UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Resolução de derivados racêmicos do *mio*-inositol catalisada por lipases

Evelin Andrade Manoel

2011

Resolução de derivados racêmicos do *mio*-inositol catalisada por lipases

Evelin Andrade Manoel

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores:

Maria Alice Zarur Coelho (EQ/UFRJ)
Denise Maria Guimarães Freire (IQ/UFRJ).

Escola de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

2011

Ficha Catalográfica

MANOEL, EVELIN ANDRADE

Resolução de derivados racêmicos do *mio*-inositol catalisada por lipases

[Rio de Janeiro] – 2011.

117 p.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2011.

Orientador: Profa. Dra. Maria Alice Zarur Coelho

Profa. Dra. Denise Maria Guimarães Freire

1. Resolução enantiomérica. 2. *myo*-inositol. 3. Catálise. 4. Lipase. 5. Substâncias bioativas–

I. EQ/UFRJ.

II. Título (Série)

Evelin Andrade Manoel

Resolução de derivados racêmicos do *mio*-inositol catalisada por lipases

Dissertação submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em ciências.

Aprovada por:

Orientadores

Prof.ª Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc. (EQ-UFRJ)

Prof.ª Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc (IQ-UFRJ)

Banca Examinadora

Prof.º Alessandro Bolis Costa Simas, D.Sc. (NPPN-UFRJ)

Prof.ª Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc. (EQ-UFRJ)

Prof.º Reginaldo Ramos de Menezes, D. Sc.(IQ-UFRJ)

Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

2011

Dedicatória

Aos meus amigos, companheiros
que juntos me trouxeram ao mundo...
Aos meus queridos pais, Jorge e Rosa, amo vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e perseverança para superar as dificuldades e realizar todo o trabalho.
Aos meus orientadores, Profa. Maria Alice Zarur Coelho e Profa. Denise Maria Guimarães Freire, 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. Alessandro Bolis Costa Simas (NPPN) pela colaboração neste trabalho, pela livre entrada e permanência em seu laboratório e, sobretudo, pela livre utilização de seus reagentes e colunas para o HPLC. A sua contribuição foi muito além do que uma simples colaboração.
Aos meus pais, Jorge e Rosa, e irmã, Erika, pelo amor, carinho, compreensão, apoio, paciência incondicionais.
Em especial, a Aline Gomes Cunha pela mão amiga, por ter se tornado uma irmã, pela participação ativa no trabalho, pelas inúmeras horas de experimentos e injeções no HPLC, pela ajuda principalmente no início dos experimentos e pelo carinho e conselhos nas horas vagas. Aprendi muito com você!
Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana e do Laboratório de Microbiologia Molecular e de Proteínas, o "lambim" que além da colaboração, fizeram do ambiente de trabalho um lugar mais divertido e familiar.
Aos meus queridos companheiros Marcelo Holanda, em especial pela paciência, pelo carinho, pelas alegrias nos tempos vagos; Luiz Fernando Tavares, pelo ombro amigo de sempre; Sérgio Cantum, por toda atenção e carinho; a Jaqueline Oliveira, pelo carinho, atenção e pelas caronas à UFRJ, rs; Paty, Rafael Andrade, Joab, Lívia, Mateus Godoy, Carol, Melissa Gutarra, Val, Lu e Bruno por sempre estarem dispostos a me ajudar. E ainda, a Aline Fernandes, pelas ajudas na concessão de materiais e por sempre estar disposta a ajudar.
Aos professores do laboratório Lammp, Rodrigo, Bianca e Marcia pela livre entrada e permanência em seu laboratório durante todo o período do curso.
Aos amigos do laboratório de Enzimologia (EQ), em especial ao amigo Bernardo, pelas dicas no ramo profissional. Aos amigos do curso de mestrado Roberta Giovanini, Tiago, Gisele Costa, Diogo Simas e Erika Aguilheiras, por todo carinho e pela nossa eterna amizade.
Aos amigos Suema Branco, Roberto Abrante, Valéria, amigos de graduação sempre presentes na minha vida. Obrigada por compreender a minha ausência no período do mestrado.
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...

A Secretaria da Escola de Química, principalmente Roselee, por sempre estar alegre e pronta a ajudar a nós, alunos da pós-graduação e coordenação do curso de pós-graduação.
A CAPES pela bolsa de mestrado no primeiro ano e a FAPERJ pela bolsa Nota 10 no último ano.
A todas as demais pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

“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 da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Evelin Andrade Manoel

Fevereiro/2011

Orientadores : Prof^{a}. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc. (EQ-UFRJ)

Prof^{a}. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc (IQ-UFRJ)

Lipases são frequentemente usadas em processos de biotransformação industrial e se destacam, dentre inúmeros fatores, pela estabilidade em solventes orgânicos, não exigência de cofatores na reação e pela capacidade de discriminar entre grupos enantiotópicos e racematos de enantiômeros, revelando uma alta regio-, chemo- e estereosseletividade. Dentro deste contexto, derivados de *mio*-inositol foram utilizados como material de partida (substrato) nas reações visando à resolução racêmica catalisada por lipases. O interesse na obtenção de derivados de *mio*-inositois enantiomericamente puros, deve-se a grande versatilidade em síntese química, principalmente na síntese de novas drogas e na importância da sinalização celular como segundo mensageiro. O presente trabalho empregou 15 diferentes lipases comerciais em um *screening* com vistas à obtenção da resolução cinética dos racematos, de cada um dos três derivados de *mio*-inositóis: (±)-1,4,5,6-tetra-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-1); (±)-1,4,5,6-tetra-*O*-alil-*mio*-inositol (*rac*-2) e (±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-3) previamente sintetizados no Lab. Roderick Barnes, NPPN-UFRJ. A resolução de *rac*-3 foi obtida com êxito quando as lipases de *Candida antarctica* (CALB) e a de *Pseudomonas cepacia*, imobilizada em dois diferentes suportes, foram empregadas nas reações. A influência do solvente e do agente acilante mostraram afetar grandemente a enantiosseletividade na reação. Os melhores resultados com a lipase CALB (112h) foram obtidos quando acetato de vinila foi utilizado em sistema livre de solvente, com 43,5% de conversão, 97,7% de ee_p e E>200. Os melhores resultados com PSC amano II (96h) foram obtidos quando TBME foi utilizado como solvente na reação com 49,9% de conversão, ee_p de 99% e E>200. Já para PS-IM (48h), os melhores resultados foram obtidos quando acetato de vinila, em sistema livre de solvente, foi empregado obtendo 48% de conversão, ee_p de 98% e E>200. A técnica de planejamento experimental foi empregada e as condições ótimas obtidas pela equação modelo foram T = 30°C, S = 2 mg/mL, H_2O = 0% m/v e E = 40 mg/mL. Com o uso do planejamento experimental foi possível reduzir o tempo de reação para 24h, obtendo valores próximos ao máximo de conversão e excesso enantiomérico. Os resultados obtidos com a resolução cinética de *rac*-3 mostraram a formação de um produto inédito, L-1-*O*-acetil-2,3-O-ciclohexilideno-*mio*-inositol com 48 % conversão e ee_p de 98%.

Abstract of a Final Project presented to EQ/ UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ABSTRACT

Lipases are frequently used in industrial biotransformation processes and are distiguished, amongst several factors, for the stability in organic solvents, no requirement for cofactors in the reaction, for the hability of distinguish between enantiotopic group and racemates of enantiomers, revealing high regio-chemo stereoselectivity, and also presenting high specificity on diferent substrates. In this context, *mio*-inositol derivates were used as starting material (substrate) in racemic resolution catalyzed by lipases. The interest in the attaninment of enantiomerically pure *mio*-inositol derivates comes from their versatility in chemical synthesis, primarily in the synthesis of new drugs and in the cellular signalization as second messenger. The present work used 15 different comercial lipases in a screening to each one of the three *mio*-inositol derivates (±)-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*mio*-inositol (*rac*-1); (±)-1,4,5,6-tetra-*O*-alyl-*mio*-inositol (*rac*-2) e (±)-1,3,4-tri-*O*-benzyl-*mio*-inositol (*rac*-3) previously synthetized in Lab. Roderick Barnes, NPPN-UFRJ. The resolution of *rac*-3 was sucessfully achieved when *Candida antarctica* Lipase B (CALB) and *Pseudomonas cepacia* lipase, immobilized in two diferent suports, were used in the reaction. The influence of both the solvent and the acyl donor stongly affected the reaction's enantioselectivity. The best results obtained with CALB (112h) were when vinyl acetate was used in a solvent free system, with 43,5% conversion and 97,7% ee_p e E> 200. The best results with PSC amano II (96h)) were when TBME was used as solvent in the reaction with 49,9% conversion and ee_p de 99% e E>200. Finally for PS-IM (48h), the best results were obtained when vinyl acetate was used in solvent free system, obtaining 48% conversion, ee_p de 98% and E>200. The Experimental design was used and the optimal conditions obtained for the model equation were T = 30°C, S = 2 mg/mL, H_2O = 0% m/v and E = 40 mg/mL. With the use of the Experimental design was possible to reduce the time of reaction to 24h, obtaining values similar to the highest conversion and enantiomeric excess. The results obtained with the kinectic resolution of *rac*-3 showed the formation of an unreported product, L-1-*O*-acetyl-2,3-O-ciclohexyliden-*mio*-inositol with 48 % conversion and ee_p de 98%.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Rotas para a obtenção de compostos enantiomericamente puros 2
2. JUSTIFICATIVA 3
3. OBJETIVOS 5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
4.1. Lipases 6
4.1.1. Estrutura proteica de Lipases 8
4.1.2. Fenômeno da ativação interfacial em Lipases 9
4.1.3. Aplicação de lipases em síntese orgânica 14
4.1.4. Principais microrganismos utilizados para lipases 15
4.2. Aplicação de lipases na síntese de fármacos 16
4.3. Lipases de *Pseudomonas* sp. e *Candida* sp 17
4.4. Mecanismo Cinético de lipases 20
4.4.1. Resolução de racematos catalisada por lipases 23
4.5. Influência do solvente a da atividade de água 24
4.6. Quiralidade e Resolução Cinética de enantiômeros 30
4.7. Inositóis 33
4.8. Síntese de (±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-3) 36
4.9. Otimização do processo utilizando derivados do *mio*-inositol pela técnica de planejamento experimental 36
4.9.1. Testes estatísticos para a verificação da adequação do modelo 38
5.0. MATERIAIS E MÉTODOS 41
5.1. Síntese dos substratos 42
5.2. Acetilação dos substratos sintetizados *rac*-1, *rac*-2 e *rac*-3 42
5.3. Efeito do agente acilante na conversão e na enantiosseletividade 43
5.4. Efeito do solvente na conversão e na enantiosseletividade 44
5.5. Métodos Analíticos 44
5.5.1. Análise por CCF 44
5.5.2. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das reações de acetilação 45
5.5.2.1 Análise da conversão 45
5.5.2.2 Análise do excesso enantiomérico pelo produto 47
5.5.3 Dosagem de atividade hidrolítica por método espectrofotométrico 48
5.5.4 Determinação da conversão e do excesso enantiomérico 49
5.6. Metodologia do Planejamento Experimental 49
5.6.1. Preparação dos solventes 49
5.6.2. Reações feitas no Planejamento experimental 50
5.6.3. Composto Central 50
5.6.4. Análise de Dados 51
6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
6.1. Seleção de biocatalisadores e dos substratos 52
6.2. Resolução cinética da acetilação de *rac*-3 utilizando Novozym 435 55
6.3. Efeito do agente acilante na reação de acetilação de *rac*-3 catalisado pela Novozym 435 59
6.4. Efeito de diferentes solventes na reação de acetilação de *rac*-3 catalisados pela Novozym 435 61
6.5. Cinética de acetilação de *rac*-3 catalisado pelas lipases PSC Amano II e PS-IM 63

6.6. Efeito do agente acilante sobre a reação de acetilação de *rac*-3 catalisado pelas lipases PS-IM e PSC Amano II 68
6.7. Efeito de diferentes solventes na reação de acetilação de *rac*-3 pelas lipases PS-IM e PSC Amano II 71
6.8. Planejamento experimental da reação de acetilação de *rac*-3 utilizando a lipase PS-IM 75
6.8.1. Desenho experimental composto central rotacional (DCCR**)** 76
6.8.1.1. Análise Estatística dos Dados e Validação do modelo sobre a variável de resposta conversão 77
6.8.1.1.1. Estudo da conversão na análise da Superfície de Resposta 83
6.8.1.2. A Análise da variável de resposta: excesso enantiomérico pelo produto (ee_p) 84
6.8.1.2.1. Estudo da da razão enantiomérica (E) na análise da Superfície de Resposta 89
6.8.1.3. Obtenção dos valores ótimos para o planejamento 91
7.0 CONCLUSÃO 94
8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS 95
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos para obtenção de compostos enantiomericamente puros (Modificado de GHANEM et al., 2004). 2

Figura 2. Reação de hidrólise catalisada por lipases. 6

Figura 3. Reações catalisadas por lipase. (Modificado de GOTOR *et al*., 2006 por CUNHA, 2009). 8

Figura 4. Modelo estrutural de α/β hidrolases (POUDEROYEN et al., 2001). 9

Figura 5. Conformações tampa fechada (azul) e tampa aberta (amarelo) em várias lipases. Reproduzido de ALOULOU *et al*., (2006). 10

Figura 6. Representação esquemática do sítio de ligação em diferentes lipases. Observa-se que nos exemplos (b) a (f) apenas um modelo do ácido graxo é mostrado, a espécie álcool foi omitida para maior clareza da representação (Reproduzido de PLEISS *et al.*, 1998). 13

Figura 7. Enantiomero rápido (a) e enantiomero lento (b)- modelo de sítio ativo por lipases (Reproduzido por KAZLAUSKAS *et al*. 1991). 17

