> -3	63,6	-10,4	-39,9	-29,5	-97,5	135,8
<i>rac</i> -4	2,3	-2,5	58,7	61,2	202,5	16,8

\*Condições reacionais: 450 U de enzima imobilizada; 0,5 mmol de cada substrato; 22 mmol de doador de acila – acetato de vinila; hexano.

$\Delta\Delta G^\ddagger$  (kJ/mol) = energia livre diferencial de ativação

$\Delta\Delta H^\ddagger$  (kJ/mol) = entalpia diferencial de ativação

$\Delta\Delta S^\ddagger$  (J/mol.K) = entropia diferencial de ativação

$T_r$  = temperatura racêmica

Em geral, as contribuições da entalpia e da entropia se contrapõem, sendo ambas positivas ou negativas. Assim, o enantiômero favorecido por entalpia é desfavorecido por entropia e vice-versa (GHANEM, 2007).

Para os três substratos, foi observada uma significativa contribuição da entropia diferencial de ativação. De fato, o termo entrópico ( $T\Delta\Delta S^\ddagger$ ) foi aproximadamente 70% do termo entálpico ( $\Delta\Delta H^\ddagger$ ) em  $\Delta\Delta G^\ddagger$  para *rac*-2 e 3. Os resultados indicam que a enantiosseletividade da lipase (representada por  $E$ ) para os substratos *rac*-2 e 3 é governada pela diferença de entalpia de ativação, dados os maiores valores absolutos, que se origina da diferença das interações estéricas e eletrônicas entre os enantiômeros rápido ( $R$ ) e lento ( $S$ ) no estado de transição. Estas interações são dependentes tanto da enzima quanto do solvente utilizado (GHANEM, 2007; SAKAI, 2004).

Por outro lado, para o substrato *rac*-4, pode-se considerar que a enantiosseletividade é governada tanto pela diferença de entalpia na ativação quanto pela diferença de entropia na ativação, já que o termo entrópico foi quase igual ao termo entálpico. A diferença na entropia

de ativação está associada às mudanças conformacionais, que envolvem a organização das moléculas, durante o ajuste do substrato no sítio ativo. A enantiosseletividade da lipase por este substrato é, portanto, dependente tanto das diferenças interações estéricas e eletrônicas, quanto das diferenças entre os graus de liberdade conformacional dos enantiômeros no sítio ativo da enzima (GHANEM, 2007; FABER, 2000).

Como apresentado na FIGURA 5.6 e TABELA 5.6, abaixo da temperatura racêmica ( $T_r$ ), o maior termo na energia livre diferencial é a entalpia (Equações 5.2 e 5.3) e a enzima catalisa uma reação com, preferencialmente, o enantiômero favorecido por este termo e, desta forma, a enantiosseletividade diminui com o aumento da temperatura. Diferentemente, acima da  $T_r$ , a maior contribuição para a energia livre diferencial é a entropia e a enantiosseletividade é pelo enantiômero favorecido por este parâmetro, ocorrendo aumento de  $E$  com aumento da temperatura. Ambos os fenômenos já são bem descritos na literatura (GHANEM, 2007). Em outras palavras, para os substratos em que as reações ocorreram abaixo de sua  $T_r$  (*rac*-2 e 3, cujos valores de  $T_r$  são 153 e 136 °C, respectivamente), com o aumento da temperatura ocorre diminuição da enantiosseletividade. Contrariamente, com o substrato *rac*-4 ocorre aumento da enantiosseletividade com o aumento da temperatura, pois as temperaturas avaliadas estão acima da  $T_r$  calculada (16,8 °C).

Estes parâmetros termodinâmicos não puderam ser determinados para o substrato *rac*-1, já que uma das temperaturas estudadas, 37°C, foi aparentemente a temperatura de inversão ( $T_{inv}$ ), pois até este ponto existiu aumento da enantiosseletividade com o aumento da temperatura e, a partir deste, ocorreu diminuição da enantiosseletividade em relação à temperatura de 29°C. Sakai (2004) e Cainelli et al. (2003) sugeriram que este efeito da temperatura de inversão depende das interações enzima-substratos. Estas interações são diferentes para cada complexo enzima-substrato, abaixo e acima da  $T_{inv}$ . Em temperaturas abaixo da  $T_{inv}$ , o valor de  $\Delta\Delta G^\ddagger$  para a reação com cada enantiômero é maior do que este valor em temperaturas acima da  $T_{inv}$  (CAINELLI et al., 2003).

### 5.3.3 Efeito da quantidade de enzima

Para avaliar os efeitos da quantidade de enzima e do solvente na enantiosseletividade, foi escolhido o substrato (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2). Este foi o substrato que apresentou o mais alto valor de *E* e de velocidade de conversão a 29°C e também apresentou um possível efeito protetor da atividade enzimática, tanto nos estudos de imobilização quanto nos de temperatura, com diminuição de 22% com a imobilização e manutenção de velocidade de conversão em todas as temperaturas avaliadas.

Com a finalidade de avaliar a influência da quantidade de enzima no meio reacional na velocidade de conversão, diferentes quantidades de enzima (em unidades determinadas pelo método de hidrólise do *p*NPP, item 4.5.1.1) foram adicionadas ao meio reacional para a resolução cinética de (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol a 29°C (FIGURA 5.7 e 5.8).

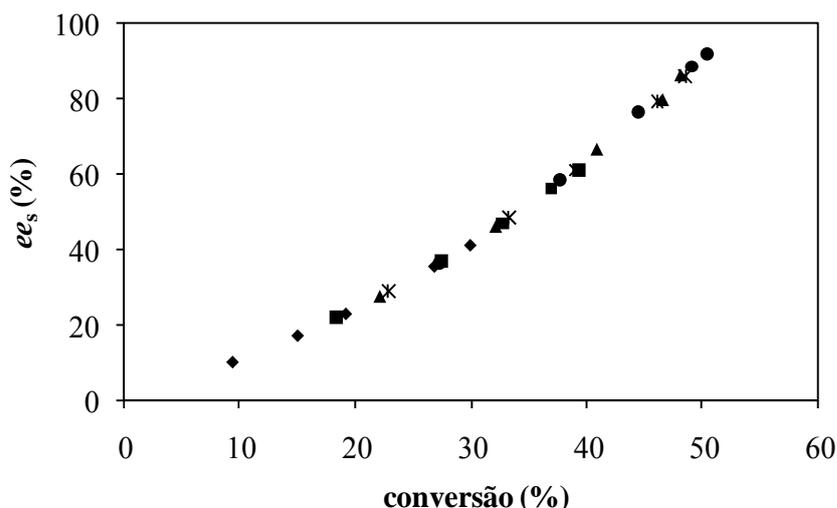


FIGURA 5.8 - Relação entre excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$ ) e conversão (%) com diferentes quantidades da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel no meio reacional. Condições reacionais: 0,5 mmol de *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2, substrato); 22 mmol de doador de acila – acetato de vinila; hexano; 29°C; 180 rpm. Quantidade de enzima (U) imobilizada: 250 (◆), 450 (■), 675 (▲), 900 (\*) e 1350 (●).

A FIGURA 5.8 mostra que a quantidade da enzima imobilizada adicionada à reação não influenciou a enantiosseletividade. Isto pode ser percebido pelo fato das relações entre porcentagem de excesso enantiomérico de substrato ( $ee_s$ ) e conversão (%) terem sido sobrepostas para as quantidades de enzima utilizadas. Se a quantidade de enzima tivesse

influenciado a enantiosseletividade, a sobreposição não teria acontecido. Isto já é esperado, porque a enantiosseletividade é uma propriedade da enzima em si e não deve ser influenciada pela quantidade de enzima adicionada ao meio reacional, a menos que grandes quantidades de enzima provoquem perturbações no sistema que sejam capazes de causar alterações conformacionais na proteína (STRAATHOF; JONGEJAN, 1997).

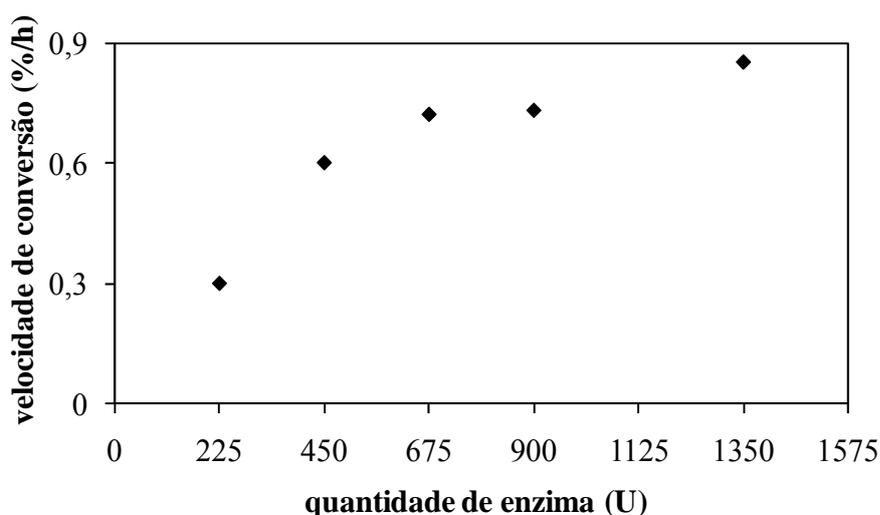


FIGURA 5.9 - Influência da quantidade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel no meio reacional enzima imobilizada no meio reacional na velocidade de conversão (%/h) do *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2). Condições reacionais: 0,5 mmol de substrato; 22 mmol de doador de acila – acetato de vinila; hexano ; 29°C; 180 rpm.

O aumento da quantidade de enzima aumentou a velocidade da reação de 0,3 %/h com 225 U até 0,75 %/h com 675 U (450 mg da lipase imobilizada) no meio reacional; a partir deste ponto, o dobro de quantidade de enzima aumentou apenas 15% a velocidade de conversão. Este resultado pode ser devido ao fato que grandes quantidades de suporte diminuíram a eficiência da agitação do meio. Além disso, ainda existe o efeito difusional causado na presença de suporte. Como resultado, na presença de menores quantidades de suporte, a difusão do substrato é mais favorecida pela agitação do meio. A partir destes resultados, o próximo efeito foi avaliado com a quantidade de enzima correspondente a 675 U, embora tenha ocorrido aumento de 1,25 vezes na velocidade de conversão com o aumento de 1,5 vezes na quantidade de enzima utilizada de 450 U (quantidade utilizada nas reações anteriores) para 675 U. Esta diferença de 17% de 0,75 %/h em relação a 0,9 %/h, que seria o

esperado para uma relação linear com a 675 U de enzima, sugere que algum efeito difusional do substrato ocorreu, ainda que não tenha sido tão aparente para que esta quantidade seja descartada.

