

ORGANO-GEL: UM NOVO SISTEMA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E SUA APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA

Paulo Cesar de Jesus, Jair Juarez João, Pedro Luiz Ferreira da Silva, Giovani Burlin e Maria da Graça Nascimento*
Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-900 - Florianópolis - SC

Recebido em 5/7/96; aceito em 5/12/96

ORGANOGELES: A NEW SYSTEM FOR LIPASES IMMOBILIZATION AND ITS APPLICATION IN ORGANIC SYNTHESIS. Lipases have been immobilized in microemulsion-based organogels (MBG's) and successfully utilized for the enantioselective esterification, diesterification and transesterification reactions, in organic solvents at 25°C. This methodology is described as a new alternative for the use of enzymes in organic solvents. High enzymic stability has been observed. We have also used this methodology for the successful resolution of chiral secondary alcohols. This is a convenient way of using this catalyst in organic solvents which employs small amounts of the enzyme (250µg/mL).

Keywords: lipases; immobilization; organogels.

1. INTRODUÇÃO

A habilidade das enzimas para atuarem como catalisadores já tem sido considerada por muitos anos, particularmente pela indústria farmacêutica¹⁻⁴. A imobilização de enzimas é uma das técnicas mais importantes na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos⁵⁻¹⁰. Por razões práticas e econômicas, é muitas vezes vantajoso usar enzimas imobilizadas visto que, com poucas exceções, elas são insolúveis em solventes orgânicos¹¹. Uma das grandes vantagens da imobilização é poder utilizar o catalisador repetidamente sem considerável perda da atividade catalítica¹². Considerando a compatibilidade com a enzima, géis hidrofílicos têm sido frequentemente empregados como suportes enzimáticos. Às vezes, a enantioselectividade é aumentada¹². Alguns sistemas que já foram usados para imobilizar enzimas são Eupergit C¹³, celite^{11,14,15}, quitosana e quitina¹¹, agarose, Chromosorb e Sepharose^{13,16,17}. A modificação de enzimas com polietilenoglicol que resulta em um pó solúvel em benzeno ou em hidrocarbonetos clorados, também tem sido empregada¹⁸⁻²². Outras técnicas que superam os problemas da baixa solubilidade dos substratos, são o uso de surfactantes e micelas reversas²³⁻³⁶.

Na última década, muitos estudos têm se voltado para a utilização de microemulsões para imobilização de enzimas³⁷⁻⁴⁴. Uma microemulsão é uma dispersão isotrópica e opticamente transparente de óleo em água (O/W) ou de água em óleo (W/O), onde o óleo é um solvente orgânico (hexano, heptano). O nome "microemulsão" deriva do fato de que gotas de óleo no sistema (O/W), ou gotas de água no sistema (W/O), possuem um diâmetro que varia de 50 a 500 Å^{45,46}. Como as microemulsões são sistemas organizados, elas são fáceis de serem preparadas. A estabilidade da microemulsão depende da razão da concentração de água pelo surfactante adicionado ao meio, representado por W_0 , onde:

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

A gota de microemulsão pode ser efetivamente considerada como um microreator. Robison e col., estudando as propriedades das microemulsões, concluíram que a sua estabilidade depende da concentração de óleo, água e surfactante presentes no meio⁴³.

Haering, Luise⁴², Quillet e col.⁴⁷⁻⁵¹ descreveram o efeito da solubilização de gelatina em uma microemulsão água / óleo (W/O) na formação do gel. Este é obtido pelo resfriamento de

uma solução previamente aquecida a 55°C de Aerosol-OT (sulfosuccinato sódico de bis-2-etilhexila) em solvente orgânico (hexano, heptano) e uma solução aquosa de gelatina. O sistema final é um gel homogêneo, cuja consistência e propriedades físicas dependem da concentração relativa de gelatina e água. Vários estudos foram realizados na tentativa de se compreender este novo sistema⁵²⁻⁵⁷. A estrutura proposta para o sistema organo-gel ou MBG (do inglês "microemulsion-based gels") está representada na figura 1 e consiste de gotas de microemulsão aquosas em equilíbrio com uma estrutura de gelatina e água, rodeada pelo surfactante Aerosol-OT.

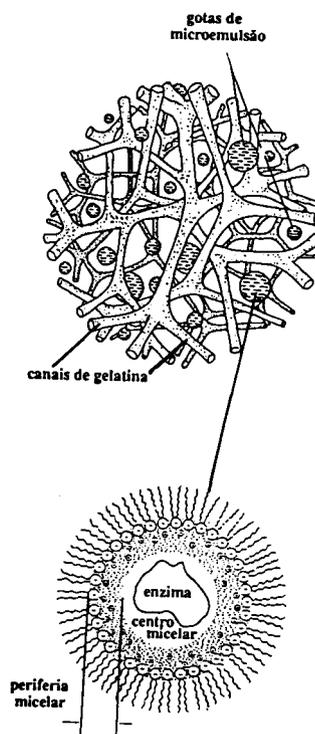


Figura 1. Modelo proposto para a estrutura do organo-gel [ref. 44 e 61]

Recentemente, foi demonstrado que enzimas podem ser imobilizadas no organo-gel e utilizadas para catálise enzimática em meio orgânico⁵⁸⁻⁶³.

O uso do sistema de organo-gel consiste portanto em uma nova alternativa para a imobilização de enzimas, e para sua utilização na catálise enzimática em meio orgânico. Neste novo sistema a enzima está localizada no centro micelar (centro aquoso) da microemulsão água/óleo (W/O), eliminando o tradicional problema de estabilizar a enzima contra inativação por um solvente não-aquoso.

Este manuscrito tem por objetivo divulgar uma nova metodologia de imobilização de enzimas e sua aplicação em síntese orgânica. Nos últimos anos, temos investigado o potencial catalítico de lipases imobilizadas em organo-gel para a formação de ésteres, resolução de álcoois secundários racêmicos, formação de diésteres derivados de ácidos dicarboxílicos alifáticos e dióis e estudado o comportamento cinético de reações de transesterificação neste sistema. O presente trabalho aponta alguns resultados promissores na área de biocatálise e revela a eficiência deste novo sistema.

Antes de discutirmos os resultados obtidos sobre a utilização de lipases imobilizadas em organo-gel, torna-se necessário explanar sobre a utilização, importância e usos recentes destas enzimas na síntese orgânica.

1.1 Lipases em Síntese Orgânica

As lipases (triglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que hidrolisam triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol. Elas tem atraído a atenção de químicos orgânicos sintéticos principalmente por suas propriedades enantiosseletivas. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo, além de não requererem cofatores^{64,65}. Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador de acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificações, transesterificações⁶⁶⁻⁷⁰, amidação⁷¹⁻⁷⁵, síntese de peptídeos^{76,77} e a formação de lactonas macrocíclicas^{78,79}. Destas possibilidades, a síntese e/ou transesterificação enantiosseletiva de ésteres são de interesse porque fornecem aos químicos orgânicos sintéticos um método fácil para a preparação de álcoois e ácidos opticamente ativos. Mecanicamente, a síntese enzimática de ésteres ou reação enzimática de transesterificação tem algumas características em comum com as reações da química clássica correspondentes, mas os princípios que governam a especificidade estereoquímica são diferentes e assim justificam a sua utilização⁸⁰.