Figura 8. Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de *Burkholderia cepacia*. As fitas β estão representadas como setas (verde) e as hélices em azul. A posição do íon Ca^{2+} está indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho (SCHRAG *et al.*, 1997). 18

Figura 9. Estrutura tridimensional da lipase B de *Candida antarctica* (CALB)- (Reproduzido por Martins 2008). 19

Figura 10. Esquema mecanístico de reação de lipases. A tríade catalítica e a água são mostradas em preto, os resíduos do buraco do oxiânion em azul e o substrato em vermelho. Modificado de JAEGER *et al*. (1994) por ALMEIDA (2005). 20

Figura 11. Mecanismo cinético (Ping Pong Bi Bi) de reações com múltiplos produtos e substratos catalisadas por lipases (E: enzima; Es: éster; Al: álcool; Ac: ácido; W: água; i = 1,2,...,I; j=1,2,...,J) (Reproduzido de PAIVA *et al*., 2000). 21

Figura 12. Alternativas biossintéticas que podem ser empregadas na resolução enantiomérica de um álcool racêmico através de hidrolases (Reproduzido de ZIMMERMANN, A. 2005). 23

Figura 13. Representação esquemática da reação de transesterificação entre um álcool e um éster vinílico catalisada por lipase (Baseado em HOLMQUIST *et al*. 1995). 23

Figura 14. Efeito da atividade de água na atividade enzimática de lipases de origens diversas: *Rhizopus arrhizus* (■) ; *Candida rugosa* (○); *Pseudomonas sp*. (□) (WEHTJE e ADLERCREUTZ, 1997). 30

Figura 15. Esquema considerado para sistemas do tipo Michaeliano, assumindo que a reação é irreversível e que os produtos gerados não interferem na reação. 31

Figura 16. Mecanismo de transdução celular (Reproduzido por ALMEIDA *et al.* 2003). 33

Figura 17. Estereoisômeros do inositol (Reproduzido por ALMEIDA *et al*. 2003). 34

Figura 18. Nomenclatura e plano de simetria do *mio*-inositol (Reproduzido por ALMEIDA *et al*., 2003). 35

Figura 19. Modelo do Gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Reproduzido por CALADO e MONTGOMERY, 2003). 39

Figura 20 - Padrões de comportamento dos gráficos dos resíduos (Reproduzido por MONTGOMERY, 2001). 40

Figura 21. Foto da aparelhagem real e esquema do sistema experimental empregado nas reações de acetilação de rac-1, rac-2 e rac-3 (Reproduzido por BEVILAQUA, 2005). 42

Figura 22. Cromatograma referente ao padrão do substrato (*rac*-3) por CLAE em fase reversa com t_r de 8,178min. 45

Figura 23. Cromatograma referente ao padrão do substrato (*rac*-3) por CLAE em fase reversa em diferentes concentrações (mg/mL)com t_r de 8,178min. 46

Figura 24. Cromatograma referente a mistura do padrão racêmico do produto analisados por CLAE em fase reversa. O t_r de 12,456min é referente ao primeiro monoacetilado, o t_r =13,296min é referente ao segundo. O t_r =21,797min é referente ao diacetilado e o t_r = 38,745min ao triacetilado. O t_r de 8,325min é referente ao substrato. 46

Figura 25. Cromatograma do (D)-isômero e (L)-isômero do (±)- 1,3,4-tri-O-benzil-mio-inositol (rac-3). 47

Figura 26. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela Novozym 435 em acetato de vinila. 56

Figura 27. Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de *rac*-3 catalisado por Novozym 435 por CLAE em fase reversa em 112h de tempo de reação. 56

Figura 28. Cromatograma do substrato não reagido obtido na reação de acetilação do *rac*-**3** no período de 112h, utilizando Novozym 435 como catalisador em acetato de vinila. 57

Figura 29. Cromatograma do produto após reação de metanólise obtido na reação de acetilação do *rac*-**3** no período de 120h, utilizando Novozym 435 como catalisador em acetato de vinila 57

Figura 30. Reinjeção da amostra em fase reversa mostrando no cromatograma de confirmação que todo produto foi anteriormente hidrolisado 58
Figura 31. Resolução cinética enzimática do racemato *rac*-3 catalisada pela Novozym 435 em acetato de vinila. 59
Figura 32. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela Novozym 435 em diferentes agentes acilantes: 1- Acetato de vinila; 2- Acetato de etila; 3-Acetato de isopropenila. 60
Figura 33. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela Novozym 435 em diferentes sistemas de solventes: 1- TBME; 2- Hexano; 3-Acetato de etila; 4-Acetato de isopropenila utilizando Acetato de vinila como agente acilante. 62
Figura 34. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela PS-IM: Reação em acetato de vinila, livre de solvente. 64
Figura 35. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela PSC Amano II: 1- Reação em acetato de vinila, livre de solvente. 64
Figura 36. Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de *rac*-3 catalisado por *Pseudomonas species* imobilizada em terra de diatomácea. A análise por CLAE em fase reversa mostrou em 48h a conversão de 48%. 65
Figura 37. Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de *rac*-3 catalisado por *Pseudomonas species* imobilizada em cerâmica. A análise por CLAE em fase reversa mostrou em 96h a conversão de 47,7%. 65
Figura 38. Cromatograma do substrato não reagido obtido na reação de acetilação do rac-3 analisado na coluna quiral, utilizando Pseudomonas species, imobilizada em terra de diatomácea, utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante. 66
Figura 39 - Cromatograma do produto hidrolisado obtido na reação de acetilação de *rac*-**3** analisado por sistema CLAE em coluna quiral, utilizando lipase de *Pseudomonas species*, imobilizada em terra de diatomácea (PS-IM), utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante, com ee_p de 98%. 66
Figura 40. Cromatograma do produto hidrolisado obtido na reação de acetilação de *rac*-**3** analisado por sistema CLAE em coluna quiral, utilizando lipase de *Pseudomonas species*, imobilizada em cerâmica, utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante, com ee_p de 98%. 67
Figura 41. Resolução cinética enzimática do racemato *rac*-3 catalisada por lipase de *Pseudomonas species* imobilizada em dois diferentes suportes em acetato de vinila. 68
Figura 42. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela PS-IM na presença de dois diferentes agentes acilantes: 1- Reação em acetato de vinila; 2- Reação em acetato de isopropenila. As reações foram feitas em sistema livre de solvente. 68
Figura 43. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela PSC Amano II na presença de dois diferentes agentes acilantes: 1- Reação em acetato de vinila; 2- Reação em acetato de isopropenila. As reações foram feitas em sistema livre de solvente. 69
Figura 44. Curva de progresso das reações de resolução enzimática do *rac*-3 em diferentes sistemas de solventes catalisada por PSC Amano II: 1- TBME; 2- Hexano e 3-Acetato de etila. Em todas as reações acetato de vinila foi utilizado como agente acilante. 72
Figura 45. Curva de progresso das reações de resolução enzimática do *rac*-3 catalisada por PS-IM utilizando acetato de vinila como agente acilante, em diferentes sistemas de solventes: 1- TBME; 2- Hexano e 3- Acetato de etila. 73
Figura 46. Gráfico de Pareto. 78
Figura 47. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos. 81
Figura 48. Gráfico da homogeneidade da variância-valores observados x Resíduos. 82
Figura 49. Gráfico de Shapiro e Komogorov com p= 0,969 e p>0,20, respectivamente. 82
Figura 50. Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para a resolução cinética de *rac*-3 como resposta para concentração de enzima e substrato: a) Valores fixados de 0%m/v de água e 40°C de Temperatura e b) 0%m/v de água e 30° C de Temperatura c) Valores fixados de 0,4%m/v de água e 40°C de Temperatura d) 0,4 %m/v de água e 30° C de Temperatura. 83
Figura 51. Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para a resolução cinética de *rac*-3: influência da temperatura e da concentração de enzima sobre a conversão. . 84
Figura 52. Gráfico de Pareto mostrando os fatores que são significativos, em ordem crescente de significância onde fatores significativos estão após a linha na vertical de cor vermelha. 86
Figura 53. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos. 88
Figura 54. Gráfico da homogeneidade da variância-valores observados x Resíduos. 88
Figura 55. Gráfico de Shapiro e Komogorov com p= 0,944 e p>0,20, respectivamente. 89
Figura 56. Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para a resolução cinética de *rac*-3 como resposta para a razão enantiomérica (E) utilizando concentração de enzima e temperatura como variáveis

independentes, em 56a e 56b e concentração de enzima e substrato em 56c e56d: a) Valores fixados de 2 mg/mL de substrato e 0%m/v H_2O , b) 2 mg/mL de substrato e 0,4 %m/v H_2O. C) Os valores fixados de 0%m/v H_2O e 40^oC de Temperatura e d) 0,4%m/v H_2O e 40^oC de Temperatura. 90
Figura 57. Obtenção dos pontos ótimos das duas variáveis de resposta, X% (conversão) e ee_p através da função *desirability* para a var1(concentração de substrato); var2 (concentração de enzima); var3 (concentração de água) e var4 (temperatura em ^oC). A aproximação da linha tracejada em azul indica os pontos ótimos. 92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais áreas aplicações, produtos e tipos de reações desempenhadas pelas lipases. 14
Tabela 2. Valor de log P de solventes orgânicos. 26
Tabela 3. Soluções salinas saturadas adequadas ao controle da atividade de água. 28
Tabela 4. Derivados de mio-inositol tri e tetra-substituídos com grupamento benzila e tri-substituído com grupamento alila. 42
Tabela 5. Valores reais referentes aos valores das variáveis escalonadas. 51
Tabela 6. Resultado dos experimentos preliminares de resolução enantiomérica dos substratos com as lipases. 53
Tabela 7. Resultados do *screening* realizado com as diferentes lipases na resolução cinética de *rac*-**3** utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante. 54
Tabela 8. Atividade hidrolítica (AH) entre as lipases imobilizadas e liofilizadas. 55
Tabela 9. Efeito de diferentes agentes acilantes na resolução de *rac*-3 em 112h apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato (ee_s), excesso enantiomérico pelo produto(ee_p) e razão enantiomérica (E). 60
Tabela 10. Conversões, valores de excesso enantiomérico (ee) e razão enantiomérica (E) obtidas na resolução cinética de *rac*-3, catalisada por Novozym 435 no período de 120h. 63
Tabela 11. Efeito de diferentes agentes acilantes na resolução de *rac*-3 utilizando PS-IM e acetato de vinila como solvente da reação; apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato(ee_s), excesso enantiomérico pelo produto(ee_p) e razão enantiomérica (E). 69
Tabela 12. Efeito de diferentes agente acilante na resolução de *rac*-3 utilizando PSC amano II e acetato de vinila como solvente apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato(ee_s), excesso enantiomérico pelo produto(ee_p) e razão enantiomérica (E). 69
Tabela 13. Resultado obtido da reação de *rac*-3 catalisada por lipase de *Pseudomonas species* na forma imobilizada e liofilizada utilizando acetato de vinila como agente acilante e solvente da reação, apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato(ee_s), excesso enantiomérico pelo produto(ee_p) e razão enantiomérica (E). 71
Tabela 14. Parâmetros de conversão (X%), de excesso enantiomérico do produto (ee) e a razão enantiomerica (E) obtidos com PSC Amano II na acetilação enantiosseletiva do *rac*-**3** em diferentes solventes. 73
Tabela 15. Parâmetros de conversão (X%), de excesso enantiomérico do produto (ee) e a razão enantiomérica (E) obtidos com PS-IM na acetilação enantiosseletiva do *rac*-**3** em diferentes solventes. 74
Tabela 16. Planejamento Composto Central em termos das variáveis não escalonadas e escalonadas (entre parêntesis) dos respectivos resultados experimentais, no período de 24h, utilizando a lipase PS-IM e como agente acilante e solvente o acetato de vinila. 76
Tabela 17. ANOVA sem os efeitos não-significativos. 77
Tabela 18. Análise de variância para desenvolvimento experimental. 78
Tabela 19. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas. 79
Tabela 20. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas sem as variáveis não significativas. 80
Tabela 21. Tabela Anova gerada para a variável de resposta ee_p 85
Tabela 22. Análise de variância para desenvolvimento experimental. 85
Tabela 23. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas. 86
Tabela 24. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas sem as variáveis não significativas 87

ÍNDICE DE ABREVIAÇÕES

Ac	Grupo acila
Alil	Grupo alila
Bn	Grupo benzila
Bn	Grupo benzila
CCF	Cromatografia em Camada Fina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CALB	lipase B de Candida antarctica
E	razão enantiomérica
ee_s	excesso enantiomérico obtido pelo substrato
ee_p	excesso enantiomérico obtido pelo produto
p-NFL	p-nitro fenil laurato
TBME	Éter terc-metil butílico
TLC	*Thin Layer Chromatograph* (Cromatografia em Camada Delgada)
rac-1	(±)-1,4,5,6-tetra-*O*-benzil-*mio*-inositol
rac-2	(±)-1,4,5,6-tetra-*O*-alil-*mio*-inositol
rac-3	(±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol

1.0 Introdução

Os compostos orgânicos vêm sendo transformados por enzimas isoladas há mais de cem anos. Entretanto, nos últimos anos, um grande número de reações catalisadas por enzimas foram desenvolvidas, tornando-se comum o uso destas para os químicos orgânicos (THEIL, 1995). Além disso, diferentes técnicas foram aperfeiçoadas ou desenvolvidas, ao longo dos anos, para estudo e otimização de biotransformações, como por exemplo, imobilização (GOFFIC *et al.*, 1995), modificação enzimática por engenharia genética (MUTTER *et al.*, 1985) ou via interação não covalente (*imprinting*) (IJIRO *et al.*, 1995), reincubação do produto ou do substrato (SIH *et al.*, 1982), inibição enantiosseletiva (SIH *et al.*, 1989), modificação do substrato (JONES *et al.*, 1990), mapeamento do sítio ativo (OTTOLINA *et al.*, 1996), estudo da variação do solvente (*solvent engineering)* (HADFIELD, 1994) e estudos da variação dos doadores de acila em reações de transesterificação (EMA *et al.*, 1996). Destas, a técnica que apresenta a otimização de solventes é a de menor custo, maior flexibilidade e velocidade de execução (COSTA e AMORIM, 1999).