### 5.3.4 Efeito do solvente no meio reacional

#### 5.3.4.1 Efeito do tratamento prévio do solvente com peneira molecular

Até este ponto do trabalho, os solventes utilizados não recebiam nenhum tipo de tratamento prévio para retirada da água residual. Entretanto, em experimentos nos quais quantidades controladas de água foram adicionadas ao meio reacional, foi mostrado que a enantiosseletividade é afetada pela presença desta água (GOSWAMI; GOSWAMI, 2005). Baseado nisso, foi feito um estudo preliminar para avaliar se a hidratação dos solventes tinha influência na enantiosseletividade enzimática. Para isso, foi realizado um tratamento prévio dos solventes com peneira molecular 4A antes da realização da resolução de (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (FIGURA 5.10).

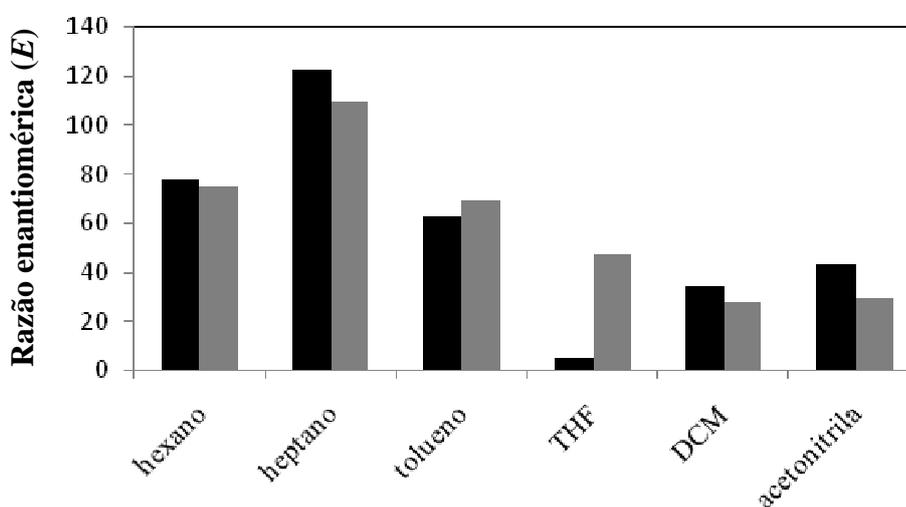


FIGURA 5.10 - Razão enantiomérica da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel na transesterificação de (*R,S*)- *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol em diferentes solventes orgânicos: tratados (cinza) ou não (preto) com peneira molecular 4A por 48 h. Condições reacionais: 0,5 mmol de substrato; 22 mmol de doador de acila – acetato de vinila; 29°C; solventes: hexano, heptano, tolueno, THF (tetrahydrofurano), DCM (diclorometano) e acetoneitrila.

A presença de água interferiu no valor de  $E$  da lipase, negativa ou positivamente, dependendo do solvente:  $E$  aumentou ligeiramente (10%, em média) para os solventes heptano, hexano, DCM e acetonitrila. Para tolueno e THF, o efeito foi contrário, ou seja, houve uma diminuição de  $E$  com a retirada da água, sendo mais pronunciado para THF, onde aumentou em aproximadamente 10 vezes a enantiosseletividade (FIGURA 5.10).

Para prevenir interferências de reações hidrolíticas e como forma de padronização dos solventes para as reações, o tratamento prévio dos solventes com peneira molecular foi utilizado para o estudo do efeito dos solventes que está apresentado no próximo item.

#### 5.3.4.2 Comparação entre solventes orgânicos para a resolução cinética

Solventes orgânicos têm sido utilizados como meios reacionais para biotransformações enzimáticas em inúmeros processos de síntese orgânica. As seletividades das enzimas, incluindo enantio, regio e quimiosseletividades, são alteradas em diferentes solventes o que normalmente é atribuído às modificações das conformações da enzima (alteração de estrutura e flexibilidade) causadas pelo estabelecimento de diferentes tipos de interações enzima-solvente (SHEN et al., 2008).

Diferentes solventes orgânicos, os mesmos para os quais foi realizada a estabilidade enzimática (item 5.1.3), foram utilizados como meio reacional para a transesterificação de (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) com acetato de vinila catalisada pela lipase. Para avaliar a influência do solvente na resolução cinética foram utilizados os parâmetros de enantiosseletividade e velocidade de conversão (TABELA 5.7).

TABELA 5.7 - Razão enantiomérica (*E*) e velocidade de conversão da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel na transesterificação de (*R,S*)- *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol em diferentes solventes orgânicos.

<i>Solvente orgânico</i>	<i>Razão enantiomérica</i> ( <i>E</i> )	<i>Velocidade de Conversão</i> (%/h)
Acetonitrila	30 ± 2	0,24 ± 0,01
Diclorometano	28 ± 13	0,21 ± 0,11
Heptano	110 ± 24	0,71 ± 0,08
Hexano	75 ± 2	0,87 ± 0,09
Tetrahidrofurano	47 ± 20	0,14 ± 0,02
Tolueno	69 ± 11	0,30 ± 0,02

\* Condições reacionais: 675 U de enzima imobilizada; 0,5 mmol de substrato; 22 mmol de doador de acila – acetato de vinila; solventes mantidos em peneira molecular 4A; 29°C; 180 rpm.

A TABELA 5.7 mostra que o solvente utilizado na reação afeta intensamente tanto a velocidade de conversão quanto a enantiosseletividade da lipase estudada. Os melhores resultados, quando são levados em consideração ambos os parâmetros, foram obtidos para os solventes apolares heptano [ $E = 110$ ,  $c = 0,71$  (%/h)] e hexano [ $E = 75$ ,  $c = 0,87$  (%/h)]. Quando foram utilizados solventes polares, como acetonitrila, diclorometano, tetrahidrofurano e tolueno, tanto a velocidade de conversão quanto o valor de  $E$  foram menores quando comparados com os solventes apolares, com redução de aproximadamente 80% na velocidade de conversão em relação ao hexano. Estas diminuições de velocidade de conversão de  $E$  podem ser explicadas, preliminarmente, pela diferença de polaridade dos solventes. A maior afinidade da água de hidratação da estrutura protéica pelos solventes polares do que pela enzima faz com que esta água residual seja retirada. Na retirada desta água residual pode haver alteração da conformação nativa da enzima, que afeta sua atividade e seletividade (SHEN et al., 2008; CHUA; SARMIDI, 2006).

Para explorar possíveis correlações entre a enantiosseletividade e os parâmetros do solvente, os valores de  $E$  obtidos foram investigados em função das propriedades físico-químicas de log P (A), constante dielétrica (B) e volume molecular (C) de cada solvente (FIGURA 5.11).

A FIGURA 5.11 mostra que o valor de  $E$  está correlacionado com as três propriedades físico-químicas dos solventes utilizados e que os melhores solventes para a reação

enantiosseletiva foram heptano, hexano e tolueno. O valor de  $E$  foi correlacionado positivamente ao valor de  $\log P$  e com o volume molecular dos solventes, com os maiores valores ( $E \cong 100$ ) obtidos para  $\log P = 4$  e volume molecular de  $243,4 \text{ \AA}^3$ , correspondentes ao heptano (FIGURA 5.11A,C). Já para a constante dielétrica, a correlação foi inversa, ou seja, ocorreu uma diminuição de  $E$  com o aumento dos valores deste parâmetro (5.11B). Os parágrafos a seguir exploram cada uma destas correlações, separadamente.

Dentre os parâmetros que são usados para caracterizar as propriedades físico-químicas dos solventes, o  $\log P$  é o mais utilizado para a escolha do solvente. Primeiro, porque este parâmetro é uma medida direta da hidrofobicidade; segundo, porque seu valor pode ser facilmente determinado por método padrão ou calculado com base nas constantes hidrofóbicas tabeladas; e terceiro, devido à sua sensibilidade a pequenas diferenças de polaridade das moléculas (CHUA; SARMIDI, 2006).

A FIGURA 5.11A mostra que a relação entre  $E$  e valor de  $\log P$  do solvente utilizado possui duas regiões: (1) em solvente com  $\log P$  abaixo de 2 (polares) houve pouca influência na enantiosseletividade e (2) em solventes com  $\log P$  acima de 2 ( $\log P$  2,5 a 4,0) pode ser observada uma correlação positiva com  $E$ . A manutenção de valores baixos de  $E$  em solventes com  $\log P$  -0,33 (acetonitrila), 0,5 (tetrahidrofurano) e 1,0 (diclorometano) pode ser devida à perda de conformação nativa da enzima, conforme anteriormente explicado, o que explica a baixa enantiosseletividade nos solventes polares (CHUA; SARMIDI, 2006). A correlação positiva na região de  $\log P$  acima de 2 também foi apresentada por algumas resoluções cinéticas catalisadas por lipases em sistemas com diferentes substratos e condições reacionais (YU et al., 2007a; SINGH; BANERJEE, 2007; HIRAKAWA et al., 2005; CERNIA et al., 1998). Esta correlação significa que um aumento da hidrofobicidade do solvente favoreceu a ligação do enantiômero rápido ( $R$ ) no sítio ativo da enzima. Este resultado está de acordo com a regra proposta por Chen e Sih (1989), que concluíram que solventes com  $\log P$  acima de 2 favorecem uma alta enantiosseletividade. Segundo esta regra, se solventes fortemente hidrofóbicos (com  $\log P$  acima de 4) tivessem sido utilizados neste presente trabalho,  $E$  teria sido maior ainda.