Muitos dos estudos para a utilização de lipases em síntese orgânica tem envolvido conversão assimétrica, um dos temas centrais da síntese orgânica moderna⁸¹. A indústria farmacêutica tem demonstrado grande interesse nesta área, visto que a atividade biológica de muitas drogas racêmicas muitas vezes reside em um único enantiômero. Sintetizar tais drogas em sua forma enantiomericamente pura está se tornando um caminho importante na química da biotransformação. Drogas como Naproxen (agente antiinflamatório)⁸², Dropropizina (agente antitussígeno)⁸³, Cloranfenicol (agente antimicrobiano)⁸⁴, Atenolol (usado no tratamento da hipertensão)⁸⁵ e a cadeia lateral do Taxol (usado no combate ao câncer)⁸⁶ têm sido resolvidos por catálise enzimática. A aplicação da resolução enzimática na indústria farmacêutica é extensa⁸⁷⁻⁹².

A resolução de álcoois racêmicos tem sido feita explorando as propriedades enantiosseletivas de enzimas hidrolíticas^{93,94}. Os álcoois opticamente ativos podem ser obtidos em soluções aquosas por hidrólises estereosseletivas dos correspondentes ésteres racêmicos⁹⁵⁻¹⁰⁰, por esterificações em solvente orgânico¹⁰¹⁻¹⁰⁵ e por transesterificações dos correspondentes álcoois racêmicos¹⁰⁶⁻¹¹¹. A escolha do método depende de muitos fatores tais como seleção de um biocatalisador disponível, rendimento, pureza, velocidade

da reação, separação dos produtos e estabilidade das enzimas. Em outras palavras, a otimização das condições reacionais. Com a exceção de certos álcoois estericamente impedidos, as lipases catalisam a acilação assimétrica de uma ampla faixa de substratos cíclicos e acíclicos com enantiosseletividade entre moderada e alta¹¹²⁻¹²³.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materiais e Métodos

As enzimas utilizadas neste trabalho foram: lipase de *Pseudomonas sp* (Genzyme Biochemicals Ltd), com atividade específica de 1900 unidades/mg de sólido; lipase de *Candida cylindracea* (CCL) (Sigma Chemical CO) tipo VII-S com atividade específica de 71 unidades/mg de sólido; lipase *Microbial* (Genzyme Biochemical Ltd) com atividade específica de 1600 unidades/mg de sólido, lipase de *Chromobacterium viscosum* (*C.V. lipase*) (Genzyme Biochemical Ltd), com atividade específica de 3970 unidades/mg de sólido e lipase do *pâncreas do porco* (PPL) (Sigma Chemical CO) com atividade específica de 35 unidades/mg de sólido. Foram utilizados solventes e substratos comerciais, purificados quando necessário. O surfactante Aerosol-OT (sulfosuccinato sódico de bis-2-etilhexila) (Sigma, D-0885 lote 120H0456) e a gelatina em pó (tipo A: Bloom 300) foram fornecidos pela Sigma. A sílica para cromatografia em coluna (70-230 mesh) e em placa foi fornecida pela Merck.

Os espectros de infravermelho foram efetuados em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 781. Os espectros de ¹H RMN foram feitos em um espectrômetro Varian EM-360L 60 MHz e Bruker AC 200 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Estudos cinéticos foram realizados em um espectrofotômetro modelo Beckman DU-65.

As vidrarias foram da Pyrex e os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

2.2. Preparação do Organo-Gel

O organo-gel (MBG) foi preparado pela adição de uma solução de Aerosol-OT em hexano a 55°C a uma segunda solução de gelatina em água também a 55°C. A mistura foi então agitada vigorosa e manualmente e deixada esfriar a temperatura ambiente para formar um gel rígido e estável. A composição do organo-gel utilizado foi a seguinte: 1,40g de gelatina, 2,15 mL de água destilada, 4,00 mL de solução de Aerosol-OT 0,5M, 2,20 mL do solvente hexano (W₀ = 59,72). A microemulsão água-óleo contendo a enzima foi preparada injetando 0,25 mL de uma solução aquosa de enzima com concentração de 10 mg/mL na solução de Aerosol-OT. Após estabilização à temperatura ambiente, os géis foram armazenados em "freezer" para serem utilizados nas reações. Géis controle, isto é, sem enzima imobilizada também foram preparados⁵⁸⁻⁶⁰.

2.3. Preparação do Meio Reacional

Os géis contendo enzima imobilizada foram retirados do "freezer", rapidamente separados dos tubos de ensaio e cortados em seções regulares de 125 mm³, e então removidos para um erlenmeyer contendo hexano, estando assim prontos para serem utilizados como biocatalisadores nas reações em meio orgânico⁶².

Todas as reações apresentadas neste manuscrito foram também efetuadas utilizando géis controle, sem enzimas imobilizadas, e sob estas condições não foram observadas a formação de produtos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeitos do Solvente

A verificação de que enzimas podem funcionar em meio não aquoso tem eliminado muitas dúvidas sobre o uso destas

como catalisadores. Além disso, a catálise enzimática em meio orgânico tem revelado alguns fenômenos inesperados e benéficos. Por exemplo: a estabilidade de enzimas em meio não aquoso pode ser aumentada comparando-se com aquelas em água⁸¹; todas as propriedades enzimáticas de interesse particular para químicos orgânicos, como por exemplo a enantiosseletividade, podem ser controladas pelo solvente¹²⁵⁻¹²⁷.

Recentemente, algumas regras empíricas foram formuladas para a otimização da atividade biocatalítica em diferentes solventes orgânicos. O parâmetro *P*, o coeficiente de partição do solvente entre o 1-octanol e água, foi introduzido como uma medida quantitativa da polaridade do solvente⁸⁰. Em 1987, Laane e col.¹²⁸ publicaram um trabalho relacionando o coeficiente de partição (log *P*) com a atividade de biocatalisadores em solvente orgânico. Neste trabalho, os autores mostraram que o coeficiente de partição, log *P*, é um indicador mais adequado do que o momento de dipolo (*D*) e a constante dielétrica (ϵ) para a medida da polaridade, quando correlacionada com a atividade de biocatalisadores.

Rubio e col.¹²⁹ têm estudado o efeito do solvente na regio-seletividade de enzimas como a lipase de *Pseudomonas cepacia*. Klibanov e col.¹³⁰ têm verificado que pode ocorrer inversão da enantiosseletividade de algumas enzimas quando é mudada a hidrofobicidade do solvente. No caso da protease de *Aspergillus oryzae* foi observada uma dependência linear satisfatória entre a enantiosseletividade da protease e log *P* de mistura de solventes.

Estudos recentes também mostraram que a enantiosseletividade da protease *Subtilisin Carlsberg* na reação de transesterificação do álcool sec-fenilético e butirato de vinila é grandemente afetada pelo solvente. Por exemplo, a razão entre (K_{cat} / K_M)_s / (K_{cat} / K_M)_p variou de 3 em acetonitrila anidra para 61 em dioxano anidro¹³¹. Perda em eficiência catalítica e enantiosseletividade foram observadas quando a lipase de *Candida cylindracea* foi empregada em meio orgânico hidrofílico tal como dioxano ou tetrahydrofurano, comparativamente com solventes hidrofóbicos como por exemplo o tolueno¹³². A seletividade pró-quiral de uma enzima pode também ser grandemente afetada pelo solvente¹³³.

Para investigar o efeito do solvente no sistema de organo-gel (MBG), diferentes solventes foram utilizados na reação de esterificação do ácido oleico e 1-pentanol. A reação de esterificação foi catalisada pela lipase de *Chromobacterium viscosum* (*C.V. lipase*) imobilizada em organo-gel de ciclohexano. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 1^{60, 128}.