Lipases são frequentemente usadas em processos de biotransformação industrial e se destacam, dentre inúmeros fatores, pela estabilidade em solventes orgânicos não exigência de cofatores na reação e pela capacidade de discriminar entre grupos enantiotópicos e enantiomorfos (THEIL, 1995), revelando uma alta regio-, chemo-, estereosseletividade além da alta especificidade a diferentes substratos (CHOJNACKA; OBARA & WAWRZENCZY, 2007; JAEGER; REETZ, 1998; THEIL 1995; JAEGER & EGGERT 2002). O grupo se destaca ainda dentre as principais enzimas utilizadas pela capacidade de catálise tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico (com baixo teor de água) (SIH e WU, 1989; FERRABOSCHI *et al.*, 1990; THEIL, 1995; STECHER e FABER, 1997) e pelo fato da reação com as mesmas gerar um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos.

Os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (CASTRO-OCHOA *et al*., 2005; SILVA *et al*., 2005; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Por essa razão as enzimas são tão utilizadas no ramo industrial (PANDEY *et al.*, 1999, KRISHNA, 2002), sendo as

hidrolases as mais empregadas com cerca de 80% de todas as enzimas utilizadas (KRISHNA, 2002). Além do ramo industrial, estas enzimas são utilizadas ainda nos ramos alimentício, cosméticos, incluindo perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes etc. (PANDEY *et al.*, 1999).

Este grupo de enzimas é facilmente empregado em altas temperaturas frente a diferentes sistemas de solventes e ainda, são capazes de aceitar uma ampla variedade de substratos, já que possuem capacidade de alteração em sua conformação, dependendo da estrutura do material de partida utilizado (THEIL, 1995).

Lipases são eficientes na resolução cinética de moléculas quirais. A maioria das substâncias biologicamente ativas como fármacos, agro-químicos e pesticidas são moléculas quirais, sendo que grande parte destas drogas possuem um ou mais centros quirais necessitando de resolução óptica para a obtenção de um produto enantiomericamente puro (ANOVÁ e HUTTA, 2003).

1.1 Rotas para a obtenção de compostos enantiomericamente puros

Os métodos utilizados para a obtenção de compostos enantiomericamente puros podem ser divididos em categorias, dependendo do tipo do material de partida utilizado (Figura 1).

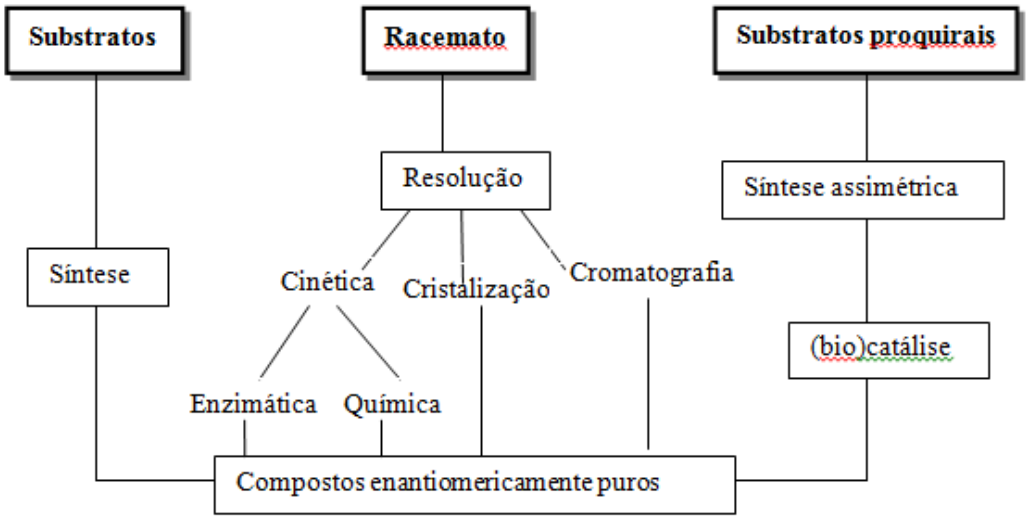


Figura 1. Métodos para obtenção de compostos enantiomericamente puros (Modificado de GHANEM *et al.*, 2004).

A resolução de enantiômeros pode ser dividida em três categorias: resolução cinética, cristalização e cromatografia. Apesar dos novos progressos na síntese assimétrica, o método de produção que prevalece para obter um único enantiômero na síntese industrial é a resolução cinética enzimática (GHANEM *et al.*, 2004).

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 diasteroisoméricos. A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) em cada estado de transição define a velocidade de conversão dos enantiômeros: um que reage rápido e o outro que reage lentamente (GHANEM, 2007).

2.0 Justificativa

Os enantiômeros possuem as mesmas propriedades físico-químicas, exceto na estrutura espacial, além de exibirem diferentes comportamentos na fisiologia, bioquímica e ainda a possibilidade de diferentes papéis na farmacodinâmica, farmacocinética e atividades toxicológicas (ANOVÁ e HUTTA, 2003). Como pelo método convencional (síntese com catalisadores químicos) nem sempre é possível obter a resolução enantiomérica, biocatalisadores enzimáticos vêm sendo usados para a obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas (COSTA e AMORIM, 1999).

O interesse na obtenção de derivados de *mio*-inositois enantiomericamente puros justifica-se pela sua grande versatilidade em síntese química, principalmente na síntese de novas drogas e na sinalização celular como segundo mensageiro. Nestes últimos, desempenhando papéis como contração muscular, metabolismo, secreção etc. (ALMEIDA *et al.*, 2003). Nos últimos dois anos, inúmeros artigos puderam ser encontrados na literatura envolvendo a síntese e/ou os estudos biológicos, bioquímicos, farmacológicos, imunológicos, etc. dos inositóis fosfatos, evidenciando que a pesquisa científica nesta área continua sendo promissora e de grande relevância.

Estudos preliminares nos inositóis demonstraram a necessidade de mais pesquisa na área uma vez que os inositóis polifosforilados são poucos disponíveis na natureza. Os

conhecimentos sobre o sistema de fosfoinositídeos continuam a progredir rapidamente, entretanto, muitos fatores ainda permanecem obscuros, como por exemplo, a importância fisiológica da transformação do 1D-*mio*-inositol 1,4,5-trifosfato em diversos compostos fosforilados e a função destes metabólitos intermediários. Poucos análogos dos inositóis polifosforilados sintetizados têm apresentado efeito significativo na cascata dos fosfoinositídeos. Recentemente, SIMAS *et al*. (2010) e CUNHA *et al*. (2010) testaram novos derivados de *mio*-inositol utilizados pela primeira vez na resolução cinética catalisadas por lipases. Os autores publicaram trabalhos de seleção de lipases, modelagem molecular e cinética de resolução, obtendo enantiômeros puros com sucesso. Entretanto estes ainda relatam a necessidade do emprego de outros derivados como materiais de partida em resoluções cinéticas, o qual ainda precisa ser explorado para um maior entendimento.

Dentro deste contexto, neste trabalho, pretendeu-se dar continuidade ao conhecimento da resolução cinética de diferentes racematos de *mio*-inositóis produzidos previamente por síntese química, utilizando outros substratos e biocatalisadores. Além disso, foram investigados aspectos que influenciam a enantiosseletividade, como os relacionados com o substrato (tipo de grupo substituinte), com a enzima (liofilizadas ou imobilizadas), com o meio e condições reacionais (tipo de solvente, agente acilante e temperatura) e com o efeito de todas as variáveis, que ao longo do estudo foram observadas como sendo relevantes na resolução cinética enzimática.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do trabalho foi realizar o estudo da resolução de derivados do *mio*-inositol através da catálise enzimática utilizando lipases com a finalidade de gerar substâncias bioativas.

3.2 Objetivos específicos

- Resolução óptica de derivados quirais racêmicos do mio-inositol: (±)-1,4,5,6-tetra-*O*-benzil-*mio*-inositol; (±)-1,4,5,6-tetra-*O*-alil-*mio*-inositol e (±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol, reações estas catalisadas por lipases em solvente orgânico.
- *Screening* com lipases comerciais
- Influência de diferentes solventes e agentes acilantes
- Otimização das condições de reação da resolução cinética de derivados de *mio*-inositol quirais planejados, sendo estudada a influência da temperatura, do percentual da água na reação, do solvente utilizado, da concentração do substrato e da enzima com o objetivo de se obter a condição que promover os melhores resultados para a resolução racêmica, em um menor tempo de reação.

4.0 Revisão Bibliográfica

4.1. Lipases

Lipases são definidas como carboxilesterases, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, geralmente na interface água/lipídio, cujos ácidos graxos sejam de cadeia longa. Pela razão de não haver uma classificação exata que defina o número de carbonos de uma cadeia longa, alguns autores costumam definir como aqueles triacilgliceróis que são constituídos por ácidos graxos que possuam mais de 10 carbonos, enquanto que as enzimas que hidrolisam triacilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta (menos de dez átomos de carbono) são reconhecidas como as esterases-carboxil éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3 (JAEGER *et al*., 1999; NINI *et al*., 2001; SHARMA *et al*., 2001; BORNSCHEUER, 2002; CASTRO-OCHOA *et al*., 2005). Como produto da reação dessas hidrolases, há a liberação de ácidos graxos e glicerol (Figura 2) (JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

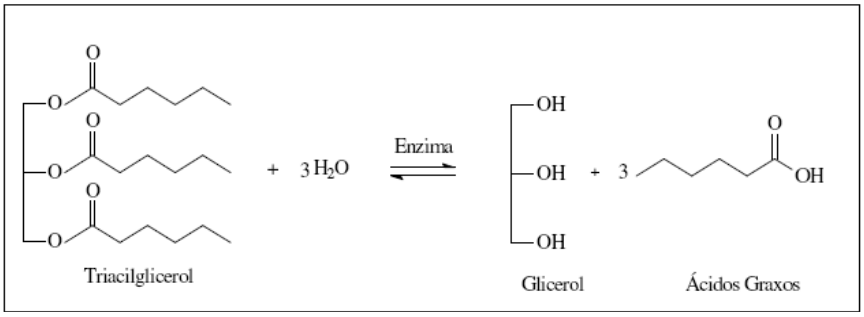


Figura 2- Reação de hidrólise catalisada por lipases

A capacidade de catálise em reações onde o ambiente é aquo-restrito permite a atuação das lipases na síntese de mono, di ou triacilglicerol a partir de ácidos graxos e glicerol (SAXENA *et al*., 1999).

Apesar dos substratos de preferência às lipases serem os triglicerídeos de cadeia longa, estes biocatalisadores ainda atuam em ésteres não lipídicos (substratos não naturais). A facilidade com que estas enzimas aceitam uma gama de substratos não naturais e de tamanhos diversos sugere que a espinha dorsal polipeptídica é flexível, podendo adotar diferentes conformações. Como consequência, a baixa barreira de energia que é necessário para que

ocorram as mudanças conformacionais dificulta a modelagem e a previsão de interações estereoquímicas para este grupo de biocatalisadores (COSTA e AMORIN, 1999).

As lipases são amplamente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de microrganismos selvagens ou geneticamente modificados e ainda a partir de fontes animais e vegetais. Os bioprocessos vêm sendo os principais meios utilizados na produção de lipases. Isso porque estes apresentam maior facilidade de controle, maior capacidade produtiva e custo de obtenção reduzido (BALCÃO *et al.*, 1996 e PANDEY *et al.*, 1999). Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases mais utilizadas são aquelas obtidas por microrganismos (bactérias, leveduras e fungos), devido a sua relativa facilidade de produção, abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las, alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (ILLANES, 1994; FREIRE e CASTILHO, 2010). Os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, conhecidos como GRAS (*Generally Regarded as Save*, JAEGER *et al.*, 1994).

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 acidólise, alcoólise e transesterificação, dependendo dos reagentes de partida empregados e do solvente utilizado. Além de água e álcool, outros compostos podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas.

Desta forma, as lipases podem catalisar outras reações como aminólise, tiotransesterificação, lactonização e peroxidação, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (KRIEGER *et al.*, 2004, CASTRO *et al.*, 2004). A Figura 3 ilustra as principais reações catalisadas por lipases.