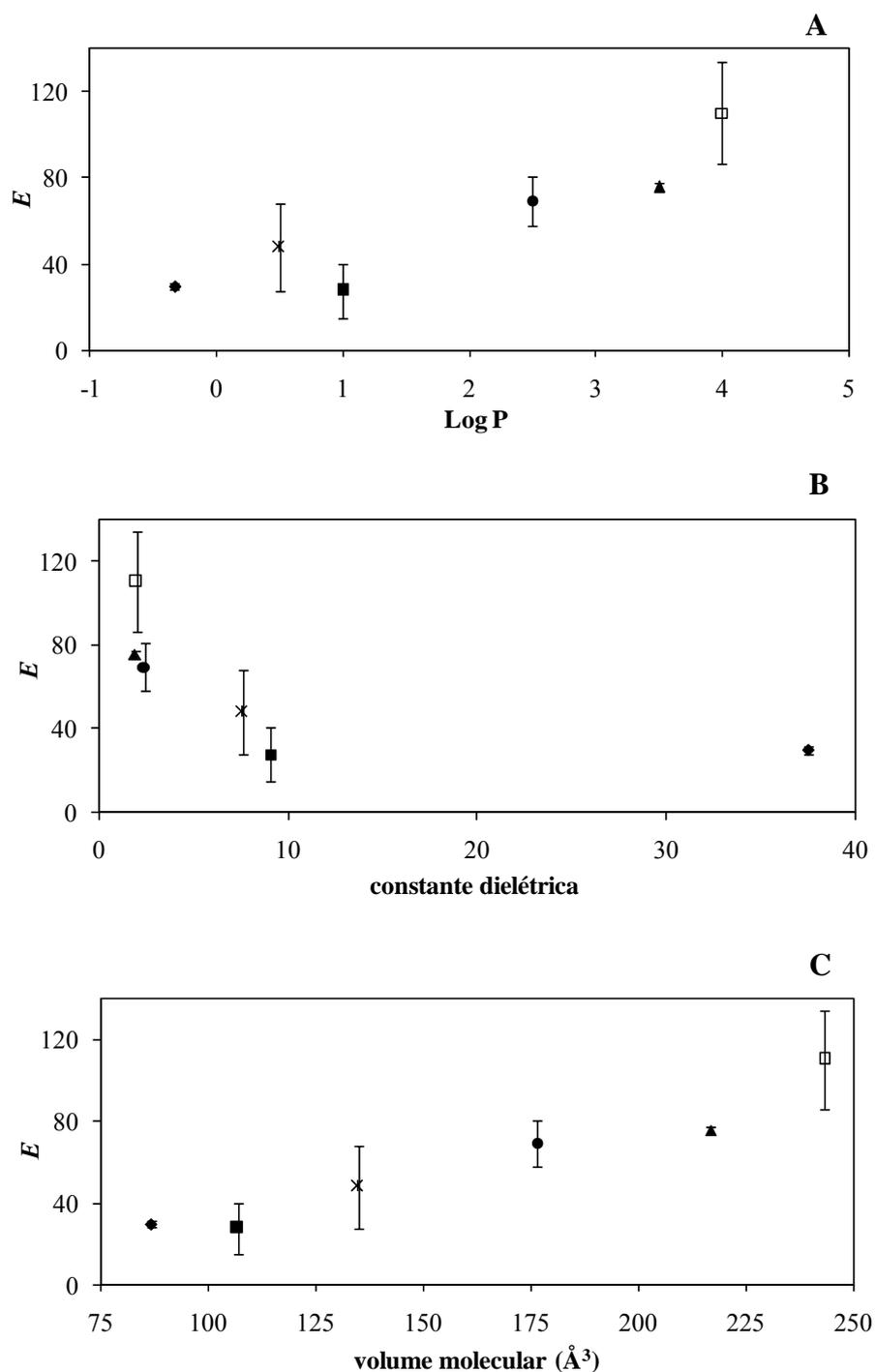


FIGURA 5.11 - Efeito das características físico-químicas do solvente orgânico na enantiosseletividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 na resolução de (*R,S*)- *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) em relação ao log P (A), constante dielétrica (B) e volume molecular (C) dos solventes utilizados: acetonitrila (♦), tetrahidrofurano (\*), diclorometano (■), tolueno (●), hexano (▲) e heptano (□). Condições reacionais: 675 U de enzima imobilizada; 0,5 mmol de substrato; 22 mmol de doador de acila – acetato de vinila; 29°C; 180 rpm.

A FIGURA 5.11B mostra que a enantiosseletividade ( $E$ ) da lipase de *B. cepacia* imobilizada diminui com o aumento na constante dielétrica dos solventes, mas com uma característica hiperbólica, diferente das relações observadas para outros dois parâmetros. O intervalo de constante dielétrica que proporcionou as maiores enantiosseletividades foi de 1,9 a 2,4, que inclui os solventes heptano, hexano e tolueno. Em relação ao heptano (constante dielétrica 2) houve, em média, perda de 50% no valor de  $E$  na presença do solvente com constante dielétrica de 7,6 (tetrahidrofurano) e esta perda foi mais pronunciada a partir da constante dielétrica de 9, correspondente ao diclorometano (75%), mesma redução ocorrida com acetonitrila (37,5).

Esta correlação inversa entre  $E$  e a constante dielétrica dos solventes também foi encontrada por Fitzpatrick e Klibanov (1991) na transesterificação do álcool *sec*-fenetil com butirato de vinila catalisada pela subtilisina Carlsberg (tipo VIII do *Bacillus licheniformis*). Os autores afirmaram que esta correlação é devida à alta rigidez conformacional da enzima em solventes com baixa constante dielétrica. Esta alta rigidez protéica é atribuída às interações intramoleculares proteína-proteína mais fortes (pelo aumento da força de atração entre resíduos de aminoácidos com cargas opostas) do que em água como solvente. A força destas interações é inversamente proporcional à constante dielétrica dos solventes, como pode ser observado pela Equação de Coulomb (Eq. 5.5):

$$F = \frac{(q_1 q_2)}{D r^2} \quad (5.5)$$

onde  $F$  é a força de atração,  $q_1$  e  $q_2$  são as cargas com sinais opostos,  $D$  é a constante dielétrica do meio no espaço entre as cargas e  $r$  é a distância entre as cargas. Se as cargas forem de mesmo sinal,  $F$  será de repulsão.

Com a maior força de interação eletrostática entre as cargas opostas em solventes com baixa constante dielétrica, maior a rigidez protéica. Por outro lado, em solventes com alta constante dielétrica, esta força de atração é menor, o que aumenta a flexibilidade da proteína (TOUKONIITTY et al., 2003). Este aumento da flexibilidade enzimática pode explicar a diminuição da enantiosseletividade. Com maior flexibilidade protéica, a cavidade menor do sítio ativo, que liga preferencialmente o substituinte menor do enantiômero ( $R$ ) e liga o substituinte maior do enantiômero ( $S$ ) com dificuldade (FIGURA 2.10, p. 28), estará mais relaxada. Este relaxamento protéico permite melhor interação com o substituinte maior do enantiômero ( $S$ ), o que resulta em menor enantiosseletividade.

Uma explicação para a relação entre enantiosseletividade e constante dielétrica foi sugerida por Peters e Bywater (1999) e por Bürgi e Baiker (1998). Nesta explicação, o aumento na força das interações proteína-proteína em solventes de baixa constante dielétrica favorece a abertura da tampa hidrofóbica da lipase e a manutenção da conformação aberta. Estes autores sugeriram que, com a manutenção desta conformação enzimática, a enzima fica menos flexível, dificultando, desta maneira, a entrada do substituinte maior do enantiômero (*S*) dentro da cavidade menor do sítio ativo.

Como apresentado na FIGURA 5.11C, a enantiosseletividade da lipase em estudo está correlacionado com, além das outras duas características dos solventes, o tamanho da molécula de solvente, para o qual foi obtida uma correlação positiva. Esta correlação positiva também foi obtida para lipase B de *C. antarctica* por Ottonson e col. (2002) para a resolução de 3-metil-2-butanol em diferentes solventes orgânicos. Em outro trabalho, esta correlação foi inversa para a enantiosseletividade da lipase termofílica (QLM) na resolução de 2-octanol (WANG et al., 2008a). Segundo estes autores, o tamanho da molécula de solvente influencia no grau de liberdade conformacional do substrato no sítio ativo da enzima. Esta explicação não pode ser extrapolada para os resultados obtidos no presente trabalho, pois está baseada na maior contribuição da entropia para a enantiosseletividade, que foi o caso para os trabalhos citados acima, mas não para o substrato usado no presente trabalho, onde a entropia não foi o efeito predominante (item 5.3.2). Para a resolução de (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) catalisada pela lipase de *B. cepacia* em hexano, a maior contribuição em *E* foi da entalpia diferencial de ativação (TABELA 5.6). Seguindo o mesmo raciocínio que os autores propuseram e extrapolando esta maior contribuição da entropia para os outros solventes, pode ser possível explicar, empiricamente, que o tamanho da molécula de solvente influenciou de forma direta na diferença das interações estéricas e eletrônicas entre os enantiômeros no sítio ativo da enzima. O aumento do tamanho da molécula de solvente aumentou a diferença da entalpia de ativação para o estado de transição de cada enantiômero ( $\Delta\Delta H^\ddagger$ ), o que causa um aumento de *E*. Este efeito pode estar relacionado com a estrutura dos solventes. Nakamura et al. (1995) sugeriram que aqueles solventes que têm suas moléculas mais facilmente incorporadas nas cavidades do sítio ativo tendem a retardar mais a velocidade de ligação efetiva do enantiômero lento. Segundo os resultados obtidos por estes autores com a lipase de *P. cepacia* (Amano) na transesterificação do sulcatol, a enantiosseletividade foi maior em solvente lineares do que em ramificados ou cíclicos. Para os resultados obtidos no presente

trabalho, uma provável explicação seria que as moléculas com maior volume molecular estariam sendo incorporadas mais facilmente no sítio ativo da enzima, impedindo a entrada do substituinte maior do enantiômero (*S*) na cavidade menor do substrato, diminuindo, por sua vez, a reatividade com este enantiômero. Este impedimento do maior substituinte de *S* é estérico, pelo grande tamanho da molécula de solvente, e eletrônico pela repulsão de cargas de mesmo sinal, já que estes solventes também possuem baixas constantes dielétricas. Desta maneira o substituinte menor do enantiômero (*R*) teria maior facilidade para o encaixe nesta cavidade menor, o que aumentaria a enantiosseletividade enzimática em solventes com maior tamanho molecular.

Com estes resultados, pode-se concluir que a enantiosseletividade da lipase na resolução de *rac-2* foi correlacionada pela hidrofobicidade do solvente, pelas interações proteína-proteína e pelo tamanho da molécula de solvente. Embora seja improvável que estas propriedades dos solventes atuem independentemente para afetar *E*, uma hipótese para integrar os resultados obtidos pela FIGURA 5.11 A, B e C é difícil por, principalmente dois motivos. Primeiro, nenhum outro trabalho apresentou correlações com as três propriedades enzimáticas. Segundo, é um sistema complexo e pode ter influência de outras propriedades dos solventes que não foram consideradas. Portanto, qualquer associação que possa ser feita para correlacionar *E* com estas três propriedades conjuntamente é meramente especulativa.