A partir destes dados pode-se observar uma grande variação no rendimento de ésteres em função da polaridade do solvente externo. Os valores variaram de um máximo de 88% no rendimento do éster, quando o n-octano foi utilizado como solvente, até um valor de 7%, quando os solventes externos foram o xileno e o 1,4-dioxano. Existe uma correlação nítida entre os valores de log *P* e os rendimentos dos produtos das reações, que pode ser melhor visualizada na curva em forma de "S" descrita na figura 2, concluindo-se que os melhores solventes para reações de esterificação catalisadas pela *C.V. lipase* imobilizada no sistema de organo-gel são aqueles que possuem valores de log *P* maiores ou iguais a 3,2. Este resultado está de acordo com os obtidos por Laane para reações estudadas com enzimas em suspensão em solvente orgânico e com enzimas imobilizadas em micelas reversas¹²⁸.

Em geral, a eficiência catalítica das enzimas diminui com o aumento da polaridade do solvente. Solventes hidrofílicos também podem desnaturar as enzimas por penetrarem nos núcleos hidrofóbicos das proteínas modificando a sua estrutura natural. Outra consideração importante é a solubilidade dos substratos e produtos no meio. As propriedades físicas do meio apolar podem afetar a posição de equilíbrio e assim, o rendimento da reação enzimática. Observa-se também que solventes polares danificam a estrutura do gel interferindo no rendimento da reação.

Tabela 1. Efeito do solvente na reação de esterificação do ácido oleico com 1-pentanol catalisada pela *C.V. lipase* imobilizada em MBG, a 25°C^{a, b}.

Solvente	Rendimento (%)	Coefficiente de Partição (log <i>P</i>) ^c
n-octano	88	4,50
iso-octano	83	4,51
heptano	82	4,00
ciclohexano	79	3,20
hexano	78	3,50
éter de petróleo	77	—
tolueno	70	2,50
tetracloroeto de carbono	63	3,00
benzeno	45	2,00
éter etílico	42	0,85
clorofórmio	12	2,00
xileno	07	3,10
1,4-dioxano	07	-1,14

(a) Os dados foram reproduzidos da ref. [60]; (b) As reações foram efetuadas com 10g de organo-gel de ciclohexano em 30 mL de solvente com 0,01 mol de cada substrato, *C.V. lipase* = 250µg/mL. Empregou-se agitação magnética suave, com um tempo de reação de 24 horas a 25°C; (c) Os valores de log *P* foram obtidos da Lit. [128].

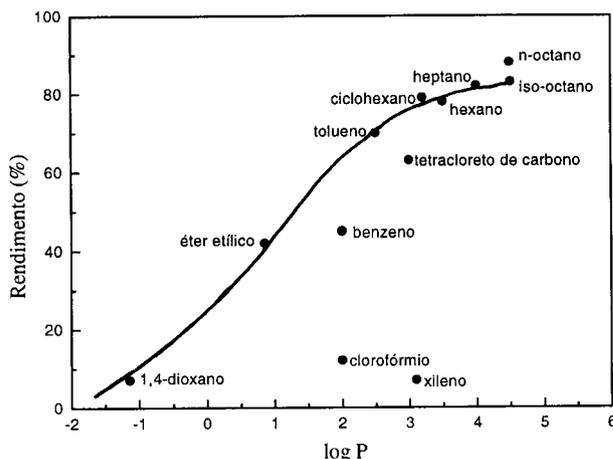


Figura 2. Efeito do solvente no rendimento da reação de esterificação entre o ácido oleico e 1-pentanol, catalisada pela *C.V. lipase* imobilizada em MBG em função do log *P* a 25 °C. Tempo de reação: 24 horas.

3.2 Reutilização do Catalisador

Uma das grandes vantagens do sistema organo-gel está na sua reutilização. Este é um fator importante quando considera-se a aplicação prática de um catalisador em um método particular de síntese, em razão de seu alto custo para os processos empregados.

Em trabalhos anteriores, já foi verificado que o organo-gel possui elevada estabilidade e reversibilidade térmica⁶⁰. A enzima imobilizada neste sistema permanece com uma atividade de até 87% por um período de até doze meses quando armazenada à temperatura ambiente.

A figura 3 mostra o desempenho da *C.V. lipase* imobilizada em organo-gel em repetidas preparações do oleato de n-pentila. A enzima manteve-se ativa depois de 15 conversões com um rendimento na faixa de 65-70%. Assim, fica claro que a atividade catalítica da *C.V. lipase* neste sistema mantém-se num nível muito bom, considerando-se o número de repetições do experimento. Não foram observadas mudanças na aparência física do gel durante o período de duração do experimento.

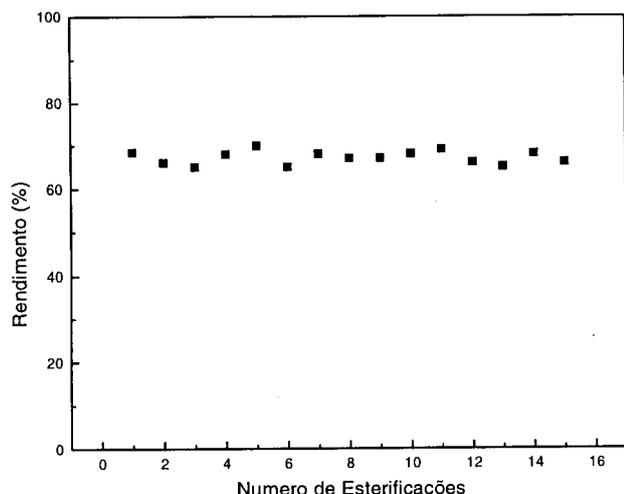


Figura 3. Reutilização da C.V. lipase imobilizada em organo-gel na esterificação do ácido oleico com 1-pentanol a 25°C.

3.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ALIFÁTICOS

O organo-gel, para fins preparativos, foi inicialmente utilizada na síntese de ésteres alifáticos. A lipase de *Chromobacterium viscosum* (C.V. lipase), foi imobilizada em organo-gel conforme procedimento geral e utilizada para a preparação de uma série de ésteres derivados do ácido oleico (ácido *cis*-9 octadecênico) e diferentes álcoois alifáticos (equação 1), obtendo-se os correspondentes ésteres com bons rendimentos (Tabela 2)⁶⁰.

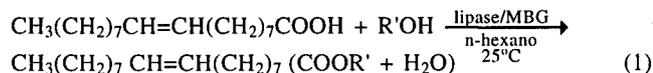


Tabela 2. Esterificação do ácido oleico com diferentes álcoois alifáticos, catalisada pela C.V. lipase imobilizada em MBG a 25°C^{a, b}.

R'OH	Rendimento (%)	R'OH	Rendimento (%)
etanol	61	tetradecanol	68
propanol	64	hexadecanol	75
butanol	63	octadecanol	74
pentanol	68	isopropanol	47
hexanol	72	terc-butanol	0
octanol	80	3-metil-1-butanol	89
decanol	82	ciclohexanol	61
dodecanol	68	álcool alílico	50

(a) Dados reproduzidos da ref. [60]; (b) Condições reacionais: 0,01 mol de cada substrato, 10 mL de organo-gel com C.V. lipase imobilizada (250mg/mL), 30 mL de hexano, 10 horas com agitação a 25°C.

As reações de esterificação do ácido oleico com álcoois alifáticos de cadeia normal mostraram que ocorre um aumento no rendimento do produto com o aumento da cadeia hidrocarbônica do álcool em até 10 carbonos com diminuição para homólogos superiores. O rendimento máximo de éster foi obtido com o 1-decanol, obtendo-se o produto com 82% de rendimento. Com álcoois de cadeia alquílica maiores, os rendimentos dos correspondentes oleatos foram um pouco menores, indicando que efeitos estéricos, além dos hidrofóbicos, também devem ser considerados e avaliados.