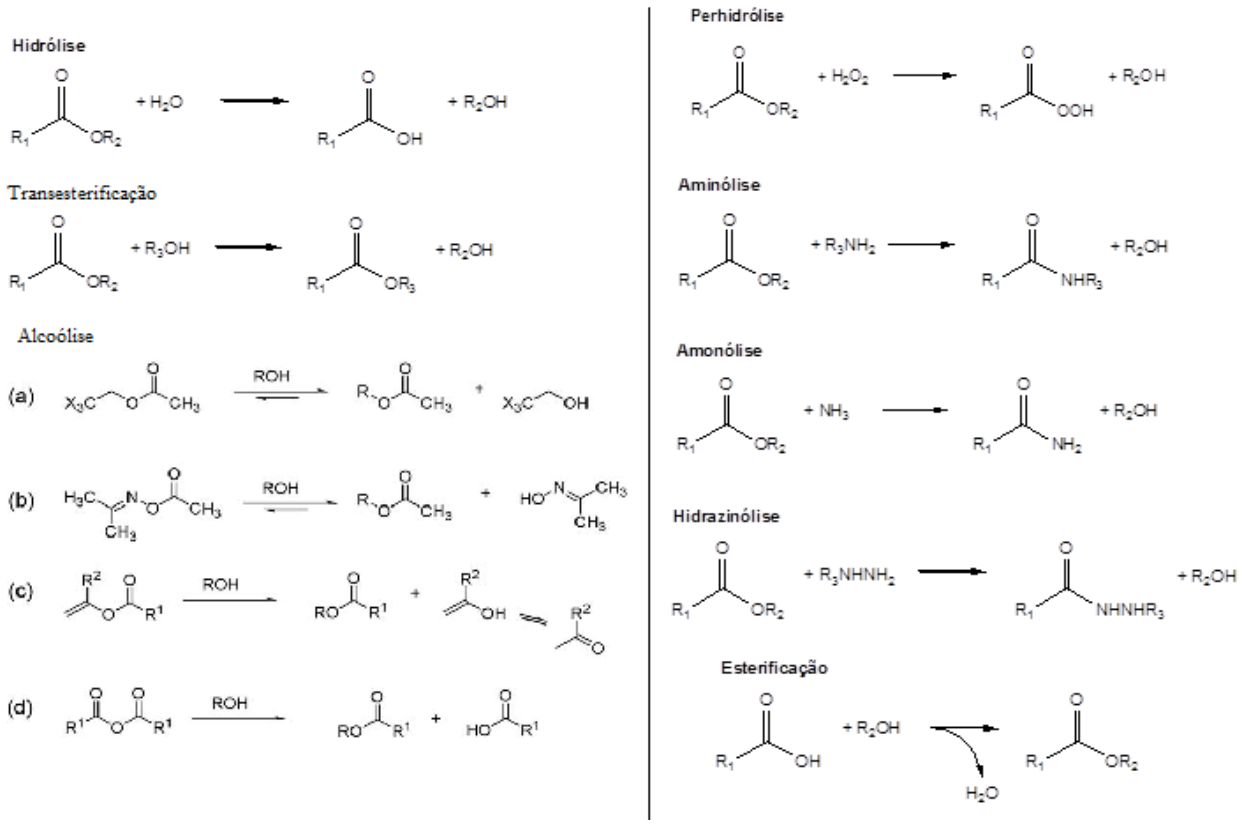


Figura 3- Reações catalisadas por lipase. (Modificado de GOTOR *et al.*, 2006 por CUNHA, 2009).

4.1.1 Estrutura proteica de lipases

Até o momento, as lipases caracterizadas apresentam massa molar entre 19 e 60 kDa e apresentam uma estrutura terciária comum com um dobramento de α/β hidrolase (Figura 4). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central formado por uma folha β central, consistindo de oito diferentes fitas β (β1-β8), conectadas com seis α hélices (A-F) (POUDEROYEN *et al.*, 2001). As fitas β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si.

O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. O nucleófilo catalítico, serina é responsável pela catálise e está unido por ligações de hidrogênio a um resíduo de histidina; o resíduo carboxilado ligado ao mesmo resíduo de histidina poderá ser um aspartato ou glutamato (EGGERT *et al.*, 2001; JAEGER e REETZ, 1998; SCHRAG e CYGLER, 1997; EGLOFF *et al.*, 1995; JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1999). A serina catalítica está localizada no C-terminal da fita β5, faz parte de um pentapeptídeo altamente conservado

GXSXG, onde G= glicina; S= serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico (JAEGER; REETZ, 1998). As lipases possuem ainda similaridade em sua estrutura tridimensional (secundária e terciária).

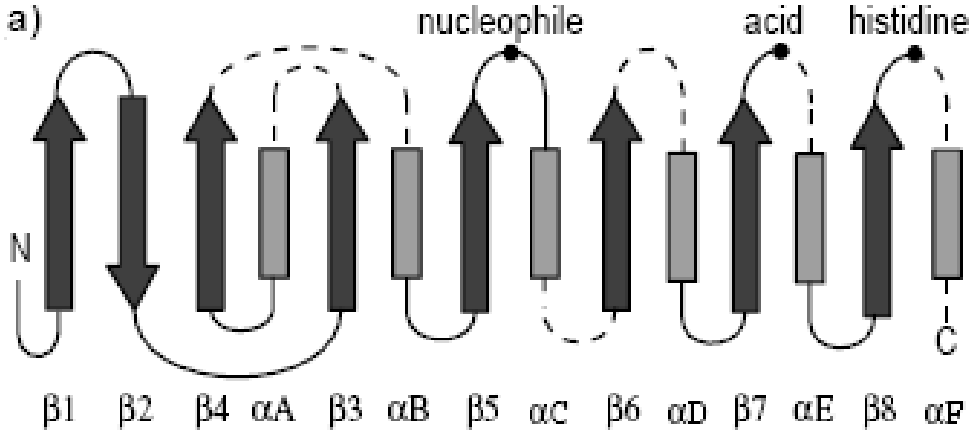


Figura 4. Modelo estrutural de α/β hidrolases (POUDEROYEN et al., 2001).

Além da região que compõe o sítio ativo, para a ligação do substrato, existe uma estrutura anfipática móvel que cobre o sítio ativo catalítico na estrutura 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 geralmente na posição β8, que prolonga-se sobre o conjunto central de fitas β e sobre o sítio catalítico, sendo chamada de tampa hidrofóbica. Segundo GHANEM (2007), a provável função da tampa hidrofóbica é na interação com a interface lipídeo-água, no fenômeno de ativação interfacial (item 4.1.2), onde esta estrutura sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo e favorecendo a ligação com o substrato.

4.1.2 Fenômeno da ativação interfacial em Lipases

Em 1958, SARDA e DESNUELLE propuseram definir lipases a partir de suas características cinéticas, utilizando como critério a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Os autores observaram diferença na atividade das esterases e das lipases. A atividade na primeira era função da concentração do substrato de acordo com o modelo

clássico de Michaelis e Menten, no qual a velocidade máxima ocorria antes do limite de solubilidade do substrato ser atingido e da formação de agregados e/ou interfaces. Enquanto a atividade da segunda se caracterizou por manter-se constante até que a concentração micelar crítica (CMC) do substrato no sistema fosse alcançado, e aumentando a partir desse ponto. A este fenômeno de aumento de atividade enzimática quando há formação de interfaces, chamou-se de ativação interfacial (COSTA e AMORIM, 1999; SARDA e DESNUELLE, 1958).

Os aspectos básicos sobre os mecanismos de catálise, incluindo o processo de ativação interfacial foram elucidados a partir da resolução da estrutura tridimensional de várias enzimas. Métodos de purificação, seqüenciamento, expressão genética, clonagem, cristalização e cristalografia de raio-X foram empregados permitindo obter a resolução da estrutura tridimensional de algumas lipases como *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas cepacia*, lipase de pâncreas humano, lipase gástrica humana e de cão, *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* em sua forma inativa e ativada interfacialmente utilizando inibidor para a formação de complexo com o sítio ativo (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991; BRZOZOWSKI *et al.*, 2000; GROCHULSKI *et al.*, 1994 e ROUSSEL *et al.*, 2002) (Figura 5). Na forma inativa, o sítio ativo está totalmente oculto sob um curto segmento helicóide, formado por um ou mais *loops*-tampa *lid* ou aba *flap*. Na forma ativada, a tampa é deslocada para fora do sítio ativo, deixando-o totalmente acessível ao solvente e substrato. Nesse movimento, o lado hidrofóbico fica totalmente exposto, expandindo consideravelmente a superfície não polar do sítio ativo (COSTA e AMORIM, 1999).

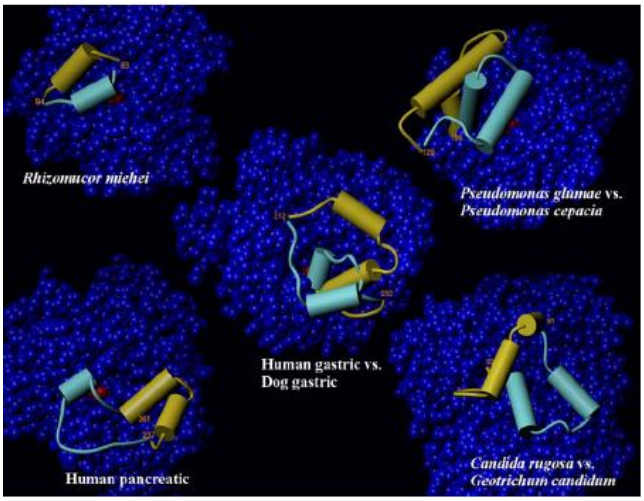


Figura 5. Conformações tampa fechada (azul) e tampa aberta (amarelo) em várias lipases. Reproduzido de ALOULOU *et al*., (2006).

Do ponto de vista estrutural, existem evidências que sugerem que a *lid* pode propiciar a atividade catalítica e determina seletividade de algumas lipases (SECUNDO *et al*., 2006). As lipases de *Candida antarctica* (UPPENBERG *et al*., 1994), *Geotrichum candidum* (SCHRAG *et al*., 1991), *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa* e *R. miehei* (CAJAL *et al*., 2000 a,b; OLLIS *et al*., 1992, BRADY *et al*., 1990) são exemplos de lipases que apresentam a tampa em suas estruturas e sofrem ativação interfacial. Entretanto, em outros casos, a existência da *lid* não implica necessariamente em ativação interfacial. Este é o caso das lipases de *P. aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *C. antarctica B* (JAEGER e REETZ, 1998 a, JAEGER *et al*., 1994), que possuem a *lid* mas não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, que são as menores lipases de estrutura conhecida (19 kDa), não apresentam a tampa catalítica e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (CYGLER e SCHRAG, 1997; YAO e KOLLER, 1994). Portanto, nem o critério de ativação interfacial, nem o da existência da tampa são suficientes para a caracterização de uma lipase. Por isto, a caracterização de lipases com base no conceito de ativação interfacial foi substituída pela definição de que lipases são carboxilesterases capazes de catalisar a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (VERGER, 1997; FREIRE e CASTILHO, 2010). O fato de a maioria das lipases conhecidas ser ativada na interface orgânico-aquosa, proporcionou o desenvolvimento de diversas metodologias de estudo da ativação interfacial (FREIRE e CASTILHO, 2010).

O fenômeno de ativação interfacial ocorre quando a tampa hidrofóbica encontra outra molécula hidrofóbica na interface. Esta então se move, sofrendo uma mudança conformacional, expondo o seu sítio ativo e permitindo a catálise da reação (ALOULOU *et al*., 2006). A mudança conformacional durante o processo de ativação pode ser alterada de acordo com a lipase utilizada. Por exemplo, nas lipases de *Rhizomucor miehei* a espinha dorsal da enzima é deslocada 7Å expandindo 750Å a área hidrofóbica da superfície da enzima (DEREWENDA *et al*., 1992). Entretanto outras lipases sofrem alterações conformacionais mais complexas, como o caso da lipase do pâncreas humano, onde a mudança é na estrutura secundária e terciária.

Em algumas lipases, a própria estrutura do sítio ativo é afetada pela mudança conformacional na presença de seu substrato. Em lipase pancreática humana, por exemplo, ambos o *lid* e a fita β5 se adaptaram totalmente para a diferente conformação na presença de fosfolipídios e sais biliares. O movimento de abertura da tampa cria uma região eletrofílica próxima do resíduo serina do sítio ativo, denominada cavidade do oxiânion, que é responsável

pela estabilização das cargas negativas do intermediário tetraédrico do estado de transição formado durante a hidrólise do éster. As lipases que não possuem uma tampa helicoidal, como por exemplo, a lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentam a cavidade do oxiânion pré-formado. A abertura da tampa gera uma grande superfície hidrofóbica em torno do sítio ativo e na face interna da tampa helicoidal da lipase que tem sido considerada como a principal responsável pelo reconhecimento e interação da lipase com a interface água-lipídeo (ALOULOU *et al.*, 2006).

Dependendo da lipase, a localização topológica da tampa hidrofóbica se encontra de maneira variada. Além disso, o tamanho e complexidade geralmente aumentam com o aumento da molécula protéica (JAEGER *et al.*, 1999). A diversidade estrutural entre lipases de diferentes origens é representada esquematicamente na Figura 6.