A partir dos resultados do efeito do solvente na enantiosseletividade e velocidade de conversão e ainda considerando a estabilidade desta enzima nestes solventes (FIGURA 5.1), o hexano pode ser considerado o melhor solvente para a resolução de (*R,S*)- *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac-2*). Embora a maior enantiosseletividade tenha ocorrido com o heptano, as reações realizadas com este solvente apresentaram um maior erro nas repetições (desvio padrão de aproximadamente 20) e velocidades de conversão menores (20%) do que com hexano. Além disso, em síntese orgânica, o hexano é mais utilizado que o heptano pelo seu ponto de ebulição ser mais baixo (69 °C para o hexano e 98°C para heptano), o que facilita a separação e purificação do produto.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- A lipase de *B. cepacia* LTEB11 mostrou-se estável (90%, 12 h) em solventes hidrofóbicos e hidrofílicos com uma ampla faixa de log P (de -0,33 a 4,0).
- A comparação da resolução de álcoois alílicos secundários com grupos substituintes aromáticos ou alifáticos no radical mostrou que a lipase de *B. cepacia* LTEB11 prefere os primeiros. Os melhores resultados obtidos com a lipase imobilizada foram para os substratos *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) e 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac*-1) com valores de razão enantiomérica (*E*), determinados pela equação de Chen et al. (1982) de 55. Para estes substratos, foram obtidas percentagens de conversão em torno de 40% e excessos enantioméricos do produto em torno de 93%, em 120 h de reação.
- Os valores da razão enantiomérica (*E*) foram determinados inicialmente pela equação de Chen et al. (1982), que resultou em valores de *E* que variaram ao longo reação. Foi desenvolvido, então, um novo modelo matemático para determinação de *E*, que se ajustou bem aos dados experimentais. A confiabilidade deste método de modelagem é maior, porque este se baseia na utilização de várias amostras coletadas ao longo da resolução cinética para a determinação de um único valor de *E*, ao contrário da equação de Chen, cuja determinação é pontual.
- A imobilização da lipase de *B. cepacia* LTEB11 em Accurel MP1000<sup>®</sup> aumentou *E* em 2 vezes para o substrato 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac*-4) e 3,5 vezes para os substratos *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) e *m*-metoxifenilprop-2-en-1-ol (*rac*-3), embora tenha diminuído a velocidade de conversão do substrato em relação à preparação livre (de 43, 22 e 56%, respectivamente).
- O aumento da temperatura afetou a enantiosseletividade de forma dependente do substrato: diminuiu *E* para os substratos *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac*-2) e *m*-metoxifenilprop-2-en-1-ol (*rac*-3); e aumentou *E* para o substrato 5-metilhex-1-en-3-ol (*rac*-4). Após o estudo termodinâmico, este efeito foi comprovado pela

determinação da  $T_r$  (temperatura racêmica na qual  $E$  é igual a 1). Para o substrato 1-fenilprop-2-en-1-ol (*rac-1*) houve uma temperatura de inversão em 37°C, pois houve aumento de  $E$  de 29 a 37°C e diminuição até 45°C.

- A quantidade de enzima imobilizada não influenciou na enantiosseletividade enzimática e o aumento de 225 para 675 U aumentou a velocidade de conversão em 2,5 vezes para a reação com *rac-2*.
- O solvente orgânico utilizado no meio reacional afetou tanto a enantiosseletividade enzimática ( $E$ ) quanto a velocidade de conversão. O valor de  $E$ , por sua vez, apresentou correlação positiva com as propriedades de log P e volume molecular e negativa com a constante dielétrica. Considerando-se estabilidade enzimática e a velocidade de conversão, além de  $E$ , o hexano foi o melhor solvente para a catálise enantiosseletiva.
- A melhor condição reacional para a resolução enzimática de 0,5 mmol de (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (*rac-2*) foi definida como: 675 U de lipase imobilizada, 22 mmol de acetato de vinila, hexano, 29°C, 180 rpm. Nesta condição, o valor de  $E$  foi 75 e o rendimento máximo teórico de 50% ocorre em aproximadamente 60 h, tempo baseado na determinação da velocidade de conversão do substrato (0,87 %/h).

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada, pela sua estabilidade em solventes orgânicos hidrofílicos e hidrofóbicos e capacidade de catalisar reações de transesterificação enantiosseletivas com elevados valores de  $E$  com alcoóis alílicos secundários, sugerem que esta lipase tem potencial para aplicação em resolução cinética de alcoóis secundários, substratos de grande versatilidade em síntese química, especialmente na síntese de drogas, fragrâncias e feromônios quirais.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é um trabalho inovador, que obteve resultados com a aplicação enantiosseletiva da lipase de *B. cepacia* LTEB11 na resolução de álcoois alílicos secundários e o estudo da sua enantiosseletividade neste sistema, abrindo novas perspectivas tanto para a utilização desta enzima na resolução de outros substratos quanto para o estudo de outros parâmetros que afetam a enantiosseletividade enzimática. A partir dos resultados obtidos, sugere-se como continuidade deste trabalho:

- O estudo da influência do doador de acila: tipo e concentração. Quanto ao tipo, um doador de acila não-vinílico poderia ser avaliado, como o anidrido succínico. Além disso, já é conhecida a influência da concentração do agente acilante no sistema.
- Determinação da atividade de água ( $a_w$ ) do sistema e a influência deste parâmetro na enantiosseletividade e velocidade de conversão.
- Estudos de reutilização desta lipase na reação otimizada.
- Utilização da lipase para reação de hidrólise dos próprios produtos obtidos por transesterificação para a obtenção, portanto, dos enantiômeros separadamente dos álcoois alílicos secundários.
- Estudo de estabilidade da lipase em outros ambientes aquo-restritos como os líquidos iônicos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, A.; BRENNAN, E.; FUGANTI, C.; GATTI, F.; SERRA, F. Lipase-catalysed preparation of enantiomerically enriched odorants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 33–51, 2004.

ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/Legis/index.htm>. Acesso em 04 jan. 2009.

AL-DURI, B.; YONG, Y. Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 207–215, 2000.

ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDEZ, S.; OOSTERHOUT, D.; PUCCINELLI, D.; CARRIÈRE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 995–1013, 2006.

BARON, A.M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Curitiba, 2008. Dissertação de Doutorado em Química -Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

BARON, A.M.; FRENSCH, G.; SALUM, T.F.C; MARQUES, F.; KRIEGER, N. Enzymatic resolution of allylic alcohols by the lipase of *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on Accurel. **Anais e Sessão de Pôster do XII Brazilian Meeting on Organic Synthesis**. Itapema, SC, Brazil, 2007.

BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 84, p. 591–599, 2004.

BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomolecular Bioengineering**, v. 18, p. 13-22, 2001.

BLASER, H.U.; SPLIDLER, F.; STUDER, M. Enantioselective catalysis in fine chemicals production. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, p. 119-143, 2001.

BORNSCHEUER, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 543–547, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BÜRGI, T.; BAIKER, A. Conformational Behavior of Cinchonidine in Different Solvents: A Combined NMR and *ab Initio* Investigation. **Journal of American Chemistry Society**, v. 120, p. 12920-12926, 1998.

CAHN, R. S.; INGOLD, C. K.; PRELOG, V. Specification of Molecular Chirality. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 5, p. 385-415, 1966.

CAINELLI, G.; GALLETTI, P.; GIACOMINI, D.; GUALANDI, A.; QUINTAVALLA, A. Chemo- and Enzyme-Catalyzed Reactions Revealing a Common Temperature-Dependent Dynamic Solvent Effect on Enantioselectivity. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86, p. 3548-3559, 2003.

CAREY, F.; SUNDBERG, R. **Advanced Organic Chemistry: Structure and Mechanisms**, 5 ed., Springer:Virginia, 2007.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CATONI, E.; CEMIA, E.; PALOCCI, C. Different aspects of 'solvent engineering' in lipase biocatalysed esterifications. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 105, p. 79-86, 1996.

CERNIA, E.; PALOCCI, C.; SORO, S. The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 157-168, 1998.

CHEN, C.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. **Journal of American Chemistry Society**, v. 104, p. 7294-7299, 1982.

CHEN, C.; SIH, C. General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 28, p. 685-707, 1989.

CHEN, C.; WU, S.; GIRDAUKAS, G.; SIH, J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. 2. Enzyme-Catalyzed Esterifications in Water-Organic Solvent Biphasic systems. **Journal of American Chemistry Society**, v. 109, p. 2812-2817, 1987.

CHEN, J.; TSAI, S. Enantioselective Synthesis of (*S*)-Ibuprofen Ester Prodrug in Cyclohexane by *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Accurel MP1000. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 986-992, 2000.

CHOJNACKA, A.; OBARA, R.; WAWRZENCZY, C. Kinetic resolution of racemic secondary aliphatic allylic alcohols in lipase-catalyzed transesterification. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 101-107, 2007.

CHOWDARY; G.V.; PRAPULLA, S.G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 393-397, 2002.

CHUA, L.; SARMIDI, M. Effect of solvent and initial water content on (*R, S*)-1-phenylethanol resolution. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 551-556, 2006.

COSTA, V.; AMORIM, H. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, 1999.

DALBY, P. A. Engineering Enzymes for Biocatalysis. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, p. 1-9, 2007.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLVI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DIAZ, J.C.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

EMA, T.; FUJII, T.; OZAKI, M.; KORENAGA, T.; SAKAI, T. Rational control of enantioselectivity of lipase by site-directed mutagenesis based on the mechanism. **Chemical Communications**, p. 4650-4651, 2005.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4 ed. Springer: Berlin, 2000.

FDA – Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm>. Acesso em 04 jan. 2009.

FITZPATRICK, P.; KLIBANOV, A. How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity? **Journal of American Chemical Society**, v. 113, p. 3166-3171, 1991.

FUKUSAKI, E.; SATODA, S. Application of lipase-catalyzed transformations for the synthesis of insect pheromones and related compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 2, p. 257-269, 1997.

GANDHI, N. Applications of Lipase. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721–1754, 2007.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3331–3351, 2004.

GHANEM, A.; SCHURIG, V. Lipase-catalyzed access to enantiomerically pure (*R*)- and (*S*)-*trans*-4-phenyl-3-butene-2-ol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 57–62, 2003.

GOSWAMI, A.; GOSWAMI, J. DMSO-triggered enhancement of enantioselectivity in Novozymes[435]-catalyzed transesterification of chiral 1-phenylethanol. **Tetrahedron Letters**, v.46, p. 4411-4413, 2005.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 111–120, 2006.