Quando álcoois ramificados foram utilizados, observou-se uma diminuição no rendimento, dependendo do tamanho da

ramificação e da proximidade desta com o grupo reativo hidroxila do álcool. Por exemplo, com o álcool terc-butanol a reação não ocorreu, evidenciando a importância de efeitos estéricos em reações biocatalisadas. A diminuição no rendimento causada pelas ramificações pode ser atribuída ao efeito de reconhecimento do sítio ativo da enzima. Assim, substratos impedidos estericamente não são alojados efetivamente no centro ativo para que possa ocorrer a catálise. Outro fator que pode interferir no rendimento das reações é a interação das ramificações com a parte apolar do surfactante, impedindo a difusão dos substratos na superfície da microemulsão gelificada onde se localiza o sítio ativo da enzima.

Com o afastamento das ramificações na cadeia do álcool, por exemplo para o isobutanol e isopentanol, os oleatos de isopropila e isopentila são formados com 47% e 89% respectivamente, mostrando claramente que o afastamento da ramificação é um fator importante para que o sistema realize efetivamente a catálise. O mesmo efeito foi observado para álcoois cíclicos. Por exemplo, na esterificação do ácido oleico com ciclo-hexanol o rendimento foi 61%. Rees e Nascimento⁵⁸, observaram um efeito semelhante quando a ramificação situava-se próxima ao centro eletrofílico de ácidos carboxílicos. Por exemplo, na esterificação do ácido pentanóico e do 2-metil-pentanóico com n-octanol, o rendimento foi de 93% após dois dias de incubação e 10% em sete dias de incubação, respectivamente, à temperatura ambiente¹³⁴. Okumura e colaboradores observaram também o mesmo efeito para álcoois secundários e terciários em sistema homogêneo com agitação¹³⁵.

Lipases de diferentes fontes (*Pseudomonas sp*, *Pâncreas do porco* (PPL) e *Candida cilindracea* (CCL)) também foram imobilizadas em organo-gel para verificar a eficiência catalítica na reação do ácido oleico com 1-pentanol. Os resultados estão expressos na tabela 3. Uma vez que a atividade específica das enzimas é uma indicação da pureza das mesmas, pode-se observar pelos resultados obtidos que a atividade influencia no rendimento dos produtos. De acordo com estas observações, o oleato de n-pentila foi obtido em melhor rendimento com a C.V. lipase imobilizada em organo-gel.

Tabela 3. Esterificação do ácido oleico com 1-pentanol utilizando lipases de diferentes fontes, imobilizadas em MBG a 25°C^{a, b}.

Lipases	Rendimento (%)
<i>Chromobacterium viscosum</i> ^c	68
<i>Microbial</i> ^d	62
<i>Pseudomonas sp</i> ^c	55
<i>Pâncreas do porco</i> ^f	—
<i>Candida cilindracea</i> ^e	—

(a) Dados reproduzidos da ref. [134]; (b) Todas as reações foram realizadas com 30 mL de hexano, 10g de MBG contendo 2,5 mg de enzima imobilizada com agitação por 10 horas; (c) 3335 unidades/mg de sólido; (d) 1600 unidades/mg de sólido; (e) 1900 unidades/ mg de sólido; (f) 70 unidades/ mg de sólido; (g) 1010 unidades/ mg de sólido.

Estes resultados mostram que a pureza da enzima é um fator que deve ser considerado quando se utiliza este sistema. Klibanov e col.¹³⁶⁻¹³⁹ já demonstraram que em sistema bifásico, lipases como a CCL e PPL de baixa atividade catalítica catalizam reações de esterificação de álcoois primários e secundários com diferentes ácidos alifáticos ou aromáticos e bons rendimentos.

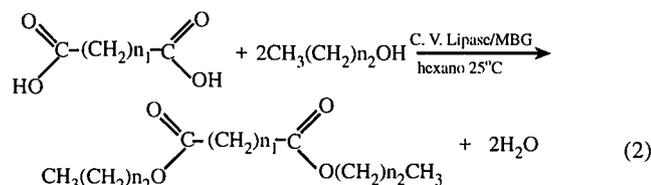
Okumura e col.¹³⁵ utilizaram lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* na esterificação do ácido oleico e 1-pentanol em meio homogêneo a 30°C e 16 horas de agitação. Observou-se

que a lipase de *Rhizopus delemar* foi a que mostrou resultados similares com *C.V.lipase* em organo-gel, obtendo-se o éster com 68% de rendimento. Com as demais enzimas, o rendimento ficou abaixo de 36%.

3.4 Síntese de Diésteres

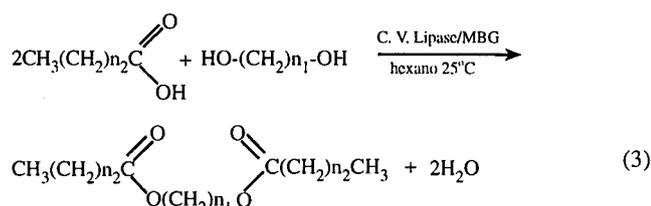
A *C.V.lipase*, enzima que demonstrou maior eficiência no sistema de organo-gel, foi imobilizada e utilizada para preparar uma série de diésteres derivados de ácidos dicarboxílicos e dióis contendo hidroxilas ligadas ao carbono primário¹⁴⁰.

Os ácidos dicarboxílicos e os álcoois alifáticos foram adicionados na proporção de 1:2 respectivamente, em hexano, sob agitação em banho maria tipo Dubnoff a 25°C com 10g de gel contendo 2,5 mg de lipase de *Chromobacterium viscosum* imobilizada (equação 2).



1($n_1 = 4, n_2 = 1$); 2($n_1 = 4, n_2 = 3$); 3($n_1 = 4, n_2 = 4$); 4($n_1 = 8, n_2 = 4$);
5($n_1 = 10, n_2 = 4$); 6($n_1 = 10, n_2 = 7$); 7($n_1 = 20, n_2 = 4$)

Um procedimento análogo foi utilizado para a esterificação de dióis a 25°C (equação 3).



8($n_1 = 2, n_2 = 4$); 9($n_1 = 2, n_2 = 10$);
10($n_1 = 8, n_2 = 4$); 11($n_1 = 8, n_2 = 8$)

A tabela 4 apresenta os resultados das reações de diesterificação dos dióis e diácidos¹⁴¹.

Tabela 4. Esterificação de ácidos dicarboxílicos e dióis catalisada pela *C.V.lipase* imobilizada em MBG a 25°C^a.

Composto	Rendimento (%)	Composto	Rendimento(%)
1	09	7	54
2	28	8	19
3	53	9	24
4	53	10	87
5	68	11	67
6	70		

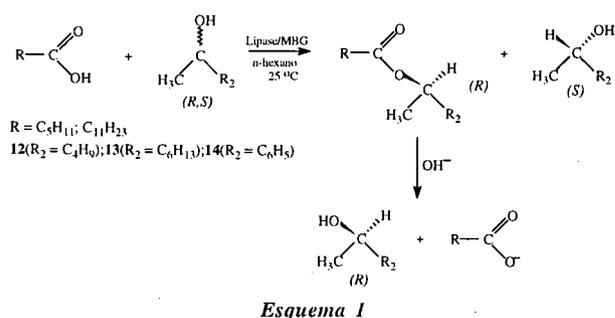
(a) As reações foram realizadas utilizando 0,02 moles de álcool alifático para 0,01 mol de diácido e 0,01 mol de diol para 0,02 mol de ácido alifático, 5 dias, 30 mL de hexano sob agitação magnética suave, 10g de organo-gel contendo 2,5 mg de *C.V.lipase* imobilizada.