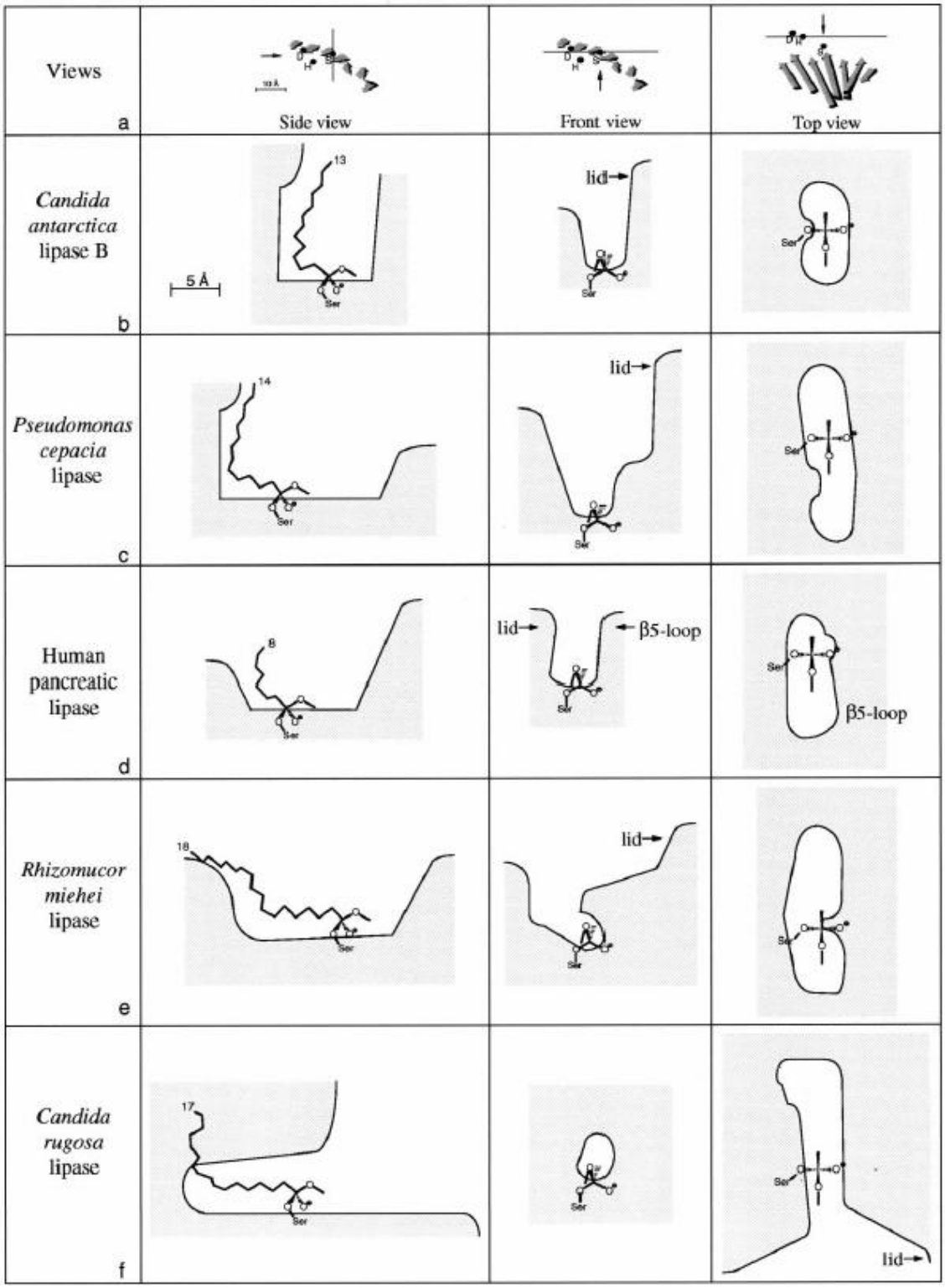


Figura 6 – Representação esquemática do sítio de ligação em diferentes lipases. Observa-se que nos exemplos (b) a (f) apenas um modelo do ácido graxo é mostrado, a espécie álcool foi omitida para maior clareza da representação (Reproduzido de PLEISS *et al.*, 1998).

4.1.3 Aplicação de lipases em síntese orgânica

Como relatado anteriormente, o ramo industrial tem obtido inúmeras vantagens com a aplicação de lipases, trazendo diversos benefícios econômicos na produção. Algumas áreas estão citadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais áreas aplicações, produtos e tipos de reações desempenhadas pelas lipases

Tipos de reações		
Hidrólise		
	Áreas de aplicação	Alimentos (latícinios)
		Química (Processamento do Óleo)
		Química (Detergente)
	Produtos	Agentes flavorizantes para queijos e derivados.
		Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios).
		Detergentes para lavanderias e uso doméstico
	Aplicações	Hidrólise da gordura do leite
		Hidrólise de óleos e gorduras
		Remover manchas de óleo
	Referências	HASAN et al., 2006; VILLENEUVE et al., 2000.
		HASAN et al., 2006; OSÓRIO et al., 2001; UNDURRAGA et al.,2001; VILLENEUVE et al., 2000; Silva et al., 2003.
		HASAN et al., 2006; KIRK et al., 2002; SHARMA et al., 2001.
Tipos de reações		
Esterificação		
	Áreas de aplicação	Química Fina Química de alimentos Química farmacêitica
	Produtos	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes Flavorizantes e aromatizantes
	Aplicações	Síntese de ésteres
		Esterificação ou transesterificação de óleos e gorduras
		Síntese de intermediários de medicamentos preparação de intermediários homoquirais
	Referências	BUCALÁ et al., 2006; FERNANDES et al.,2006; FORETI e FERREIRA, 2006; HASAN et al., 2006; ROMERO et al.,2005; FERNANDES et al., 2004; GHAMGUI et al., 2004; TRUBIANO e FERREIRA, 2004. HASAN et al., 2006
Tipos de reações		
Transesterificação		
	Áreas de aplicação	Biocombustíveis
	Produtos	Biodiesel
	Aplicações	Transesterificação de óleos vegetais
	Referências	SALIS et al., 2005; HSU et al., 2004; SALIS et al., 2003; SHIMADA et al., 2002; ZHANG et al., 2002; ISO et al., 2001; ABIGOR et al., 2000; SOUZA et al., 2010; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011.

Embora a aplicação de lipases se apresente de forma vasta, determinados setores vêm ganhando destaque, como o setor farmacêutico, alimentício, detergentes, agroquímico, tratamento de efluentes e oleoquímica (CAMAROTA e FREIRE, 2006, LEAL *et al*., 2002; BARON, 2003; WAKABAYASHI, *et al.* 2003).

4.1.4 Principais microrganismos utilizados para lipases

Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *R. oryzae*, *Penicillium camembertii*, *P. roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* são comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivos em preparações digestivas e para síntese quiral (http://www.amano-enzyme.co.jp/).

Dentre as bactérias produtoras de lipases comerciais estão disponíveis as enzimas de *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *Bulkholderia (Pseudomonas) cepacia* e *Arthrobacter* sp. para a aplicação em síntese quiral. O rápido crescimento celular, em relação aos fungos é uma das vantagens citadas das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (JAEGER *et al.*, 1999). Apesar de lipases produzidas por vegetais terem sido purificadas e estudadas quanto às suas características bioquímicas e quanto o seu potencial em biotransformação de lipídeos, estas são pouco exploradas em escala industrial. Dentre as enzimas lipolíticas vegetais estudadas estão as triacilglicerol lipases, as acil-hidrolases não específicas como as fosfolipases A1, A2 e B, as glicolipases, as sulfolipases e monoacilglicerol lipases, além das fosfolipases C e D (MUKHERJEE, 1994). Entre as espécies estudadas estão *Ricinus communis*, *Vernonia*, *Pinus*, *Brassica napus*, *Cuphea racemosa* (HELLYER *et al*., 1999), *Euphorbia characias* e *E. wulfenii* (PALOCCI *et al*, 2003; CAVALCANTI *et al.*, 2007).

Lipases humanas têm sido largamente estudadas devido às implicações que sua estimulação ou inibição têm sobre a saúde humana, como problemas associados com a obesidade. São elas lipases gástrica, pancreática, a estimulada por sais biliares que ajudam na digestão e assimilação de lipídeos da dieta, e as lipases hepática e endotelial, as quais atuam no metabolismo de lipoproteínas. (MILED *et al*., 2000, Roussel *et al*., 2002, VAGANAY *et al*., 1998).

O interesse na medicina está principalmente na inativação da atividade lipolítica para controlar a infecção de microrganismos, na inibição da lipase digestiva para controle da obesidade, na estimulação da lipase metabólica para diminuir a lipidemia ou no uso de lipase pancreática suplementar para controle da fibrose cística (MUKHERJEE, 2003). Dentre outras lipases animais estudadas, pode-se destacar a lipase pancreática canina (STEINER e WILLIAMS, 2002); as lipases ácidas lisossomais humana e de rato (GROENER *et al*., 2000); a fosfolipase pancreática de peru (BEN SALAH *et al*., 2003) e as pancreáticas de esquilo (*Spermophilus tridecemlineatus*) (SQUIRE *et al*., 2003), gato (*Felis catus*) (STEINER *et al*., 2003) e bovina (YAQOOB *et al*., 1999).

4.2. Aplicação de lipases na síntese de fármacos

A importância da quiralidade tem aumentado nas últimas décadas e é hoje o foco central das indústrias farmacêutica e orgânica, especialmente no desenvolvimento de novas drogas. O valor de mercado para tecnologia quiral atingiu cerca de 2,7 bilhões de dólares nos EUA em 2007, com uma taxa de crescimento anual de 10,8% (GHANEM *et al.* 2010).

Como supramencionado, a síntese destes compostos requerem etapas de resolução óptica para a obtenção de um produto enantiomericamente puro (ANOVÁ e HUTTA, 2003).

Impulsionado pela importância da quiralidade na eficácia de inúmeros produtos agroquímicos e farmacêuticos, estabelecida pelas legislações brasileira e de outros países, o interesse pela produção de um único enantiômero a partir de intermediários quirais tem aumentado significativamente (SKORIDOU *et al.*, 2004). 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 enatiômeros 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 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através das RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) que dispõem sobre medicamentos (ANVISA, 2009).

Ao analisar potenciais fármacos, a pureza enantiomérica faz-se necessária, uma vez que o antípoda ótico pode não apresentar atividade ou mesmo produzir efeitos indesejáveis no

processo biológico. O caso muito conhecido foi o da Talidomina, droga amplamente receitada nos anos 60 contra enjôos em gestantes e que resultou no nascimento de milhares de bebês com deformações congênitas. Posteriormente, descobriu-se que o efeito teratogênico da talidomida era proveniente do emprego do enantiômero de configuração absoluta (S-isômero), enquanto que seu antípoda era desprovido de ação teratogênica em humanos (LIMA *et al.*, 2001).

O mecanismo de enantiosseletividade em uma reação enzimática pode ser descrito por alguns modelos que preveem a enantiopreferência pelo substrato. FITZPATRICK e KLIBANOV (1991) tentaram explicar a enantiosseletividade da enzima através do tamanho dos grupamentos substituintes dos substratos. KAZLAUSKAS e colaboradores (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. A estrutura leva a uma enantiopreferência por um determinado enantiômero. A Figura 7 ilustra o modelo de sítio ativo de lipases, que consiste de duas regiões de diferentes tamanhos, uma grande e outra pequena.

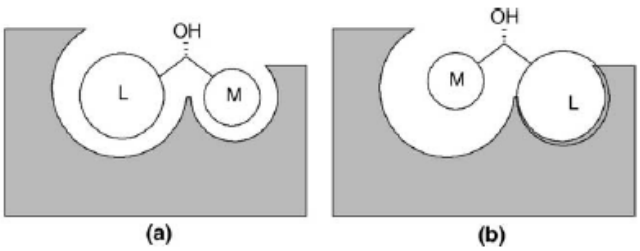


Figura 7. Enantiomero rápido (a) e enantiomero lento (b)- modelo de sítio ativo por lipases (Reproduzido por KAZLAUSKAS *et al*. 1991).

4.3. Lipases de *Pseudomonas* sp. e *Candida* sp.

Duas lipases mostraram destaque neste trabalho e serão discutidas mais detalhadamente:

Lipases de *Pseudomonas* sp.

A espécie bacteriana de *Pseudomonas cepacia* recentemente renomeada de *Burkholderia cepacia* (REETZ e JAEGER, 1998) é uma bactéria gram-negativa produtora de lipases com características de alta estabilidade e atividade. As lipases produzidas por cepas de *B. cepacia* (*P. cepacia*) possuem uma grande estabilidade em solventes orgânicos e alta

enantiosseletividade. Como conseqüência, têm sido utilizadas na resolução quiral de racematos, produzindo enantiômeros puros (JAEGER *et al*., 1997). Por exemplo, RATHI *et al*. (2000) reportaram o isolamento de uma cepa *B. cepacia* (formalmente *Pseudomonas* sp.) com atividade em faixa de temperatura de 25-100° C e pH ótimo para atividade de 11. A enzima apresentou um fenômeno de ativação térmica e possui alta especificidade em relação ao óleo de mostarda.

As lipases de *P. cepacia* estão sendo comercializadas pela Amano (*Amano Europe Enzyme* Ltd., UK) e têm sido utilizadas como aditivos em detergentes e em reações sintéticas em química orgânica, principalmente na síntese de compostos quirais a partir de misturas racêmicas (REETZ e JAEGER, 1998; COFFEN, 1997). A Figura 8 representa a estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de *Burkholderia cepacia*.

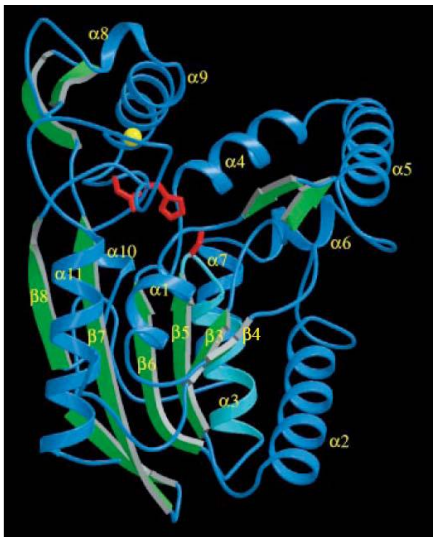


Figura 8. Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de *Burkholderia cepacia*. As fitas β estão representadas como setas (verde) e as hélices em azul. A posição do íon Ca^{2+} está indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho (SCHRAG *et al.*, 1997).

A tampa hidrofóbica de lipases de *B. cepacia* tem seu maior contato com o resto da proteína na conformação fechada por interações, quase sempre de van der Waals, da hélice α4 com a hélice α9 e as duas fitas β antiparalelas, englobando os resíduos 214- 228 da molécula. (SCHRAG *et al.*, 1997; KIM *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 da

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 (SCHRAG *et al*., 1997; KIM *et al*., 1997).

Lipases de *Candida antarctica*

A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é dentre diversas enzimas, uma das mais utilizadas em biocatálise. A CALB é altamente regiosseletiva na síntese de monoésteres de hidratos de carbono e enantiosseletiva na resolução de inúmeros compostos como aminas, ácidos e álcoois (KOTIK *et al*., 2005).