HIRAKAWA, H.; KAMIYA, N.; KAWARABAYASHI, Y.; NAGAMUNE, T. Log P effect of organic solvents on a thermophilic alcohol dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1748, p. 94–99, 2005.

HIROSE, Y.; KARIYA, K.; SASAKI, I.; KURONO, Y.; EBIIKEF, H.; ACHIWA, K. Drastic solvent effect on lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of prochiral 1,4-dihydropyridines. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 7157-7160, 1992.

JACOBSEN, E.E.; ANDRESEN, L.S.; ANTHONSEN, T. Immobilization does not influence the enantioselectivity of CAL-B catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 847-850, 2005.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O.. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications on lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JINWAL, U.K.; ROY, U.; CHOWDHURY, A.R.; BHADURI, A.P.; ROY, P.K. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1041-1046, 2003.

KAMAL, A.; AZHAR, M.; KRISHNAJI, T.; MALIK, S.; AZEEZA, S. Approaches based on enzyme mediated kinetic to dynamic kinetic resolutions: A versatile route for chiral intermediates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 569-592, 2008.

KAWANAMI, Y.; HONNMA, A.; OHTA, K.; MATSUMOTO, N. Effect of substituent on the enantioselectivity for lipase-catalyzed kinetic resolution of glycerol derivatives. **Tetrahedron**, v. 61, p. 693-697, 2005.

KAZLAUSKAS, R.; WEISSFLOCH, A.N.E.; RAPPAPORT, A.T.; CUCCIA, L.A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

KIM, K.; SONG, H.K.; SHIN, D.H.; HWANG, K.Y.; SUH, S.W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. **Structure**, v. 5, p. 173-185, 1997.

KISS, V.; EGRI, G.; BÁLINT, J.; LING, I.; BARKÓCZI, J.; FOGASSY, E. Kinetic and chemical resolution of different 1-phenyl-2-propanol derivatives. **Tetrahedron: Asymetry**, v. 17, p. 2220-2234, 2006.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature insight**, v. 409, p.241-246, 2001.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. Curitiba, 1995. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.; LIMA, V.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.

KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 239–267, 2002.

LEE, W.; KIM, K.; KIM, M.; LEE, S. Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen Esters: Effects of Organic Cosolvents and Temperature. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80,p. 613-615, 1995.

LI, XIANG-GUO; LAHITIE, M.; PAIVIO, M.; KANERVA, L.T. Enantioselective acylation of alcohols with fluorinated  $\beta$ -phenyl $\beta$ - lactams in the presence of *Burkholderia cepacia* lipase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18 , p. 1567–1573, 2007.

LIEBETON, K.; ZONTA, A.; SCHIMOSSEK, K.; NARDINI, M.; LANG, D.; DIJKSTRA, B.; REETZ, M.; JAEGER, K.E. Directed evolution of an enantioselective lipase. **Chemistry & Biology**, v. 7, p. 709-718, 2000.

LIMA, V.M.G. **Produção e Purificação de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua Aplicação em Biocatálise em Solventes Orgânicos**. Curitiba, 2004. 151 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LIU, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from *Candida sp.* in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** (2008), doi:10.1016/j.molcatb.2008.03.003 (accepted manuscript).

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure**. 4. ed. John Wiley & Sons: New York, 1992.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. Die kinetic der Invertinwirkung. **Biochem. Z.**, v.49, p. 333-369, 1913.

MITCHELL, D.A.; RODRIGUEZ, J.A.; CARRIÈRE, F.; KRIEGER N. Determination of the quantitative stereoselectivity fingerprint of lipases during hydrolysis of a prochiral triacylglycerol. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 168–173, 2008.

MOHAPATRA, S. C.; HSU, J. T. Optimizing Lipase Activity, Enantioselectivity, and Stability with Medium Engineering and Immobilization for  $\beta$ -Blocker Synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 213-220, 1999.

NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Structure of Solvent Affects Enantioselectivity of Lipase-Catalyzed Transesterification. **Tetrahedron**, v. 51, p. 8799-8808. 1995.

NOBLE, M. E. M.; CLEASBY, A.; JOHNSON, L.N.; EGMONDB, M.R; FRENKENB, L.G.J. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas ghnae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. **Federation of Biochemical Society**, v. 331, p. 123-128, 1993.

OLIVEIRA, M. **Resolução enzimática de álcoois secundários**. Curitiba, 2007. Tese (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

OMORI, A.; ASSIS, L.F.; ANDRADE, L.H.; COMASSETO, J.V.; PORTO, A.L.M. Enantiomerically pure organoseleno-1-arylethanol by enzymatic resolution with *Candida antarctica* lipase: Novozym 435. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1048–1053, 2007.

OTTOSSON, J.; FRANSSON, L.; KING, J.; HULT, K. Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B Enantioselectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1594, p. 325-334, 2002.

OVERBEEKE, P.; GOVARDHAN, C.; KHALAF, N.; JONGEJAN, J.A.; HEIJNEN, J.J. Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 385–393, 2000.

PALOMO, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, G.; GUISAN, J. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 775–783, 2002.

PATEL, R. N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 804–826, 2002.

PATEL, R. N.; HANSON, R.; BANERJEE, A.; SZARKA, L. Biocatalytic synthesis of some chiral drug intermediates by oxidoreductases. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 74, p. 1345-1360, 1997.

PENCREACH, G.; BARATTI, J. C. Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p. 630-635, 1997.

PERSSON, M.; COSTES, D.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 916-923, 2002 (a).

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 833–841, 2002 (b).

PETERS, G.; BYWATER, R. Computational analysis of chain flexibility and fluctuations in *Rhizomucor miehei* lipase. **Protein Engineering**, v. 12, p. 747-754, 1999.

PHILLIPS, R. Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: prospects for exploitation. **Tibtech**, v.14, p. 13-17, 1996.

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.

RAKELS, J.; STRAATHOF, A.; HEIJNEN, J. A simple method to determine the enantiomeric ratio in enantioselective biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 1051-1056, 1993.

RAMINELLI, C.; COMASSETO, J.V.; ANDRADE, L.H.; PORTO, A.L.M. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (Novozymes 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3117-3122, 2004.

REETZ, M. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 145-150, 2002.

RÚA, M.L.; DIAZMAURINO, T.; FERNANDEZ, V.M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of 2 distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1156, p. 181-189, 1993.

SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; ANDERSSON, J. Lipase catalyzed acylation of primary alcohols with remotely located stereogenic centres: the resolution of ( $\pm$ )-4,4-dimethyl-3-phenyl-1-pentanol. **Tetrahedron: Asymmetric**, v. 18, p. 1712-1720, 2007.

SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 1-9, 2006.

SAKAI, T. "Low-temperature method" for a dramatic improvement in enantioselectivity in lipase-catalyzed reactions. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 2749-2756, 2004.

SALIS, A.; SANJUST, E.; SOLINAS, S.; MONDUZZI, M. Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 24-25, p. 75-82, 2003.

SALUM, T.F.C.; BARON, A.M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* Strain. **Biocatalysis and Biotransformations**, v.26, p. 197-203, 2008.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, A.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258-268, 2001.

SCHMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK, J. B.; BÜHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 359-366, 2002.

SCHRAG, J. et al... The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, p. 187–202, 1997.

SCHURIG, V. Separation of enantiomers by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 275–299, 2001.

SCHURIG, V. Chiral separations using gas chromatography. **Trends in analytical chemistry**, v. 21, p. 647-661, 2002.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K.E.; PULS, M.; EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 166–170, 2006.

SECUNDO, F.; RIVA, S.; CARREA, G. Effects of Medium and of Reaction Conditions on the Enantioselectivity of Lipases in Organic Solvents and Possible Rationales. **Tetrahedron: asymmetry**, v. 3, p. 267-280, 1992.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advance Synthesis & Catalysis**, v. 349, p.1289 – 1307, 2007.

SHEN, L.; WANG, F.; MUN, H.; SUH, M.; JEONG, J. Solvent-dependent reactivity in porcine pancreatic lipase (PPL)-catalyzed hydrolysis. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 1647–1653, 2008.

SINGH, M.; BANERJEE, U. C. Enantioselective transesterification of (*RS*)-1-chloro-3-(3,4-difluorophenoxy)-2-propanol using *Pseudomonas aeruginosa* lipases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 2079–2085, 2007.

SINGH, M.; SINGH, S.; SINGH, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2116-2120, 2008.

SKORIDOU, V.; CHRYSINA, E.; STAMATIS, H.; OIKONOMAKOS, N.; KOLISIS, F. Kinetic and modelling studies on the lipase catalysed enantioselective esterification of ( $\pm$ )-perillyl alcohol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 9-12, 2004.

STINSON, S. C. Chiral Chemistry. **CENEAR**, v. 79, p. 45-57, 2001.

STRAATHOF, A.; JONGEAN, J. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p.559-571, 1997.

STRAATHOF, A.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinon in Biotechnology**, v.13, p. 548-556, 2002.

SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMIDT, R. Purification and some properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1124, p. 253 - 261, 1992.

TAFI, A.; MANETTI, F.; BOTTA, M.; CASATI, S.; SANTANIELLO, E. A drop of enantioselectivity in the *Pseudomonas cepacia* lipase-catalyzed ester hydrolysis is influenced by the chain length of the fatty acid. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 2345–2350, 2004.

TOUKONIITTY, E.; MÄKI-ARVELA, P.; KUUSISTO, J.; NIEMINEN, V.; PÄIVÄRINTA, J.; HOTOKKA, M.; SALMI, T.; MURZIN, D. Solvent effects in enantioselective hydrogenation of 1-phenyl-1,2-propanedione. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 192, p. 135–151, 2003.

VETTER, W.; SCHURIG, V. Enantioselective determination of chiral organochlorine compounds in biota by gas chromatography on modified cyclodextrins. **Journal of Chromatography A**, v. 774, p. 143-175, 1997.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 515-536, 2007.

WANG, Y. Immobilization of lipase with a special microstructure in composite hydrophilic CA/hydrophobic PTFE membrane for the chiral separation of racemic ibuprofen. **Journal of Membrane Science**, v. 293, p. 133–141, 2007.

WANG, Y.; LI, Q.; ZHANG, Z.; MA, J.; FENG, Y. Solvent effects on the enantioselectivity of the thermophilic lipase QLM in the resolution of (*R*, *S*)-2-octanol and (*R*, *S*)-2-pentanol.

**Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** (2008), doi:10.1016/j.molcatb.2008.01.010 (in Press) (a).

WANG, Y.; WANG, R.; LI, Q.; ZHANGA, Z.; FENG, Y. Kinetic resolution of *rac*-alkyl alcohols *via* lipase-catalyzed enantioselective acylation using succinic anhydride as acylating agent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** (2008), doi:10.1016/j.molcatb.2008.02.002 (in Press) (b).

WEHTJE, E; COSTES, D; ADLERCREUTZ, P. Enantioselectivity of lipases: effects of water activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, p. 22 1-230, 1997.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

YU, D.; WANG, Z.; ZHAO, L.; CHENG, Y.; CAO, S. Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas* sp. Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, p. 64–69, 2007 (a).

YU, L.; XU, Y.; WANG, X.; YU, X. Highly enantioselective hydrolysis of dl-menthyl acetate to l-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, p. 149–154, 2007 (b).

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymic catalysis in non-aqueous solvents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 3194-3201, 1988.

ZANONI, G.; AGNELLI, F.; MERIGGI, A.; VIDARI, G. Enantioselective syntheses of isoprostane and iridoid lactones intermediates by enzymatic transesterification. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, p. 1779–1784, 2001.



Se o pressuposto de equilíbrio rápido é feito, as seguintes equações podem ser escritas para caracterizar o sistema (MICHAELIS e MENTEN, 1913):

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[A][E]}{[EA]} \quad (1.1)$$

$$\frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{[E^*][P]}{[EA]} \quad (1.2)$$

$$\frac{k_{-3R}}{k_{3R}} = \frac{[E^*][B_R]}{[EQ_R]} \quad (1.3)$$

$$\frac{k_{-3S}}{k_{3S}} = \frac{[E^*][B_S]}{[EQ_S]} \quad (1.4)$$

$$v_{QR} = -\frac{d[B_R]}{dt} = \frac{d[Q_R]}{dt} = k_{catR}[EQ_R] \quad (1.5)$$

$$v_{QS} = -\frac{d[B_S]}{dt} = \frac{d[Q_S]}{dt} = k_{catS}[EQ_S] \quad (1.6)$$

$$[E]_T = [EA] + [E^*] + [EQ_R] + [EQ_S] + [E] \quad (1.7)$$

### 1.1. DEDUÇÃO DA EQUAÇÃO PARA FINAL PARA A VELOCIDADE DE PRODUÇÃO DE $Q_R$

Para deduzir a equação final de  $v_{QR}$ , a estratégia é utilizar equações (1.1) a (1.4) para substituir os termos  $[EA]$ ,  $[E^*]$ ,  $[EQ_S]$  e  $[E]$  em Eq. (1.7).

Equação (1.3) pode ser rearranjada para isolar  $[E^*]$  no lado esquerdo:

$$[E^*] = \frac{k_{-3R}[EQ_R]}{k_{3R}[B_R]} \quad (1.8)$$

Equação (1.4) pode ser rearranjada para isolar  $[EQ_S]$  no lado esquerdo:

$$[EQ_S] = \frac{k_{3S}[B_S][E^*]}{k_{-3S}} \quad (1.9)$$

Em seguida, a variável  $[E^*]$  pode ser substituída pelo lado direito de Eq. (1.8). Isto resulta em:

$$[EQ_S] = \frac{k_{3S}[B_S] k_{-3R}[EQ_R]}{k_{-3S} k_{3R}[B_R]} \quad (1.10)$$

Equação (1.2) pode ser rearranjada para isolar  $[EA]$  no lado esquerdo:

$$[EA] = \frac{k_{-2}[E^*][P]}{k_2} \quad (1.11)$$

Em seguida, a variável  $[E^*]$  pode ser substituída pelo lado direito de Eq. (1.8). Isto resulta em:

$$[EA] = \frac{k_{-2}[P] k_{-3R}[EQ_R]}{k_2 k_{3R}[B_R]} \quad (1.12)$$

Equação (1.1) pode ser rearranjada para isolar  $[E]$  no lado esquerdo:

$$[E] = \frac{k_{-1}[EA]}{k_1[A]} \quad (1.13)$$

Em seguida, a variável  $[EA]$  pode ser substituída pelo lado direito de Eq. (1.12). Isto resulta em:

$$[E] = \frac{k_{-1} k_{-2}[P] k_{-3R}[EQ_R]}{k_1[A] k_2 k_{3R}[B_R]} \quad (1.14)$$

Agora os termos na Eq. (1.7) podem ser substituídos. O termo  $[EA]$  é substituído pela Eq. (1.12), o termo  $[E^*]$  é substituído pela Eq. (1.8), o termo  $[EQ_S]$  é substituído pela Eq. (1.10) e o termo  $[E]$  é substituído pela Eq. (1.14). Isto resulta em:

$$[E]_T = \frac{k_{-2}[P] k_{-3R}[EQ_R]}{k_2 k_{3R}[B_R]} + \frac{k_{-3R}[EQ_R]}{k_{3R}[B_R]} + [EQ_R] + \frac{k_{3S}[B_S] k_{-3R}[EQ_R]}{k_{-3S} k_{3R}[B_R]} + \frac{k_{-1} k_{-2}[P] k_{-3R}[EQ_R]}{k_1[A] k_2 k_{3R}[B_R]} \quad (1.15)$$

Eq. (1.15) pode ser rearranjada para isolar o termo  $[EQ_R]$  no lado esquerdo:

$$[EQ_R] = \frac{[E]_T}{\frac{k_{-2}[P] k_{-3R}}{k_2 k_{3R}[B_R]} + \frac{k_{-3R}}{k_{3R}[B_R]} + 1 + \frac{k_{3S}[B_S] k_{-3R}}{k_{-3S} k_{3R}[B_R]} + \frac{k_{-1} k_{-2}[P] k_{-3R}}{k_1[A] k_2 k_{3R}[B_R]}} \quad (1.16)$$

O termo  $[EQ_R]$  em Eq. (1.5) pode ser substituído pelo lado direito de Eq. (1.16). Isto resulta em:

$$v_{QR} = \frac{k_{catR}[E]_T}{1 + \frac{k_{-2}[P] k_{-3R}}{k_2 k_{3R}[B_R]} + \frac{k_{-3R}}{k_{3R}[B_R]} + \frac{k_{3S}[B_S] k_{-3R}}{k_{-3S} k_{3R}[B_R]} + \frac{k_{-1} k_{-2}[P] k_{-3R}}{k_1[A] k_2 k_{3R}[B_R]}} \quad (1.17)$$

O numerador e o denominador de Eq. (1.17) são multiplicados por  $[A][B_R]$ . Isto resulta em:

$$v_{QR} = \frac{k_{catR}[E]_T[B_R][A]}{[B_R][A] + \frac{k_{-2} k_{-3R}}{k_2 k_{3R}}[P][A] + \frac{k_{-3R}}{k_{3R}}[A] + \frac{k_{3S} k_{-3R}}{k_{-3S} k_{3R}}[B_S][A] + \frac{k_{-1} k_{-2} k_{-3R}}{k_1 k_2 k_{3R}}[P]} \quad (1.18)$$

O numerador e o denominador de Eq. (1.18) são multiplicados por  $[k_{3R}/k_{-3R}]$ . Isto resulta em:

$$v_{QR} = \frac{\frac{k_{3R}}{k_{-3R}} k_{catR}[E]_T[B_R][A]}{[B_R][A] \frac{k_{3R}}{k_{-3R}} + \frac{k_{-2}}{k_2}[P][A] + [A] + \frac{k_{3S}}{k_{-3S}}[B_S][A] + \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2}[P]} \quad (1.19)$$

## 1.2. DEDUÇÃO DA EQUAÇÃO PARA FINAL PARA A VELOCIDADE DE PRODUÇÃO DE $Q_S$

Para deduzir a equação final de  $v_{Q_S}$ , a estratégia é utilizar equações (1.1) a (1.4) para substituir os termos  $[EA]$ ,  $[E^*]$ ,  $[EQ_R]$  e  $[E]$  em Eq. (1.7).

Equação (4) pode ser rearranjada para isolar  $[E^*]$  no lado esquerdo:

$$[E^*] = \frac{k_{-3S}[EQ_S]}{k_{3S}[B_S]} \quad (1.20)$$

Equação (1.3) pode ser rearranjada para isolar  $[EQ_R]$  no lado esquerdo:

$$[EQ_R] = \frac{[E^*]k_{3R}[B_R]}{k_{-3R}} \quad (1.21)$$

Em seguida, a variável  $[E^*]$  pode ser substituída pelo lado direito de Eq. (1.20). Isto resulta em:

$$[EQ_R] = \frac{k_{3R}[B_R]}{k_{-3R}} \frac{k_{-3S}[EQ_S]}{k_{3S}[B_S]} \quad (1.22)$$

Equação (1.11) resulta em uma expressão para  $[EA]$ . Eq. (1.20) pode ser usado para substituir o termo  $[E^*]$  nesta equação. Isto resulta em:

$$[EA] = \frac{k_{-2}[P]}{k_2} \frac{k_{-3S}[EQ_S]}{k_{3S}[B_S]} \quad (1.23)$$

Eq. (1.13) resulta em uma equação para  $[E]$ . Eq. (1.23) pode ser utilizada para substituir o termo  $[EA]$  nesta equação. Isto resulta em:

$$[E] = \frac{k_{-1}}{k_1[A]} \frac{k_{-2}[P]}{k_2} \frac{k_{-3S}[EQ_S]}{k_{3S}[B_S]} \quad (1.24)$$

Agora os termos em Eq. (1.7) podem ser substituídos. O termo  $[EA]$  é substituído pela Eq. (1.23), o termo  $[E^*]$  é substituído pela Eq. (1.20), o termo  $[EQ_R]$  é substituído pela Eq. (1.22) e o termo  $[E]$  é substituído pela Eq. (1.24). Isto resulta em:

$$[E]_T = \frac{k_{-2}[P]}{k_2} \frac{k_{-3S}[EQ_S]}{k_{3S}[B_S]} + \frac{k_{-3S}[EQ_S]}{k_{3S}[B_S]} + \frac{k_{3R}[B_R]}{k_{-3R}} \frac{k_{-3S}[EQ_S]}{k_{3S}[B_S]} + [EQ_S] + \frac{k_{-1}}{k_1[A]} \frac{k_{-2}[P]}{k_2} \frac{k_{-3S}[EQ_S]}{k_{3S}[B_S]} \quad (1.25)$$