Considerando os compostos 3, 4, 5 e 7 da tabela 4, onde reagiu-se diferentes diácidos com o 1-pentanol, podemos observar novamente uma dependência do tamanho da cadeia hidrocarbônica na catálise enzimática neste sistema, onde observou-se que o ácido dodecanodicarboxílico forma o correspondente diéster com 68% de rendimento em hexano como solvente externo. Quanto ao efeito do solvente, foi verificado que o ciclohexano e o heptano são solventes mais eficientes que o hexano na reação do ácido dodecanodicarboxílico com o 1-pentanol (rendimentos de 84% e 89%, respectivamente).

Com relação à esterificação dos dióis, também foi observada uma certa dependência com o comprimento da cadeia hidrocarbônica. Com base nestes resultados pode-se então dizer que o sistema por ter um grande caráter apolar, tende a se comportar melhor com substratos apolares. Ao utilizar-se substratos com cadeia alquílica grande no entanto, pode haver dificuldade na difusão no organo-gel até o sítio catalítico da lipase que se encontra no interior da microemulsão gelificada. O fato das lipases terem sua atividade catalítica aumentada na interface lipídio-água, característica única de catálise interfacial que faz com que elas apresentem um envolvimento hidrofóbico¹⁴², descarta a possibilidade da água da microemulsão interferir na catálise e, pode-se confirmar então que a dificuldade da catálise no sistema de organo-gel está relacionada basicamente com a estrutura do substrato e o caminho percorrido pelo mesmo. Muitos dióis são úteis para a síntese de compostos biologicamente ativos. Portanto, este sistema pode ser utilizado para estudo de reações com outros dióis com possíveis aplicações em fármacos e em acilação regioselectiva¹⁴³⁻¹⁴⁵.

3.5 Resolução de Álcoois Racêmicos

Diferentes lipases (*Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas sp*, *Microbial*, *Candida cylindracea*) foram imobilizadas em MBG e utilizadas para a resolução enzimática dos álcoois (±)2-hexanol, (±)2-octanol, (±)1-feniletanol via esterificação com os ácidos hexanóico e dodecanóico (Esquema 1). As reações foram realizadas adicionando-se em um erlenmeyer 25 mL de hexano, 20g de organo-gel com enzima imobilizada (2,5 mg de enzima para cada 10g de gel), 0,03 moles de ácido e 0,03 moles de álcool racêmico, sob agitação em um banho maria tipo Dubnoff termostatizado a 25°C durante 5 dias. Após este tempo, os géis foram separados do meio reacional, lavados com hexano e reutilizados. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada usando-se como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila (15:1). A separação do éster quiral foi realizada utilizando-se cromatografia em coluna com sílica gel 60 e hexano:acetato de etila (15:1) como eluente.



Os álcoois quirais, obtidos por hidrólise dos correspondentes (R)-ésteres, foram obtidos com excessos enantioméricos na faixa de 90 - 100% (Tabelas 5 e 6) e rendimentos entre 20 a 50% do éster isolado¹⁴⁶.

O sistema de organo-gel mostrou ser eficiente para a conversão assimétrica de álcoois secundários racêmicos, em comparação com resultados da literatura^{14-17,112-114}. Os substratos que mostraram ser mais adequados para utilizar este sistema em

Tabela 5. Resolução enzimática dos álcoois secundários racêmicos via esterificação com o ácido dodecanóico em MBG a 25°C^a.

Álcoois	Enzimas	Conversão (%)	Rend. éster isolado (%)	$[\alpha]^{20}_D$ (c, CHCl ₃) ^b	ee _s ^c (%)	ee _p ^d (%)	E ^e
12	<i>C.V.lipase</i>	40	33	-11,5 (1,1)	31	96	85
	<i>Microbial</i>	27	23	-12,1 (3,1)	20	100	>100
	<i>Pseudomonas sp</i>	22	15	-11,8 (9,1)	20	97	79
13	<i>C.V.lipase</i>	43	46	-9,8 (6,4)	36	99	>100
	<i>Microbial</i>	29	40	-9,2 (7,4)	19	93	32
	<i>Pseudomonas sp</i>	20	28	-9,4 (5,1)	12	95	45
14	<i>C.V.lipase</i>	40	35	+41,9 (2,8)	46	98	>100
	<i>Microbial</i>	33	29	+40,4 (3,1)	15	94	36
	<i>Pseudomonas sp</i>	18	27	+41,5 (3,9)	52	97	>100

(a) Os dados foram reproduzidos das ref. [141] e [146]; (b) rotação óptica do álcool reativo derivado da hidrólise do éster; (c) ee_s é o excesso enantiomérico do álcool não reativo; (d) ee_p é o excesso enantiomérico do álcool derivado do éster; (e) E é a razão enantiomérica calculada pela equação: $E = \ln[(1 - C)(1 - ee_s)] / \ln[(1 - C)(1 + ee_s)]$ onde $C = ee_s / ee_s + ee_p$, ref.[147] e [148].

Tabela 6. Resolução enzimática dos álcoois secundários racêmicos via esterificação com o ácido hexanóico em MBG a 25°C^a.

Álcoois	Enzimas	Conversão (%)	Rend. éster isolado (%)	$[\alpha]^{20}_D$ (c, CHCl ₃) ^b	ee _s ^c (%)	ee _p ^d (%)	E ^e
12	<i>C.V.lipase</i>	26	31	-12,0 (6,0)	8	99	>100
	<i>Microbial</i>	20	14	-11,7 (4,9)	8	97	66
	<i>Pseudomonas sp</i>	16	11	-11,3 (3,1)	5	94	29
13	<i>C.V.lipase</i>	18	32	-9,3 (5,4)	10	94	37
	<i>Microbial</i>	16	26	-9,4 (3,5)	5	95	41
	<i>Pseudomonas sp</i>	15	20	-9,4 (3,0)	7	95	38
14	<i>C.V.lipase</i>	25	32	+41,5 (3,5)	24	97	90
	<i>Microbial</i>	23	28	+40,2 (6,0)	13	94	40
	<i>Pseudomonas sp</i>	17	22	+40,1 (1,6)	15	93	32

(a) Os dados foram reproduzidos das ref. [141] e [146]; (b) rotação óptica do álcool reativo derivado da hidrólise do éster; (c) ee_s é o excesso enantiomérico do álcool não reativo; (d) ee_p é o excesso enantiomérico do álcool derivado do éster; (e) E é a razão enantiomérica calculada pela equação: $E = \ln[(1 - C)(1 - ee_s)] / \ln[(1 - C)(1 + ee_s)]$ onde $C = ee_s / ee_s + ee_p$, ref.[147] e [148].

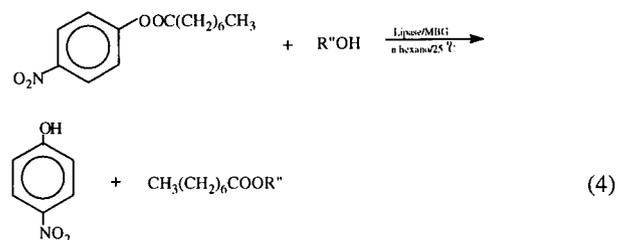
conversão assimétrica são aqueles com cadeia hidrocarbônica grande, como por exemplo, o ácido dodecanóico mostrou ser um bom substrato para resolver álcoois secundários racêmicos.

Os resultados experimentais da resolução enzimática no sistema de organo-gel mostraram que a enzima mantém sua atividade catalítica e enantiosseletividade quando imobilizada neste sistema. Além disso, não tem tantos inconvenientes como outros métodos cujo biocatalisador está em contato direto com o solvente^{125,127,130} e/ou utilizam uma alta concentração de enzima (200 mg a 13g) para realizar cada experimento^{149,150}.