ANDERSON *et al*. (1994), determinaram a estrutura desta lipase, constituída por 317 aminoácidos com um peso molecular ca. de 30 kDa (Figura 9).

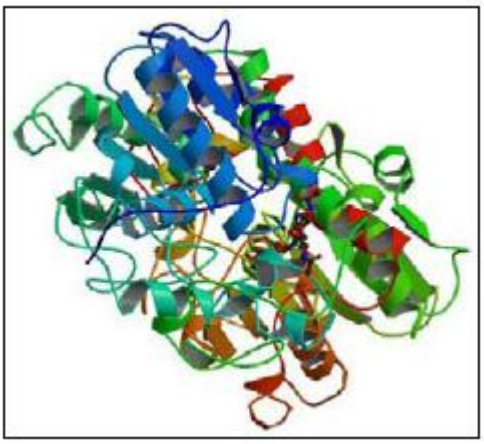


Figura 9. Estrutura tridimensional da lipase B de *Candida antarctica* (CALB)- (Reproduzido por Martins 2008)

O sítio ativo da enzima é constituído pela tríade catalítica Ser 105- His 224- Asp 187 (HIDE *et al*., 2002). Ao contrário da maioria das lipases, CALB não apresenta ativação interfacial, sendo o acesso ao sítio ativo feito por um canal estreito com uma particularidade da existência de uma pequena hélice de elevada mobilidade perto deste sítio.

CALB encontra-se disponível no mercado na forma livre ou imobilizada através de ligação iônica.

4.4. Mecanismo Cinético de lipases

O mecanismo cinético aceito para descrever a ação das lipases é o Ping Pong Bi Bi. Este mecanismo consiste de duas etapas principais: 1) ataque nucleofílico na ligação éster do substrato pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxil do resíduo serina do sítio ativo após a abertura da tampa (resultando na formação de complexo enzimático acilado e desprendimento de espécie álcool do substrato original) e 2) hidrólise do complexo enzimático acilado, resultando na regeneração da enzima (JAEGER *et al*., 1999; PAIVA *et al*., 2000).

A Figura 10 apresenta de forma esquemática as etapas da hidrólise catalisada por lipases e os estados transientes formados, como se segue:

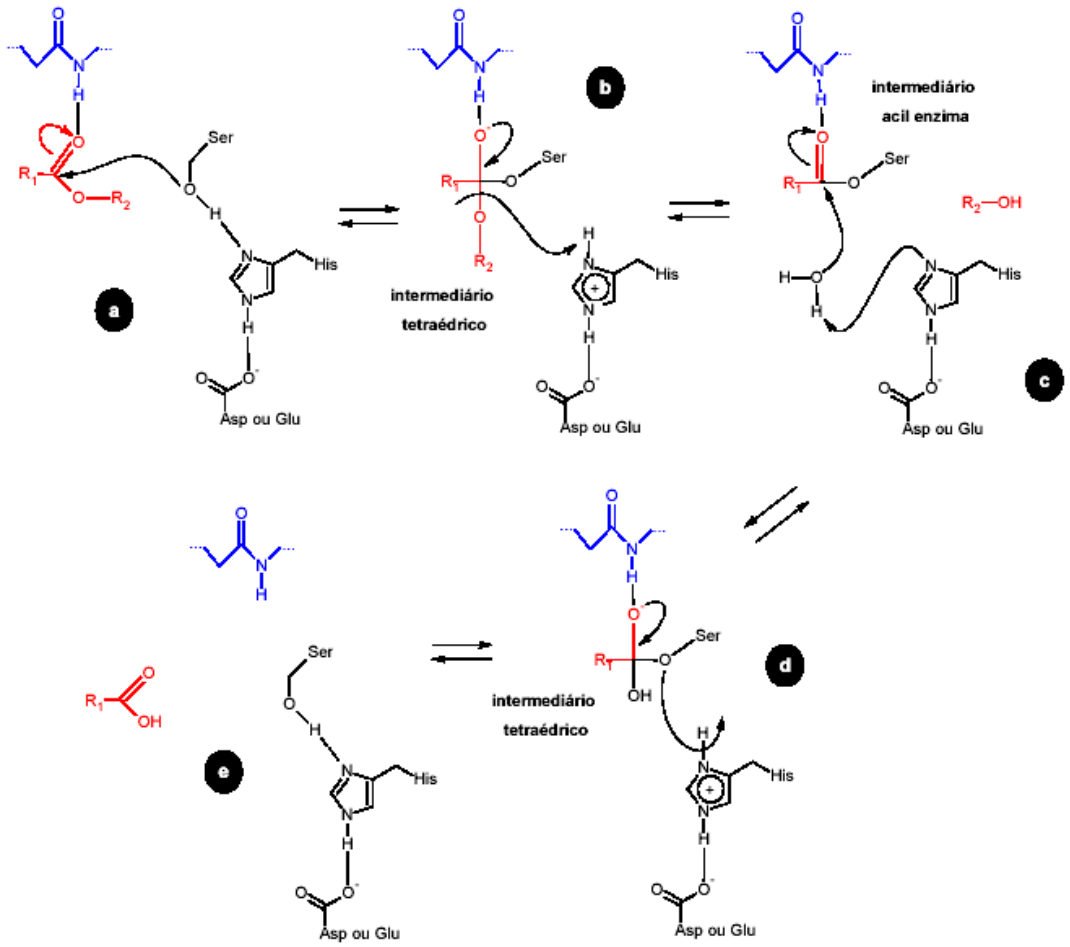


Figura 10. Esquema mecanístico de reação de lipases. A tríade catalítica e a água são mostradas em preto, os resíduos da cavidade do oxiânion em azul e o substrato em vermelho. Modificado de JAEGER *et al*. (1994) por ALMEIDA (2005).

a. Com a formação de uma ligação de hidrogênio com a histidina adjacente, o grupamento hidroxila da serina é ativado. Ocorre então ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do substrato éster e a abertura da ligação C=O, dando origem ao intermediário tetraédrico. Nesta fase, a histidina da tríade catalítica tem um papel fundamental aceitando em seu anel imidazólico o hidrogênio liberado pela serina. O aspartato (ou o glutamato) estabiliza a carga positiva formada na histidina.

b. Primeiramente o intermediário tetraédrico formado é estabilizado por ligações de hidrogênio com os grupamentos amidas dos resíduos pertencentes a chamada "cavidade do oxiânion" (representado em azul na Figura 10). Segundo, o intermediário tetraédrico é desfeito, pelo retorno da ligação C=O e consequentemente ocorre a clivagem da ligação éster. Liberação da porção álcool, cujo oxigênio recebe um próton proveniente da histidina, que age como um ácido, formando assim o intermediário acil enzima. O álcool produzido na reação de clivagem é liberado.

c. Ocorre a formação do intermediário covalente na forma enzima "acilada", onde o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo serina da enzima. A molécula de água que se aproxima é ativada pelo resíduo histidina adjacente e o íon hidroxila resultante promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente.

d. Ataque ao carbono suscetível do intermediário acil-enzima, abrindo a ligação C=O, formando o segundo intermediário tetraédrico devido ao caráter nucleofílico de uma molécula de água. O caráter nucleofílico é ainda acentuado pela ação básica da histidina protonada.

e. Retorno da ligação C=O. Retorno também do segundo intermediário tetraédrico, que é desfeito. Liberação do ácido carboxílico e da enzima livre.

A Figura 11 apresenta de forma esquemática o mecanismo Ping Pong Bi Bi envolvendo substratos e produtos múltiplos usando a notação de Cleland.

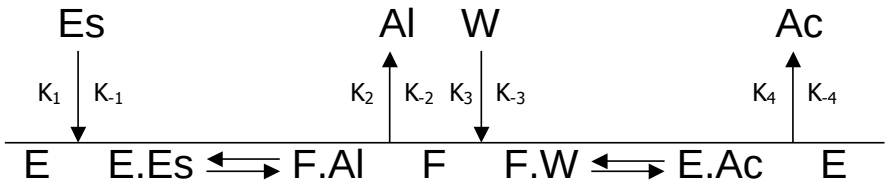


Figura 11 – Mecanismo cinético (Ping Pong Bi Bi) de reações com múltiplos produtos e substratos catalisadas por lipases (E: enzima; Es: éster; Al: álcool; Ac: ácido; W: água; i = 1,2,...,I; j=1,2,...,J) (Reproduzido de PAIVA *et al*., 2000).

Segundo o mecanismo Ping Pong Bi Bi, a taxa de hidrólise (r) de um éster gerando um ácido e um álcool, considerando a inibição pelo substrato e pelo produto, pode ser genericamente descrita através da Equação 1 (PAIVA *et al*., 2000).

$$r = \frac{\nu_{\max,f}\,\nu_{\max,r}\left([Es][W] + \frac{[Al][Ac]}{K_{eq}}\right)}{\left(\begin{array}{l}\nu_{\max,r}K_{m,W}[Es] + \nu_{\max,r}K_{m,Es}[W] + \frac{K_{m,Ac}\nu_{\max,f}}{K_{eq}}[Al] + \frac{K_{m,Al}\nu_{\max,f}}{K_{eq}}[Ac] + \\ + \nu_{\max,r}[Es][W] + \frac{K_{m,Ac}\nu_{\max,f}}{K_{eq}K_{ii,Es}}[Es][Al] + \frac{K_{m,Es}\nu_{\max,r}}{K_{ii,Ac}}[W][Ac] + \frac{\nu_{\max,f}}{K_{eq}}[Al][Ac]\end{array}\right)} \qquad \text{(Eq.1)}$$

onde, Ac: ácido; Al: álcool; Es: éster; W: água; os subscritos f e r denotam o sentido direto (hidrólise) e reverso (síntese) das reações, respectivamente; e $\nu_{max,f}$; $\nu_{max,r}$; K_{eq}; $K_{m,Ac}$; $K_{m,Es}$; $K_{i,Es}$; $K_{m,W}$; $K_{m,Al}$ e $K_{i,Ac}$ são parâmetros globais relativos às taxas máximas, constante de equilíbrio, constantes de Michaelis-Menten e constantes de inibição, respectivamente, que podem ser ajustados independentemente a partir de dados de concentração de produtos e reagentes.

Quando água está presente em grande excesso no meio reacional (concentração de água permanece constante) a equação genérica que descreve o mecanismo Ping Pong Bi Bi pode ser simplificada em uma expressão bem mais simples, semelhante a expressão de taxa de reação de Michaelis-Menten, representada pela Equação 2 (PAIVA *et al*., 2000):

$$r = \frac{\nu_{\max,aparente}[Es]}{K_{m,aparente} + [Es]} \qquad \text{(Eq.2)}$$

onde, ν_{max},aparente definida como $\nu_{max,f}[W]/(K_{m,W} + [W])$ denota a taxa máxima aparente da reação no sentido direto (hidrólise) e $K_{m,\ aparente}$ definido como $K_{m,Es}[W]/(K_{m,W} + [W])$ denota uma constante de Michaëlis-Menten aparente.

4.4.1 Resolução de racematos catalisada por lipases

A Figura 12 apresenta as metodologias para obtenção do álcool (ROH*) e o acetato (ROAc*), opticamente enriquecidos.

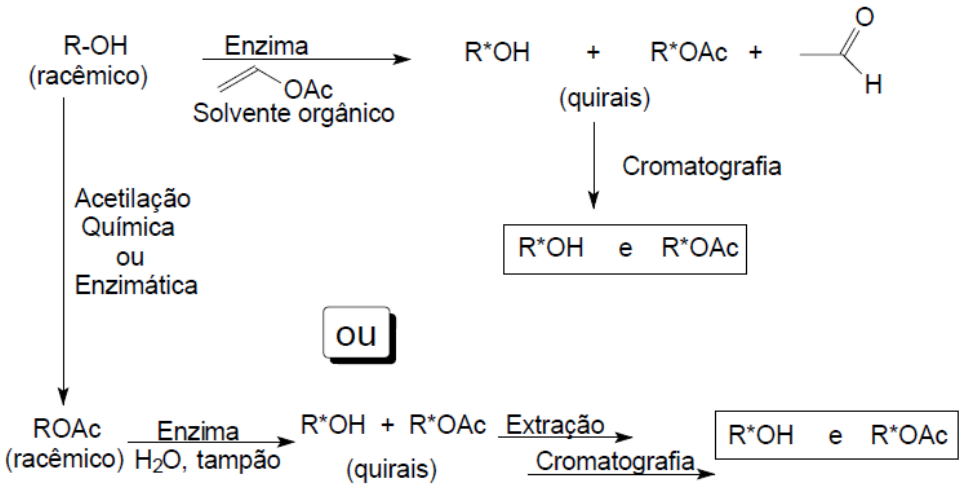


Figura 12. Alternativas biocatalíticas que podem ser empregadas na resolução cinética de um álcool racêmico através de hidrolases (Reproduzido de ZIMMERMANN, 2005).

A obtenção do álcool pode ser feita através de transesterificação enzimática entre ROH racêmico e acetato de vinila, seguida de hidrólise química ou alternativamente, através de esterificação química seguida de hidrólise enzimática (ZIMMERMANN, 2005).

Em ambas as metodologias, a resolução enantiomérica é realizada na etapa biocatalítica. Dependendo da enzima, substrato e das condições experimentais utilizadas, pode-se obter diferentes enantiômeros de ROH e ROAc.

O mecanismo geral para a reação de transesterificação de um álcool pode ser visto na Figura 13.