Eq. (1.25) pode ser rearranjada para isolar o termo  $[EQ_S]$  no lado esquerdo:

$$[EQ_S] = \frac{[E]_T}{1 + \frac{k_{-2}[P]}{k_2} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}[B_S]} + \frac{k_{-3S}}{k_{3S}[B_S]} + \frac{k_{3R}[B_R]}{k_{-3R}} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}[B_S]} + \frac{k_{-1}}{k_1[A]} \frac{k_{-2}[P]}{k_2} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}[B_S]}} \quad (1.26)$$

O termo  $[EQ_S]$  em Eq. (1.6) pode ser substituído pelo lado direito de Eq. (1.26). Isto resulta em:

$$v_{QS} = \frac{k_{cats}[E]_T}{1 + \frac{k_{-2}[P]}{k_2} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}[B_S]} + \frac{k_{-3S}}{k_{3S}[B_S]} + \frac{k_{3R}[B_R]}{k_{-3R}} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}[B_S]} + \frac{k_{-1}}{k_1[A]} \frac{k_{-2}[P]}{k_2} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}[B_S]}} \quad (1.27)$$

O numerador e o denominador de Eq. (1.27) são multiplicados por  $[A][B_S]$ . Isto resulta em:

$$v_{QS} = \frac{k_{cats}[E]_T[B_S][A]}{[B_S][A] + \frac{k_{-2}}{k_2} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}} [P][A] + \frac{k_{-3S}}{k_{3S}} [A] + \frac{k_{3R}}{k_{-3R}} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}} [B_R][A] + \frac{k_{-1}}{k_1} \frac{k_{-2}}{k_2} \frac{k_{-3S}}{k_{3S}} [P]} \quad (1.28)$$

O numerador e o denominador de Eq. (1.28) são multiplicados por  $[k_{3S}/k_{-3S}]$ . Isto resulta em:

$$v_{Q_S} = \frac{\frac{k_{3S}}{k_{-3S}} k_{catS} [E]_T [B_S] [A]}{[B_S] [A] \frac{k_{3S}}{k_{-3S}} + \frac{k_{-2}}{k_2} [P] [A] + [A] + \frac{k_{3R}}{k_{-3R}} [B_R] [A] + \frac{k_{-1}}{k_1} \frac{k_{-2}}{k_2} [P]} \quad (1.29)$$

### 1.3 UTILIZAÇÃO DAS EQUAÇÕES CINÉTICAS PARA DETERMINAR O VALOR DE $E$

Os denominadores de Equações (1.19) e (1.29) são idênticos. Portanto, estes denominadores serão substituídos pelo símbolo  $D$ . Também os agrupamentos de constantes nos numeradores são representados por constantes globais. Isto resulta nas seguintes expressões:

$$v_R = \frac{d[Q_R]}{dt} = -\frac{d[B_R]}{dt} = \frac{k_R [A] [B_R] [E]_T}{D} \quad (1.30)$$

$$v_S = \frac{d[Q_S]}{dt} = -\frac{d[B_S]}{dt} = \frac{k_S [A] [B_S] [E]_T}{D} \quad (1.31)$$

onde as constantes globais  $k_R$  e  $k_S$  são análogos às constantes de especificidade de reações de um substrato e um produto. Esta analogia pode ser vista pelo cálculo da razão das velocidades, que é dada por:

$$\frac{v_R}{v_S} = \frac{\left( \frac{k_R [A] [B_R] [E]_T}{D} \right)}{\left( \frac{k_S [A] [B_S] [E]_T}{D} \right)} = \frac{k_R [B_R]}{k_S [B_S]} \quad (1.32)$$

Em outras palavras, quando  $[B_R]$  e  $[B_S]$  são iguais, a velocidade relativa das duas reações é dada pela razão das constantes  $k_R$  e  $k_S$ . Isto é o mesmo caso que acontece com uma reação que tem só um substrato e um produto. Nota-se que a razão enantiomérica é definida pela razão das duas constantes de especificidade, uma de cada substrato. Portanto, é possível escrever:

$$\frac{v_R}{v_S} = \frac{k_R[B_R]}{k_S[B_S]} = E \frac{[B_R]}{[B_S]} \quad (1.33)$$

Para determinar a razão enantiomérica ou constante de enantioseletividade, o tempo não será utilizado como variável independente. Em vez disto, será utilizada a variável  $[G]$ , a qual representa a concentração total do produto quiral produzido em um determinado tempo e que, portanto, é igual a:

$$[G] = [Q_R] + [Q_S] \quad (1.34)$$

Portanto, equações (1.30) e (1.31) devem ser transformadas para a base de  $[G]$ . A vantagem desta transformação é que é possível chegar em um conjunto de equações que contenha a razão enantiomérica,  $E$ , como o único parâmetro.

É importante notar que a velocidade de variação de  $[G]$  iguala a somas das velocidades da produção de  $Q_R$  e  $Q_S$ , ou seja:

$$\frac{d[G]}{dt} = \frac{d[Q_R]}{dt} + \frac{d[Q_S]}{dt} = v_R + v_S \quad (1.35)$$

A transformação das equações (1.30) e (1.31) para a base de grau de reação pode ser feito usando o fato que os termos diferenciais que descrevem as velocidades seguem as leis normais de divisão. Portanto, a transformação pode ser feita pela divisão de cada equação de velocidade pela equação da velocidade de variação em  $G$ . Isto resulta nas seguintes equações:

$$\frac{\left(\frac{d[Q_R]}{dt}\right)}{\left(\frac{d[G]}{dt}\right)} = \frac{v_R}{v_R + v_S} = \frac{d[Q_R]}{d[G]} \quad (1.36)$$

$$\frac{\left(\frac{d[Q_S]}{dt}\right)}{\left(\frac{d[G]}{dt}\right)} = \frac{v_S}{v_R + v_S} = \frac{d[Q_S]}{d[G]} \quad (1.37)$$

Se as velocidades que aparecem nas Equações (1.36) e (1.37) são substituídas pelos lados direitos de equações (1.30) e (1.31), o resultado fica:

$$\frac{d[Q_R]}{d[G]} = \frac{v_R}{v_R + v_S} = \frac{\frac{k_R[E]_T[A][B_R]}{D}}{\frac{k_R[E]_T[A][B_R]}{D} + \frac{k_S[E]_T[A][B_S]}{D}} = \frac{k_R[B_R]}{k_R[B_R] + k_S[B_S]} \quad (1.38)$$

$$\frac{d[Q_S]}{d[G]} = \frac{v_S}{v_R + v_S} = \frac{\frac{k_S[E]_T[A][B_S]}{D}}{\frac{k_R[E]_T[A][B_R]}{D} + \frac{k_S[E]_T[A][B_S]}{D}} = \frac{k_S[B_S]}{k_R[B_R] + k_S[B_S]} \quad (1.39)$$

A definição de razão enantiomérica

$$E = \frac{k_R}{k_S}$$

pode ser usada para simplificar equações (1.38) e (1.39). Para fazer isto, os numeradores e denominadores destas duas equações são divididos por  $k_S$ . Isto resulta em um conjunto de equações que tenham  $E$  como único parâmetro:

$$\frac{d[Q_R]}{d[G]} = \frac{\frac{k_R}{k_S}[B_R]}{\frac{k_R}{k_S}[B_R] + \frac{k_S}{k_S}[B_S]} = \frac{E[B_R]}{E[B_R] + [B_S]} \quad (1.40)$$

$$\frac{d[Q_S]}{d[G]} = \frac{\frac{k_S}{k_S}[B_S]}{\frac{k_R}{k_S}[B_R] + \frac{k_S}{k_S}[B_S]} = \frac{[B_S]}{E[B_R] + [B_S]} \quad (1.41)$$

A última manipulação é transformar as concentrações dos substratos para a base de frações molar, com base na nas concentrações iniciais de  $B_R$  e  $B_S$ . As frações molares são definidas pelas seguintes expressões:

$$B_R = \frac{[B_R]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (1.42a)$$

$$B_S = \frac{[B_S]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (1.42b)$$

$$Q_R = \frac{[Q_R]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (1.42c)$$

$$Q_S = \frac{[Q_S]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (1.42d)$$

Também define-se que:

$$G = \frac{[G]}{[B_R]_o + [B_S]_o} = \frac{[Q_R] + [Q_S]}{[B_R]_o + [B_S]_o} \quad (1.43)$$

A variável  $G$  é equivalente ao grau de reação ou conversão e pode variar de 0 (nenhum produto quirais formado) até 1 (todo o substrato quiral convertido em produtos quirais).

Quando equações (1.42a) a (1.42d) e equação (1.43) são substituídas em equações (1.40) e (1.41), obtém-se o conjunto final de equações:

$$\frac{dQ_R}{dG} = \frac{E \cdot B_R}{E \cdot B_R + B_S} = -\frac{dB_R}{dG}$$

$$\frac{dQ_S}{dG} = \frac{B_S}{E \cdot B_R + B_S} = -\frac{dB_S}{dG}$$

A estratégia para utilizar este conjunto final de equações para determinar  $E$  é descrito por Mitchell et al. (2008) e envolve as seguintes etapas:

- admite-se que as frações molares originais sejam  $B_R = B_S = 0,5$  e  $Q_R = Q_S = 0$
- define-se um vetor de valores de  $E$  (por exemplo, 0, 0,1, 0,2 ... 200)
- para cada valor de  $E$  (iterativamente)

- integra-se as equações para obter perfis de  $B_R$  e  $B_S$  (esta etapa é feita por um programa escrita em FORTRAN que usa a subrotina DRKGS. Esta subrotina emprega o método de Runge-Kutta para realizar a integração numérica)
- calcula-se a soma dos quadrados dos desvios entre os dados experimentais de  $B_R$  e  $B_S$  e os valores obtidos na integração para estas variáveis
- identifica-se o valor de  $E$  que dê o menor valor para a soma dos desvios quadrados.

## APÊNDICE 2. DEDUÇÃO DAS FRAÇÕES MOLARES A PARTIR DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Para a utilização do modelo matemático apresentado em Apêndice 1, é necessário transformar os resultados experimentais obtidos por cromatografia gasosa em frações molares como definidas pelas equações (1.42a) a (1.42d).