Portanto, o sistema de organo-gel pode ser empregado com sucesso para a resolução de álcoois secundários racêmicos. Hinze e col.¹⁵¹ empregaram o sistema para a esterificação enantiosseletiva do ácido 2-metilbutírico e seus resultados indicam claramente que o uso do organo-gel contendo enzimas imobilizadas ou outros biocatalisadores é uma alternativa atraente e viável para se conduzir reações enzimáticas em meio orgânico.

3.7 Reação de Transesterificação

Estudos cinéticos foram realizados utilizando-se lipases imobilizadas em organo-gel (*Chromobacterium viscosum*, *Microbial* e *Pseudomonas sp*) para as reações de transesterificação entre o octanoato de p-nitrofenila com os álcoois alifáticos (n-pentanol, n-hexanol, n-octanol e (±) 2-butanol) conforme a equação 4. As reações foram acompanhadas espectrofotometricamente a 25°C, observando-se a formação do p-nitrofenol em 307 nm.



Para acompanhar o desenvolvimento das reações, realizou-se alguns testes variando-se a polaridade do solvente com a finalidade de extrair o p-nitrofenol do interior do organo-gel. Os solventes utilizados foram os seguintes: heptano, ciclohexano, clorofórmio, 1,4-dioxano e acetonitrila. O heptano e o ciclohexano, análogos ao hexano em termos de polaridade, não extraíram o p-nitrofenol do organo-gel para o solvente externo. Por outro lado, o clorofórmio destruiu a estrutura macroscópica original do organo-gel. Resultados análogos foram encontrados com a água, acetona e ácido acético¹³⁴. Apenas a acetonitrila e 1,4-dioxano mostraram-se efetivos e puderam ser utilizadas como solvente externo na reação de transesterificação¹⁵².

As reações foram realizadas adicionando-se em um erlenmeyer 15 mL de octanoato de p-nitrofenila (1×10^{-4} M) e 15 mL de álcool (5×10^{-3} M), 10g de organo-gel contendo lipase imobilizada, sob agitação em banho maria tipo Dubnoff termostatizado a

Tabela 7. Valores de constantes de velocidade observada (k_{obs}) para a reação de transesterificação entre o octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos em MBG a 25°C^a.

Enzima	$k_{obs} \times 10^4, s^{-1}$							
	1-pentanol		1-hexanol		1-octanol		2-butanol	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
<i>C.V. lipase</i> ^b	4,56	4,54	4,03	4,08	3,27	2,63	1,74	2,04
<i>Pseudomonas sp</i> ^c	3,70	3,59	2,31	2,12	1,84	1,58	1,29	1,16
Microbial ^d	2,17	1,80	2,07	1,59	1,68	1,33	1,00	1,16

(A) acetonitrila; (B) 1,4-dioxano. Os valores dos coeficientes de correlação da reta de $\log(A_{\infty} - A_t)$ vs $t(s)$, foram sempre maiores que 0,99. Temperatura: 25°C. (a) Os dados foram reproduzidos da ref. [141]; (b) 3970 unidades/mg de sólido; (c) 1900 unidades/mg de sólido; (e) 1600 unidades/ mg de sólido.

25°C (equação 4). Em intervalos de tempos regulares, alíquotas de 3,0 mL foram retiradas e analisadas por espectroscopia UV-visível. A partir de dados de absorvância em 307 nm foi possível conhecer a concentração do produto em tempos pré-determinados, e com auxílio de um programa iterativo foram obtidos os valores de k_{obs} mostrados na tabela 7¹⁴¹.

As constantes de velocidade obtidas para estas reações no sistema MBG mostraram que as mesmas estão associadas tanto com o tamanho das cadeias hidrocarbônicas como com a atividade específica da enzima utilizada.

Um outro fator a ser considerado é o efeito da polaridade do meio. Embora os dois solventes utilizados como meio externo na reação de transesterificação, 1,4-dioxano e acetonitrila, apresentem polaridades diferentes, não se observou diferenças significativas nos valores das constantes de velocidades observadas. Por exemplo, considerando-se a reação entre o octanoato de p-nitrofenila e o n-pentanol em 1,4-dioxano e acetonitrila, os valores de k_{obs} são $4,54 \times 10^{-4} s^{-1}$ e $4,56 \times 10^{-4} s^{-1}$, respectivamente. Estes resultados podem também estar associados com o coeficiente de partição ($\log P$) das substâncias, o qual por sua vez está relacionado com a polaridade do solvente.

Os dados das constantes de velocidade mostram ainda que a *C.V.lipase* é o catalisador mais efetivo nestas reações e que dependem do comprimento da cadeia do álcool e do solvente utilizado. Esta observação pode ser relacionada com a atividade específica das enzimas empregadas. De maneira geral, nestas reações, foi observado que há uma diminuição no valor da constante de velocidade na transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com álcoois alifáticos, à medida que são utilizados álcoois com cadeias hidrocarbônicas maiores. Esta diminuição na constante de velocidade se acentua quando utiliza-se álcoois com ramificações próximas ao grupamento hidroxila. Este efeito da diminuição no k_{obs} devido às ramificações na cadeia do álcool está de acordo com as observações feitas para a síntese de diésteres, devido a dificuldade que estes substratos tem para se difundirem no organo-gel.

CONCLUSÕES

O sistema de organo-gel mostrou ser eficiente para imobilização de enzimas e para sua aplicação em síntese orgânica. Vantagens como a fácil preparação, facilidade para separar os produtos do biocatalisador e conservação das propriedades enzimáticas foram algumas das características apresentadas por este sistema. Além disso, em contraste com outros processos comumente usados, o sistema de organo-gel (MBG) apresenta um baixo conteúdo de água, tem a vantagem de ser reprodutível, é termodinamicamente estável e transparente, utiliza baixa concentração de enzima (250µg/mL) e pode ser reutilizado.

PERSPECTIVAS

As futuras aplicações do sistema de organo-gel (MBG) são muito promissoras, principalmente para imobilização de proteínas e outras biomoléculas que atuam como catalisadores na

síntese orgânica moderna. A utilização na resolução de fármacos racêmicos, nas várias etapas de síntese, são campos a serem explorados utilizando este sistema. Estudos para a elucidação da própria estrutura do organo-gel e sua interação com biomoléculas, a utilização de diferentes surfactantes, o estudo de difusão, ainda são pontos pouco estudados e que podem ser melhor explorados. Finalmente, deve-se mencionar que o sistema de organo-gel abre um novo caminho para a exploração de enzimas em síntese orgânica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro concedido pela CAPES, CNPq, FINEP- PADCT I e II.