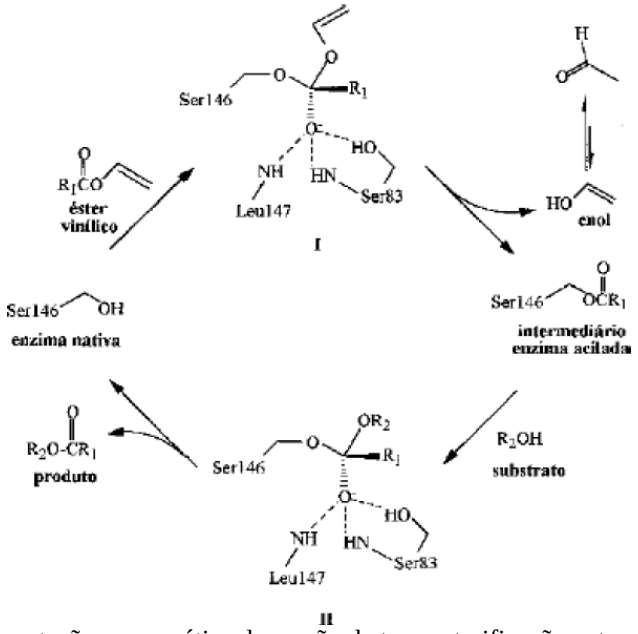


Figura 13. Representação esquemática da reação de transesterificação entre um álcool e um éster vinílico catalisada por lipase (Baseado em HOLMQUIST *et al*. 1995).

Analisando a Figura 13, nota-se que dois estados de transição diferentes estão envolvidos neste processo catalítico. O primeiro estado (I) é gerado durante a formação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o éster vinílico em uma espécie intermediária, que é a enzima acilada.

Nestes tipos de reações são empregados, geralmente, acetato de vinila como doadores de acila. Neste caso, o enol formado após a acilação do resíduo reativo da tríade catalítica é rapidamente transformado no seu tautômero (acetaldeído), o qual é mais estável e volátil. Esta estratégia impede uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa e o substrato, deslocando o equilíbrio da reação em direção aos produtos (VALLIKIVI *et al*., 2003).

O segundo estágio de transição (II) ocorre quando a enzima acilada é clivada pelo álcool R_2OH, formando um éster como produto. Em ambos estados de transição, a carga negativa gerada pelo oxigênio, após o ataque nucleofílico, é estabilizada através das ligações de hidrogênio pelos resíduos serina e leucina. Reações de transesterificação, na presença de excesso de ésteres vinílicos como doadores de acila, em solventes orgânicos anidros, tornam as reações irreversíveis (LAWSON *et al*., 1994).

4.5. Influência do solvente a da atividade de água

Diversos fatores afetam uma reação de resolução enantiomérica desde o sistema de solvente empregado, que tem o poder de alterar a especificidade, quimiosseletividade, regiosseletividade e enantiosseletividade das lipases, até o teor de água presente na reação.

No início de um trabalho, há a necessidade da realização de experimentos preliminares, os quais identificarão o melhor sistema de solvente, as enzimas que serão capazes de catalisar a reação e quais agentes acilantes poderão ser empregados.

Apesar da grande influência da natureza do solvente sobre a enantiosseletividade da enzima, ainda não foi estabelecido um consenso sobre qual parâmetro melhor descreve a influência do solvente sobre a reação enzimática (COSTA e AMORIM, 1999, LIU *et al*., 2009).

Influência do solvente

Uma vez que o conceito de biotransformação está associado ao uso de biocatalisadores, onde a água é o solvente preponderante, é fácil compreender que a mesma função tenha sido desempenhada por este solvente em inúmeros estudos da cinética enzimática. Contudo, o uso exclusivo da água como solvente restringia a gama de aplicações da biocatálise, bem como limitava a produtividade de diversos processos que envolvessem solventes hidrófobos. Por outro lado, a constatação de que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos hidrofóbicos levou a conclusão de que os meios não aquosos são igualmente adequados à expressão de atividade biocatalítica. A convergência dos dois aspectos conduziu a incorporação do meio reacional de solventes orgânicos, fluídos supercríticos, fases gasosas ou sólidas, conhecidos hoje como meios não convencionais (AIRES, 2002).

Solventes orgânicos têm sido utilizados como meios reacionais para biotransformações enzimáticas em inúmeros processos de síntese orgânica. Muitos estudos vêm empregando diferentes sistemas de solventes na resolução enantiosseletiva (COSTA e AMORIM, 1999, LIU *et al*., 2009). A seletividade das enzimas, incluindo enantio, regio e quimiosseletividades, é alterada 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).

Em biocatálise, as propriedades dos solventes como polaridade ($1/\varepsilon$), hidrofobicidade (geralmente determinada como log P- logaritmo do coeficiente de partição em água-octanol), geometria molecular e habilidade de solvatação são fatores significativos. Apesar de ainda não ter sido estabelecido um parâmetro que melhor descreva a influência do solvente sobre a reação enzimática, dois parâmetros vêm sendo utilizados por diferentes autores para caracterizar as propriedades físico-químicas dos solventes, log P e constante dielétrica (ε). Dentre eles, 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). Log P é definido como o logaritmo do coeficiente de partição de uma substância em um sistema padrão de duas fases água/1-octanol (ADLERCREUTZ, 1994).

Apesar das numerosas exceções, o parâmetro log P é o que apresenta melhor correlação com a atividade enzimática e, geralmente, as enzimas são mais estáveis em solventes com caráter hidrofóbico (log P>2) (YANG e RUSSEL, 1996). Contudo o efeito do solvente é distinto para cada enzima.

A Tabela 2, a seguir, lista alguns solventes de uso comum e os valores de log P relativos a eles.

Tabela 2 - Valor de log P de solventes orgânicos.

Solvente	log P	Solvente	log P
Metanol	-0,76	TBME	1,5
Acetonitrila	-0,33	Clorofórmio	2,0
Etanol	-0,23	Tolueno	2,5
Acetato de etila	0,68	Hexano	3,5

A forma como os solventes afetam a atividade enzimática e a enantiosseletividade ainda não é bem compreendida e as hipóteses apresentadas para explicar esse fenômeno apresentam discrepâncias entre si (COSTA e AMORIM, 1999). Pode-se observar nos trabalhos que exploram esse tema, a preocupação em salientar que os resultados alcançados são restritos aos sistemas estudados, evitando-se generalizações.

O fato de enzimas manterem a atividade catalítica em solventes orgânicos não possui explicação simples. A hipótese mais aceita é de que, quando a enzima é colocada em solvente orgânico anidro, está é cineticamente “congelada” no seu estado nativo. Isso ocorre em parte devido à baixa constante dielétrica do meio, que produz uma maior efetividade nas forças eletrostáticas responsáveis pela manutenção da estrutura enzimática (ZAKS e KLIBANOV, 1988; SECUNDO *et al*., 1992).

Diversos autores têm relatado a influência da hidrofobicidade do solvente na enantiosseletividade de enzima. De maneira geral, o efeito tem sido analisado em termos de partição, de moléculas de água presentes no sítio ativo da enzima (SAKURAI *et al*., 1988) ou de grupos funcionais dos substratos (TAWAKI e KLIBANOV, 1992). SAKURAI *et al.* (1988) observaram uma correlação linear entre a diferença de energia livre de ativação (ΔG) para a relação de transesterificação entre o éster *N*-acetil-2-cloroetil-alanina e propanol e os

valores de log P dos 13 diferentes solventes orgânicos empregados, utilizando subtilisina como catalisador da reação. Os autores encontraram uma relação inversa entre o valor ΔG e da hidrofobicidade, expressa em valores de log P, como consequência, uma relação inversa a enantiosseletividade. A dependência entre estes fatores ocorreu principalmente pela dificuldade no deslocamento das moléculas de água presente na cavidade hidrofóbica do sítio de ligação da enzima durante a ligação enzima-substrato. O deslocamento destas moléculas de água é termodinamicamente menos favorecido em solventes hidrofóbicos do que naqueles hidrofílicos. Portanto, se o enantiômero lento (menos reativo) precisa para reagir estar ligado no sítio ativo de uma forma não produtiva, consequentemente ele deverá deslocar algumas moléculas de água a menos que o enantiômero rápido (mais reativo). Neste caso, em solventes hidrófobicos, o enantiômero rápido sofre, proporcionalmente, uma maior diminuição na sua reatividade (uma vez que diminui a camada de solvatação do sítio ativo) que o enantiômero lento, diminuindo a enantiosseletividade da reação (SAKURAI *et al*., 1988).

Os solventes hidrofóbicos não retiram a água de solvatação da estrutura protéica, prevenindo a desnaturação e mantendo a estrutura conformacional da enzima. Moléculas do solvente podem ainda 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).

NAKAMURA *et al*. (1991) estabeleceram um modelo empírico para a escolha do solvente adequado em reações catalisadas por lipases. Segundo os autores, solventes cíclicos são os mais adequados para encontrar uma maior enantiosseletividade. Os autores estudaram a influência da estrutura do solvente na reação entre 1-nitro-propanol e acetato de vinila, utilizando lipase de *Pseudomonas sp*. como biocatalisador. Nakamura e colaboradores observaram que em solventes lineares obtinham maior valor de enantiosseletividade do que quando os respectivos solventes ramificados eram usados. Constataram ainda que em série homóloga aos cicloalcanos a enantiosseletividade diminuía conforme o aumento de carbonos na estrutura dos solventes cíclicos. Isso foi explicado pela facilidade dos solventes lineares e

cíclicos (com um menor número de carbono) se incorporarem melhor na cavidade menor do sítio ativo da enzima.

Influência da água

A camada de solvatação presente nas enzimas tem um papel fundamental atuando como componente primário do microambiente enzimático. Este ambiente é capaz de manter uma dinâmica molecular mínima, essencial à atividade enzimática em ambientes orgânicos (ZAKS, 1988).

O conceito termodinâmico da atividade de água (aw) se refere à quantidade de água em sistemas orgânicos, já que no equilíbrio, a atividade dos componentes é a mesma em todas as fases (HALLING, 2003; ADLERCREUTZ, 1996). A atividade de água (aw), é definida como a razão entre a pressão parcial da água no sistema (pw) e a pressão parcial da água pura (p^0_w), como mostra a Equação 3.

$$a_w = \frac{p_w}{p_w^0} \qquad \text{Eq. 3}$$

A atividade de água representa a umidade relativa do sistema considerado, situando-se entre 0 e 1, sendo que quando a atividade de água iguala-se a 1, já há formação de uma fase aquosa distinta (*apud* BARON, 2003).

A atividade de água das soluções salinas saturadas é uma propriedade da substância. A Tabela 3 apresenta uma lista com os sais mais adequados ao controle da atividade de água e as atividades de suas respectivas soluções.

Tabela 3. Soluções salinas saturadas adequadas ao controle da atividade de água.

Sal	**Atividade de água (25°C)**
LiCl	0,113
Acetato de potássio	0,225
$MgCl_2$	0,328
K_2CO_3	0,432
$SrCl_2$	0,708

Sal	Atividade de água (25°C)
KNO_3	0,936
K_2SO_4	0,973

Como relatado anteriormente, solventes hidrofílicos tendem a retirar esta camada de água da superfície proteica, podendo até inativá-la (GORMAN e DORDICK, 1992). Logo a quantidade ótima de água necessária à reação está relacionada também a polaridade do solvente. Metanol (log P = – 0,76) foi capaz de promover a dessorção de até 60% da água ligada a enzimas (quimiotripsina, subtilisina e peroxidase) enquanto hexano (log P = 3,5) promoveu a dessorção de apenas 0,5% da água ligada às mesmas enzimas (YANG e RUSSEL, 1996).

A quantidade de água presente no meio reacional, assim como qualquer outro substrato ou produto, afeta também o equilíbrio termodinâmico entre as reações catalisadas pelas enzimas, alterando a conversão de equilíbrio, embora não modifique a constante de equilíbrio (PAIVA *et al*., 2000).

A influência da atividade de água nos sistemas reacionais tem sido estudada por diferentes autores (SVENSSON *et al.*, 1994; VALIVETY *et al.*, 1992a). Os resultados obtidos pelos mesmos mostraram que lipases respondem diferentemente para um aumento da atividade de água. Enquanto algumas lipases possuem a atividade ótima em baixa atividade de água (*Rhizopus arrhizus*), outras possuem o aumento da atividade com o aumento da atividade de água (*Pseudomonas* sp.). Ainda há aquelas que possuem perfis intermediários (Lipozyme and *Candida rugosa*) (WEHTJE e ADLERCREUTZ, 1997). A Figura 14 mostra a variação no perfil de atividade de lipases de *Rhizopus arrhizus*, *Candida rugosa* e *Pseudomonas sp*. em um sistema empregando como reação modelo a esterificação entre ácido decanóico e dodecanol (WEHTJE e ADLERCREUTZ, 1997).

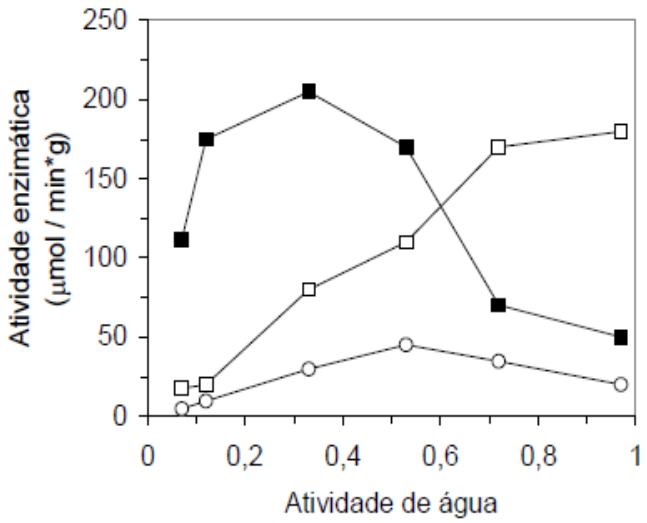


Figura 14. Efeito da atividade de água na atividade enzimática de lipases de origens diversas: *Rhizopus arrhizus* (■) ; *Candida rugosa* (○); *Pseudomonas sp*. (□) (WEHTJE e ADLERCREUTZ, 1997).