O programa de análise dos cromatogramas fornecidos pelo cromatógrafo gasoso gera dois dados. O primeiro especifica a fração de  $B_S$  relativo ao *pool* total de substrato quiral B, que será representada pelo símbolo  $F_{BS}$ . O segundo especifica a fração de  $Q_R$  relativo ao *pool* total de produto quiral Q, que será representada pelo símbolo  $F_{QR}$ . Estas frações relativas são relacionadas às frações molares pelas seguintes equações:

$$F_{BR} = \frac{B_R}{B_R + B_S} \quad (2.1)$$

$$F_{QR} = \frac{Q_R}{Q_S + Q_R} \quad (2.2)$$

A estequiometria da reação (a conversão de uma molécula de substrato B em uma molécula de produto Q) faz com que exista uma relação entre  $B_R$  e  $Q_R$  e uma outra relação entre  $B_S$  e  $Q_S$ . Dado que a mistura inicial é um racemato que contém somente os substratos (ou seja, inicialmente  $B_R = B_S = 0,5$  e  $Q_R = Q_S = 0$ ), as equações são:

$$B_R + Q_R = 0.5 \quad (2.3)$$

$$B_S + Q_S = 0.5 \quad (2.4)$$

É possível rearranjar Eq. (2.1) para isolar  $B_R$  no lado esquerdo da equação:

$$B_R = \frac{B_S}{\left(\frac{F_{BS}}{1-F_{BS}}\right)} \quad (2.5)$$

Da mesma maneira, é possível rearranjar Eq. (2.2) para isolar  $Q_R$  no lado esquerdo:

$$Q_R = Q_S \left(\frac{F_{QR}}{1-F_{QR}}\right) \quad (2.6)$$

As equações (2.5) and (2.6) podem ser usadas para substituir  $B_R$  e  $Q_R$ , respectivamente, em Eq. (2.3). Isto resulta em:

$$\frac{B_S}{\left(\frac{F_{BS}}{1-F_{BS}}\right)} + Q_S \left(\frac{F_{QR}}{1-F_{QR}}\right) = 0,5 \quad (2.7)$$

Equação (2.4) pode ser usada para substituir  $B_S$  em Eq. (2.7). Isto resulta em:

$$\frac{0,5 - Q_S}{\left(\frac{F_{BS}}{1-F_{BS}}\right)} + Q_S \left(\frac{F_{QR}}{1-F_{QR}}\right) = 0,5 \quad (2.8)$$

Uma vez que o valor de  $F_{QR}$  é fornecido pelo cromatógrafo gasoso,  $Q_S$  é a única incógnita em Eq. (2.8). Esta variável pode ser isolada no lado esquerdo, que resulta em:

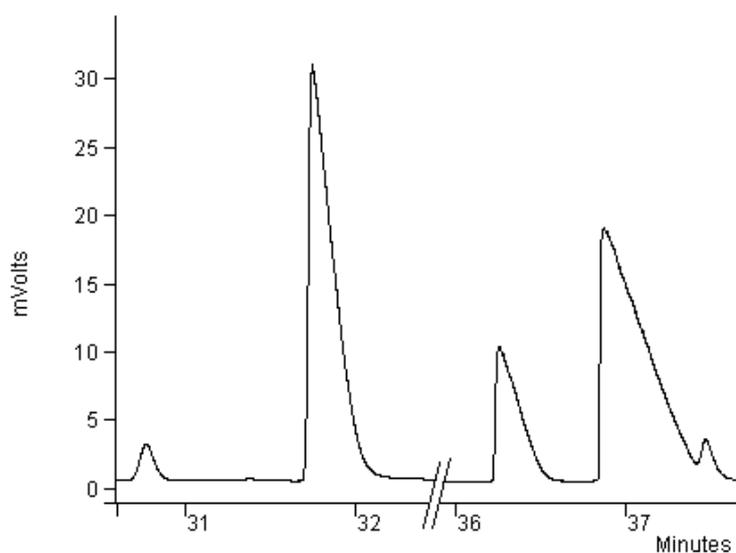
$$Q_S = 0,5 \frac{\left(1 - \left(\frac{F_{BS}}{1-F_{BS}}\right)\right)}{\left(1 - \left(\frac{F_{QR}}{1-F_{QR}}\right)\left(\frac{F_{BS}}{1-F_{BS}}\right)\right)} \quad (2.9)$$

Uma vez que  $Q_S$  é calculada, Eq. (2.6) pode ser usado para calcular  $Q_R$ . De posse dos valores de  $Q_R$  e  $Q_S$  as equações (2.3) e (2.4) podem ser usadas para calcular  $B_R$  e  $B_S$ , respectivamente.

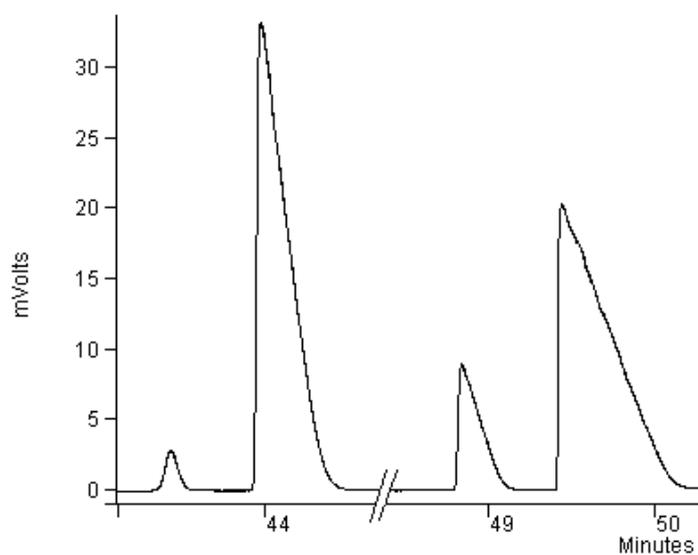
## ANEXO

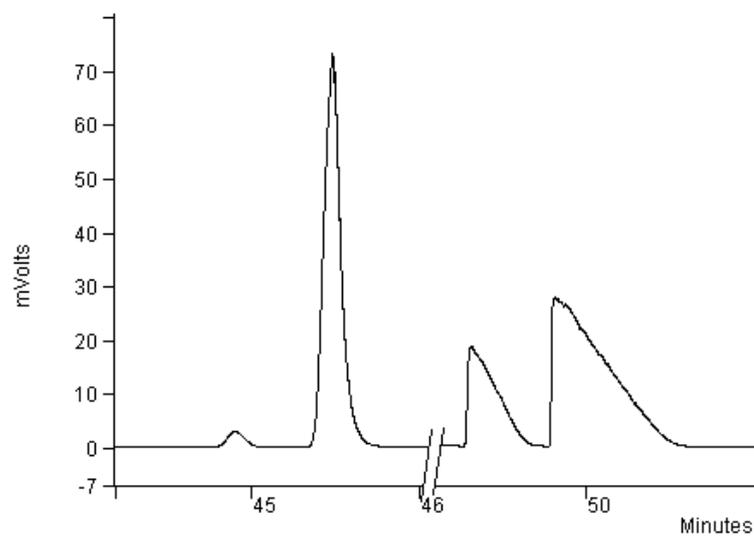
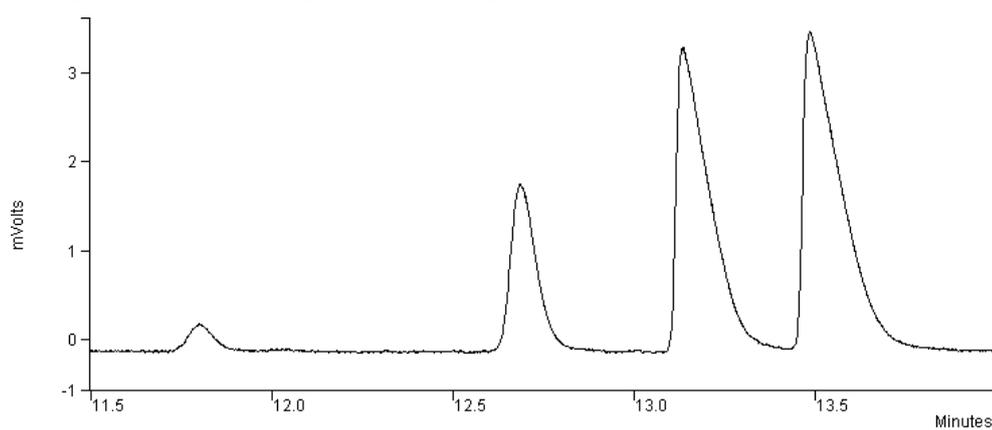
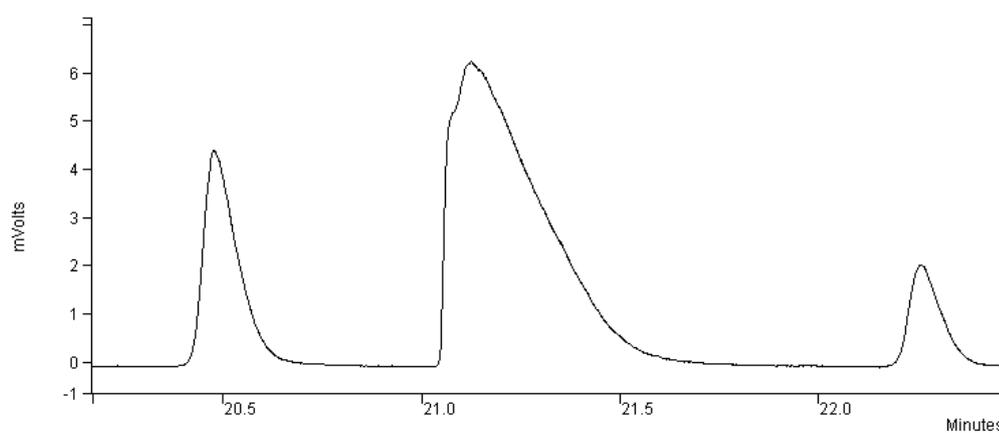
**EXEMPLOS DE CROMATOGRAMAS FORNECIDOS PELA CROMATOGRAFIA GASOSA EM COLUNA QUIRAL  $\beta$ -CICLODEXTRINA APÓS A RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÁLCOOIS ALÍCOIS SECUNDÁRIOS CATALISADA PELA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM HEXANO**

**1 – Cromatograma fornecido para a resolução cinética de 1-fenilprop-2-en-1-ol:**



**2 – Cromatograma fornecido para a resolução cinética de *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol:**



**3 – Cromatograma fornecido para a resolução cinética de (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol:****4 – Cromatograma fornecido para a resolução cinética de 5-metilhex-1-en-3-ol:****5 – Cromatograma fornecido para a resolução cinética de 1-octen-3-ol:**

**6 – Cromatograma fornecido para a resolução cinética de 1-nonen-3-ol:**