REFERÊNCIAS

- Jones, J. B.; *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351.
- Senanayake, C. H.; Bill, T. J.; Larsen, R. D.; Leazer, J.; Reider, P. J.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5901.
- Boland, W.; Frobi, C.; Lorenz, M.; *Synthesis* **1991**, 12.
- Whitesides, G. M.; Wong, C. H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *24*, 217.
- Cremonesi, P.; Carrea, G.; Sportoletti, G.; Antonini, E.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *159*, 7.
- Buckland, B. C.; Dunnili, P.; Lilly, M. D.; *Biotechnol. Bioeng* **1975**, *159*, 815.
- Blain, J. A.; Patterson, J. D. E.; Shaw, C. E. L.; *FEMS Microbial Lett* **1978**, *3*, 85.
- Antonini, E.; Carrea, G.; Cremonesi, P.; *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 291.
- Semenov, A. N.; Cerovsky, V.; Titov, M. I.; Martinek, K.; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 2963.
- Natarajan, K. R.; *J. Chem. Educ.* **1991**, *68*, 13.
- Kise, H.; Hayakawa, A.; Noriton, H.; *J. Biotechnol.* **1991**, *14*, 239.
- Pottie, M.; Eycken, J. V.; Vandewalle, M.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5319.
- Kalbe, J.; Hocker, H.; Berndt, H.; *Chromatographia* **1989**, *28*, 193.
- Bianchi, D.; Cesti, P.; Battistel, E.; *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5531.
- Morgan, B.; Oehlschlager, A. C.; Stokes, T. M.; *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1611.
- Klibanov, A. M.; Cambou, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2687.
- Klibanov, A. M.; Kirchner, G.; Scollar, M. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072.
- Inada, Y.; Nishimura, H.; Takahashi, K.; Yoshimoto, T.; Saha, A. R.; Saito, Y.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *122*, 845.
- Takahashi, K.; Ajima, A.; Yoshimoto, T.; Okada, M.; Matsushima, A.; Tamaura, Y.; Inada, Y.; *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3414.
- Kodera, Y.; Takahashi, K.; Nishimura, H.; Matsushima,

- A.; Saito, Y.; Inada, Y.; *Biotechnol. Lett.* **1986**, *8*, 881.
21. Nishio, T.; Takahashi, K.; Tsuzuki, T.; Yoshimoto, T.; Kodera, Y.; Matsushima, A.; Saito, Y.; Inada, Y.; *J. Biotechnol.* **1988**, *8*, 39.
 22. Inada, Y.; Matsushima, A.; Takahashi, K.; Saito, Y.; *J. Bioactive and Compatible Polimers* **1990**, *5*, 343.
 23. Barbaric, S.; Luisi, P. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4239.
 24. Menger, F. M.; Yamada, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6731.
 25. Luisi, P. L.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 439.
 26. Wong, M.; Thomas, J. K.; Novak, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4730.
 27. Martinek, K.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L.; Berezin, I. V.; *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **1977**, *236*, 920.
 28. Levashov, A. V.; Khmel'nitsky, Y. L.; Klyachko, N. L.; Chernyak, V.Y.A.; Martinek, K.; *J. Colloid Interface Sci.* **1982**, *88*, 444.
 29. Jain, T. K.; Varshney, M.; Maitra, A. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 7409.
 30. Shapiro, Y. E.; Budanov, N. A.; Levashov, A. V.; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1989**, *54*.
 31. Berezin, I. V.; Martinek, K.; *Annals. New York Academy of Sciences* **1984**, *434*, 577.
 32. Martinek, K.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L.; Pantin, V. I.; Berezin, I. V.; *Biochem. Biophys. Acta* **1981**, *657*, 277.
 33. Rahaman, R. S.; Halton, T. A.; *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 1799.
 34. Ruckenstein, E.; Karpe, P.; *J. Colloid Sci.* **1990**, *149*, 408.
 35. Lüthi, P.; Luisi, P. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7285.
 36. Martinek, K.; Klyachko, N. L.; Kabanov, A. V.; *Biochem. Biophys. Acta* **1989**, *981*, 661.
 37. Martin, C.; Magid, L.; *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 3938.
 38. Fletcher, P. D. I.; Freedman, R. B.; Mead, J.; *J. Colloid Surfaces.* **1984**, *10*, 193.
 39. Fletcher, P. D. I.; Robinson, B. H.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1* **1985**, *81*, 2667.
 40. Fletcher, P. D. I.; Freedman, R. B.; Robinson, B. H.; *Biochem. Biophys. Acta* **1987**, *912*, 278.
 41. Derksen, J. T. P.; Cuperus, F. P.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 937.
 42. Haering, G.; Luisi, P. L.; *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 5892.
 43. Robinson, B. H.; *Chem. in Br.* **1991**, *4*, 342.
 44. Atkinson, P. J.; Grinson, M. J.; Heenan, R. K.; Howe, A. M.; Robinson, B. H.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, *50*, 1807.
 45. Danielson, I.; Lindman, B.; *Colloid and Surfaces* **1981**, *3*, 391.
 46. Menger, F. M.; *Chem. in Br.* **1993**, 300.
 47. Quillet, C.; Eicke, H. F.; *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 4211.
 48. Quillet, C.; Eicke, H. F.; *Chimia.* **1987**, *40*, 233.
 49. Quillet, C.; Eicke, H. F.; *Europhys Lett.* **1989**, *9*, 293.
 50. Quillet, C.; Eicke, H. F.; Xu, G.; *Makromol Chem. Rapid Commun.* **1990**, *11*, 217.
 51. Quillet, C.; Eicke, H. F.; Sager, W.; *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5642.
 52. Atkinson, P. J.; Grinson, M. J.; Heenan, R. K.; *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *151*, 49446.
 53. Howe, A. M.; Katsikides, A.; Robinson, B. H.; *Prog. Colloid. Polym. Sci.* **1988**, *76*, 211.
 54. Atkinson, P. J.; Grinson, M. J.; Heenan, R. K.; Howe, A.M.; Robinson, B. H.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1807.
 55. Atkinson, P. J.; Clark, D. C.; Howe, A. M.; *Prog. Colloid. Polym. Sci.* **1991**, *84*, 129.
 56. Atkinson, P. J.; Robinson, B. H.; *Spec. Publ. -R. Soc. Chem.* **1991**, *82*, 542.
 57. Petit, C.; Zemb, Th.; Pileni, M. P.; *Langmuir* **1991**, *7*, 223.
 58. Nascimento, M. G.; Rees, G. D.; Jenta, T. R. J.; Robinson, B. H.; *Atual. de Físico-Química Orgânica.* **1989**, 520.
 59. Rees, G. D.; Nascimento, M. G.; Jenta, T. R. J.; Robinson, B. H.; *Biochem. Biophys. Acta* **1991**, *1073*, 493.
 60. Nascimento, M. G.; Rezende, M. C.; Vecchia, R. D.; Jesus, P. C.; Aguiar, L. M. Z.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5891.
 61. Rees, G. D.; Jenta, T. R. J.; Nascimento, M. G.; Catauro, M.; Robinson, B. H.; Stephenson, G. R.; Olphert, R. D. G.; *Indian J. Chem.* **1993**, *32*, 30.
 62. Rees, G. D.; Robinson, B. H.; *Advanced Materials* **1993**, *5*, 608.
 63. Aguiar, L. M. Z.; Nascimento, M. G.; Prudencio, G. E.; Rezende, M. C.; Vecchia, R. D.; *Quím. Nova* **1993**, *16*, 414.
 64. Gutman, A. L.; Zuobi, K.; Guibe, J. E.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2037.
 65. Castro, H. F.; Anderson, W.A.; *Quím. Nova* **1995**, *18*, 544.
 66. Cambou, B.; Klivanov, A. M.; *Biotechnol. and Bioeng.* **1984**, *26*, 1449.
 67. Wang, Y. F.; Chen, S. T.; Liu, K. C.; Wong, C. H.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1917.
 68. Meltz, M.; Saccomano, N. A.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1201.
 69. Barth, S.; Effenberger, F.; *Tetrahedron Asymmetry.* **1993**, *4*, 823.
 70. Takarata, H.; Uchida, Y.; Takefumi, M.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3331.
 71. Djeghaba, Z.; Deleuze, H.; Dejeso, B.; Messadi, D.; Maillard, B.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 761.
 72. Tuccio, B.; Ferre, E.; Comeau, L.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2763.
 73. Brieva, R.; Rebolledo, F.; Gotor, V.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1386.
 74. Rebolledo, F.; Brieva, R.; Gotor, V.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5345.
 75. Gotor, V.; Brieva, R.; Rebolledo, F.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6973.
 76. Margolin, A. L.; Klivanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3802.
 77. Carrera, G.; *Trends in Biotechnol.* **1984**, *2*, 102.
 78. Sugai, T.; Ohsawa, S.; Yamada, H.; Ohta, H.; *Synthesis.* **1990**, 1112.
 79. Makita, A.; Nihira, T.; Yamada, Y.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 805.
 80. Sih, C. J.; Chen, C. S.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695.
 81. Klivanov, A. M.; *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 144.
 82. Gu, Q. M.; Chem. C. S.; Sih, C. J.; *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1763.
 83. Bianchi, D.; Bosetti, A.; Cesti, P.; Golini, P.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3231.
 84. Ottolina, G.; Carrera, G.; Riva, S.; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2366.
 85. Bevinakatti, H. S.; Banerti, A. A.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6003.
 86. Brieva, R.; Crich, J. E.; Sih, C. J.; *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1068.
 87. Hanson, R. L.; Baneryee, A.; Comezoglu, F. T.; *Tetrahedron Asymmetry.* **1994**, *5*, 1925.
 88. Bianchi, D.; Moraschini, P.; Bosetti, A.; Cesti, P.; *Tetrahedron Asymmetry.* **1994**, *5*, 1917.
 89. Margolin, A. L.; *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 266.
 90. Raju, S. B.; Chiou, T. W.; Tai, D. F.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 1519.
 91. Zhang, F. J.; Sih, C. J.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9289.
 92. Lundell, K.; Kanerva, L.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 2281.

93. Langrand, G.; Baratti, J.; Buon, G.; Triantaphylides, C.; *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 29.
94. Faber, K.; Rinda, S.; *Synthesis* **1992**, *10*, 895.
95. Pottie, M.; Eycken, J. N.; Vandewalle, M.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5319.
96. Naemura, K.; Fukuda, R.; Takahashi, N.; Konishi, M.; Hirose, Y.; Tobe, Y.; *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, *4*, 911.
97. Toone, E. J.; Jones, B.; *Tetrahedron Asymmetry* **1991**, *2*, 207.
98. Phung, A. N.; Braun, J.; Goffic, F. L.; *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 1783.
99. Seu, Y. B.; Lim, T. K.; Kim, C. J.; Kang, S. C.; *Tetrahedron Asymmetry.* **1995**, *6*, 3009.
100. Kang, S. K.; Jeon, J. H.; Yamaguchi, T.; Kim, J. S.; Ko, B. S.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 2139.
101. Sonnet, P. E.; *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3477.
102. Morgan, B.; Dehlschlager, A. C.; Stokes, T. M.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3231.
103. Chen, C. S.; Liu, Y. C.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1966.
104. Okahata, Y.; Hatano, A.; Jjiro, K.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *6*, 1311.
105. Chadha, A.; Manottar, M.; *Tetrahedron Asymmetry.* **1995**, *6*, 651.
106. Melts, M.; Saccomano, N. A.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1201.
107. Wang, Y. F.; Chen, S. T.; Liu, K. C.; Wong, R. H.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1917.
108. Chulalaksananukul, W.; Condoret, J. S.; Combes, D.; *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 293.
109. Lundh, M.; Nordin, O.; Hedenstrom, M.; Hogberg, H. E.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 2237.
110. Orrenius, C.; Ohner, N.; Rotticci, D.; Mattson, A.; Hult, K.; Norin, T.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 1217.
111. Orrenius, C.; Norin, T.; Hult, K.; Carrera, G.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 3023.
112. Langrand, G.; Secchi, M.; Buono, G.; Baratti, J.; Triantaphylides, C.; *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1857.
113. Kikawa, S.; Takahashi, K.; Katada, T.; Inada, Y.; *Biochem. Int.* **1989**, *19*, 1125.
114. Morgan, B.; Oehlschlager, A. C.; Stokes, T. *Tetrahedron.* **1991**, *47*, 1611.
115. Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A.; Santaniello, E.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1992**, 1159.
116. Itoh, T.; Takagi, Y.; Nishiyama, S. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1521.
117. Cotterill, I. C.; Sutherland, A. G.; Roberts, S. M.; Grobbauer, R.; Spreite, J.; Fabar, K.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1991**, 1365.
118. Carretero, J. C.; Domingues, E.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3867.
119. Milton, J.; Brand, S.; Jones, M. F.; Rayner, R. M.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 1903.
120. Baldoli, C.; Maiorana, S.; Carrera, G.; Riva, S.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 767.
121. Yokomatsu, T.; Nakabayashi, N.; Matsumoto, K.; Shibuya, S.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 3055.
122. Tanaka, A.; Yamamoto, H.; Oritani, T.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 1273.
123. Kawanami, Y.; Moriya, H.; Got, Y.; Tsukao, K.; Hashimoto, M.; *Tetrahedron.* **1996**, *52*, 565.
124. Zaks, A.; Klivanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2767.
125. Sakurai, T.; Margolin, A. L.; Russel, A. J.; Klivanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7236.
126. Kitaguchi, H.; Fitzpatrick, P. A.; Huber, J. E.; Klivanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *111*, 3094.
127. Hirose, Y.; Kariya, K.; Sasaki, F.; Kurono, Y.; Ebiike, H.; Achiwa, K.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7157.
128. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; *Biotechnol. and Bioeng.* **1987**, *30*, 81.
129. Rubio, E.; Mayorales, A. F.; Klivanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 659.
130. Klivanov, A. M.; Tawaki, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1882.
131. Fitzpatrick, P. A.; Klivanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3166.
132. Parida, S.; Dordick, J. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2253.
133. Terradas, F.; Henry, T. M.; Fitzpatrick, P. A.; Klivanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 390.
134. Vecchia, R. D.; *Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, SC.* **1994**.
135. Okumura, S.; Iwai, M.; Tsujisaka, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *575*, 156.
136. Klivanov, A. M.; Cambou, B.; *Methods in Enzymology.* **1987**, *136*, 117.
137. Klivanov, A. M.; Martinek, K.; Samokhin, G. P.; etal. *Bioorgan. Khim.* **1977**, *3*, 696.
138. Klivanov, A. M.; Samokhin, G.P.; Martinek, K.; *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, *19*, 1351.
139. Klivanov, A. M.; Kazandjian, R. Z.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5448.
140. Burlin, G.; Jesus, P. C.; Nascimento, M. G.; *Livro de Resumos da 17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* **1994**, QO-140.
141. Jesus, P. C.; João, J.J.; Silva, P.L.F.; Burlin, G.; Nascimento, M. G.; *Anais do 2º Seminário Internacional de Tecnologia Enzimática.* **1995**, 2.
142. Biockman, H.; Monsen, W. E.; Tsujita, T.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 891.
143. Jansen, A. J. M.; Kunder, A. J. H.; Zwanenburg, B.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *47*, 7400.
144. Tsuj, K.; Terao, Y.; Achiwa, K.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6189.
145. Margolin, A. L.; *Chemtech.* **1991**, 60.
146. Jesus, P. C.; Rezende, M. C.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 63.
147. Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294.
148. Chen, C. S.; Wu, S. H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812.
149. Baldoli, C. Mairana, S.; Carrera, G.; Riva, S.; *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, *4*, 767.
150. Gutman, A. L.; Brenner, D.; Boltanski, A.; *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, *4*, 839.
151. Hinze, W. L.; Vemasu, I.; *Chirality.* **1994**, *6*, 649.
152. João, J. J.; Nascimento, M. G.; *Livro de Resumos da 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.* **1995**, QO-009.