4.6. Quiralidade e Resolução Cinética de 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 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 (CAREY; SUNDBERG, 2007; MARCH, 1992).

A resolução cinética de pares de enantiômeros tem sido um método bastante empregado em laboratórios envolvidos em síntese assimétrica (Ostreicher *et al*., 2001).

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

CHEN e colaboradores (1982) foram os primeiros a encontrar relações úteis entre a extensão de conversão do substrato racêmico (c), a pureza óptica expressa como o excesso enantiomérico (ee) do produto ou do substrato remanescente, e a razão enantiomérica no estudo de resoluções de racematos. O parâmetro razão enantiomérica, como proposto pelos autores tem um significado mais amplo do que a simples aplicação de misturas de enantiômeros. Este parâmetro pode ser aplicado a qualquer reação enzimática com substratos alternativos, enantiômeros ou não (Pinto *et al*., 2001).

Para que o processo de resolução seja eficiente, é necessário que as constantes de especificidade das reações para os enantiômeros sejam diferentes. Quanto maior a diferença, maior o poder da resolução.

Admitindo que A é o enantiômero que reage mais rapidamente e B é o enantiômero que reage mais lentamente, e que ambos competem pelo mesmo sitio ativo da enzima. O seguinte esquema (Figura 15) pode ser considerado para sistemas do tipo Michaeliano, assumindo que a reação é virtualmente irreversível e que os produtos gerados não interferem na reação:

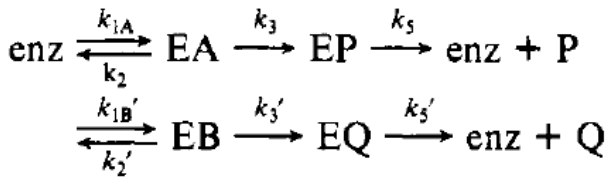


Figura 15. Esquema considerado para sistemas do tipo Michaeliano, assumindo que a reação é irreversível e que os produtos gerados não interferem na reação.

No estado estacionário, a razão entre as duas equações de velocidade é dada por:

$$\frac{v_A}{v_B} = \frac{V_A}{V_B}\frac{K_B}{K_A}\frac{A}{B} \qquad \text{(Eq. 4)}$$

onde V_A, K_A e V_B, K_B são velocidade máxima e constante de Michaelis dos substratos A e B, respectivamente. A equação 4 pode ser integrada em função do tempo:

$$\frac{\ln(A/A_0)}{\ln(B/B_0)} = \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E \qquad \text{(Eq. 5)}$$

onde, a razão enantiomérica (E), parâmetro cinético que informa a especificidade da enzima para os substratos alternativos, é a relação entre as duas eficiências catalíticas, V_{max}/K_M. Esta equação pode ser desenvolvida em termos de conversão e excesso enantiomérico do substrato (ee(S)). A conversão do racemato é a soma das conversões dos enantiômeros:

$$c = 1 - \frac{A + B}{A_0 + B_0} \qquad \text{(Eq. 6)}$$

O excesso enantiomérico é a diferença das frações molares dos enantiômeros da mistura com relação ao substrato, é dado por:

$$ee(S) = \frac{B - A}{A + B} \qquad \text{(Eq. 7)}$$

Substituindo as equações 6 e 7 na equação 5, tem-se que:

$$\frac{\ln[1 - c(1 - ee(S))]}{\ln[1 - c(1 + ee(S))]} \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E \qquad \text{(Eq. 8)}$$

Sendo assim, conclui-se que o parâmetro E, um parâmetro qualitativo e quantitativo (Costa e Amorim, 1999), é dependente da razão das constantes de especificidade (V/K) e é independente da concentração dos substratos.

Em experimentos de resolução cinética usando enzimas hidrolíticas como acilases, carboxiesterases e lipases, também é necessário relacionar a extensão da conversão (c) e do excesso enantiomérico do produto (*ee*(P)) ao valor da razão enantiomérica (E). Esta relação pode ser obtida convertendo a equação 5 na equação 9:

$$\frac{\ln[1 - c(1 + ee(P))]}{\ln[1 - c(1 - ee(P))]} \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E \qquad \text{(Eq. 9)}$$

onde o excesso enantiomérico com relação ao produto é dado por:

$$ee(P) = \frac{P-Q}{P+Q} \qquad \text{(Eq. 10)}$$

Embora a qualidade do produto da resolução de um racemato seja caracterizada pelo excesso enantiomérico (parâmetro que diz respeito a pureza óptica), a razão enantiomérica (E) é um parâmetro importante. Um valor elevado de E, para um determinado par enzima-substrato, é essencial para a constatação do sucesso da resolução enantiomérica (E). Valores de E menores que 15 tornam a análise inviável do ponto de vista dos propósitos mais práticos. Valores entre 15-30 são considerados valores moderados a bons. Acima destes valores o valor da razão enantiomérica (E) é considerado excelente. Valores de E > 200 não podem ser determinados com precisão devido a imprecisões emergidas dos métodos das determinações do excesso enantiomérico (ex. RMN, CLAE ou CG). Neste escopo, uma simples mudança na variação do excesso enatiomérico causa uma mudança significativa no valor numérico de E (FABER, 1997; SIH *et al.*, 1992).

4.7. Inositóis

O inositol é um poliálcool cíclico contendo um anel de seis átomos de carbono e seis grupos OH (cicloexanopoliol) que está envolvido em diferentes processos bioquímicos. Em mamíferos os inositóis se encontram em forma de derivados fosforilados os quais participam da comunicação celular (ALMEIDA *et al*,. 2003).

Os inositóis ainda participam da cascata de fosfoinositídeos (Figura 16).

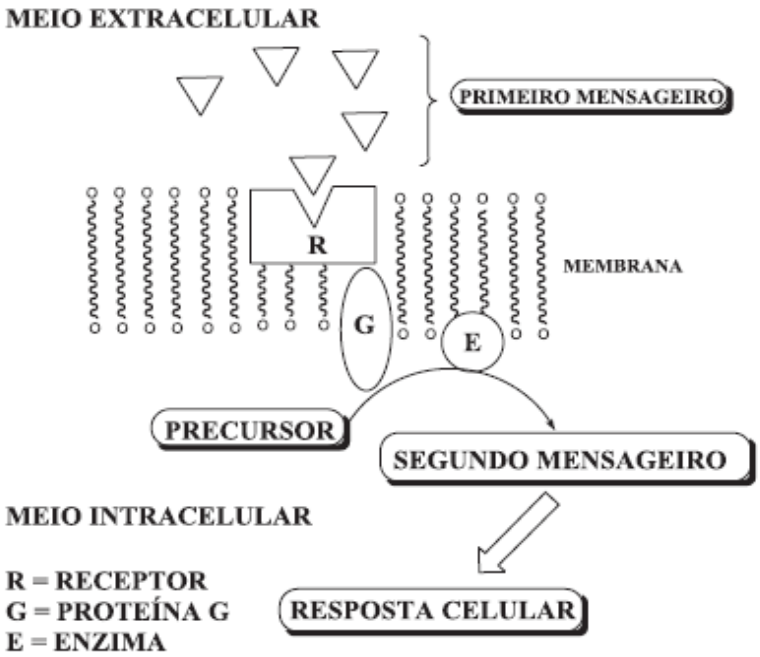


Figura 16. Mecanismo de transdução celular (Reproduzido por ALMEIDA *et al.* 2003)

Em uma comunicação celular inicial, um primeiro mensageiro (hormônio, fator de crescimento, etc.) é secretado e circula no meio extracelular. Este primeiro mensageiro participará da sinalização celular, sendo captado por receptores específicos na superfície da célula. Consequentemente uma série de eventos começa a ocorrer no interior da célula até a liberação do segundo mensageiro (ex.: um derivado do *mio*-inositol), o qual ocasiona diversas respostas em nível celular. O derivado trifosfatado InsP_3 é o 2º mensageiro mais importante dos derivados dos inositóis.

Os inositóis podem ser arranjados em nove estereoisômeros: *scilo*, *mio*, *neo*, *epi*, D e L *quiro*, *cis*, *muco* e *allo* (Figura 17).

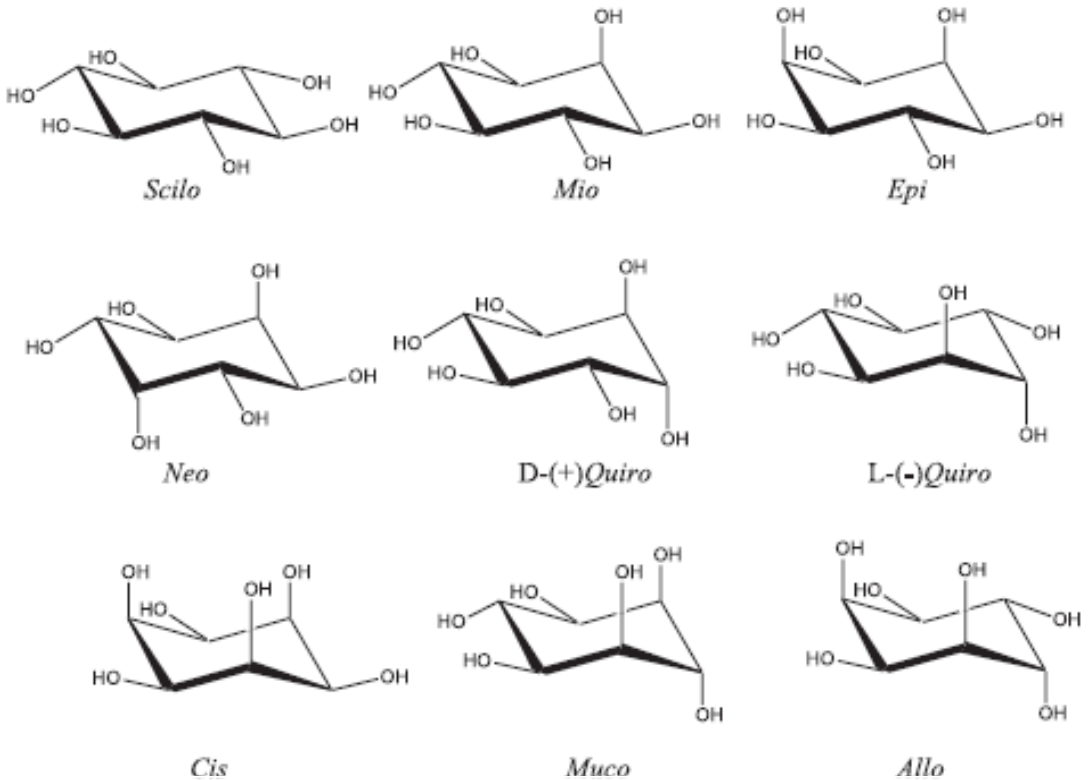


Figura 17– Estereoisômeros do inositol (Reproduzido por ALMEIDA *et al.* 2003)

Dos estereoiômeros do inositol, o *mio*-inositol é o mais abundante na natureza, sendo produzido a partir da glicose. O *mio*-inositol é um composto *meso* (aquiral), visto que apresenta um plano de simetria entre os carbonos C2 e C5 (Figura 18).

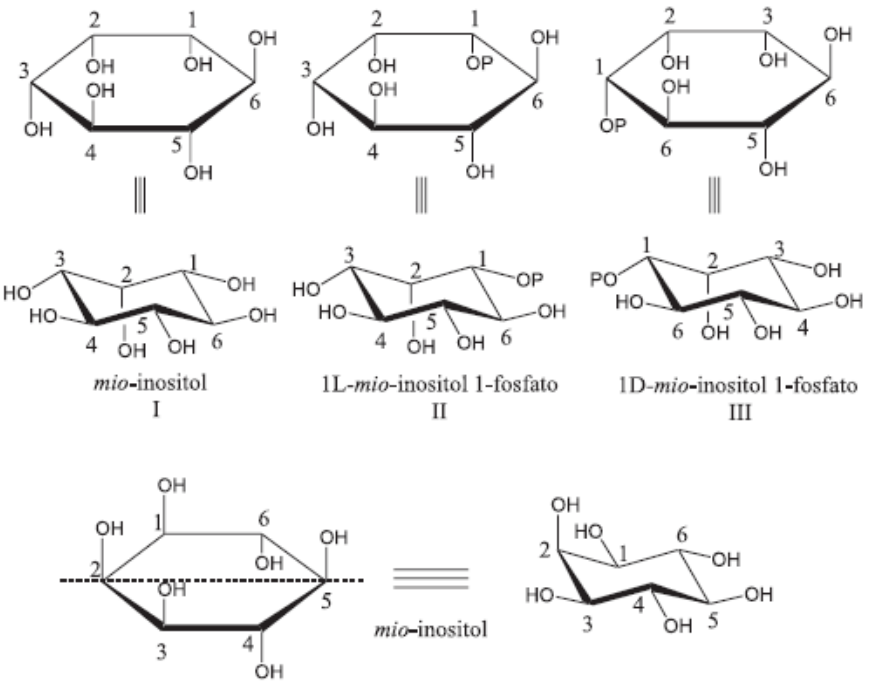


Figura 18 – Nomenclatura e plano de simetria do mio-inositol (Reproduzido por ALMEIDA *et al*., 2003).

Mio-inositóis mono-substituídos, de forma não estereosseletiva, nas posições 1, 3, 4 ou 6 geram racematos.

Recentemente, pesquisadores da UFRJ e colaboradores descobriram que o 1-D-6-desóxi-6-flúor-mio-inositol (6-FIns) um análogo fluoretado quiral não comercial de *mio*-inositol é um forte inibidor do crescimento do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas (OLIVEIRA e EINECKER-LAMAS, 2000). A literatura mostra que tem havido um interesse considerável na síntese de derivados de *mio*-inositol (SCHEDLER e BAKER, 2004; KOZIKOVSKI *et al*., 1990). Um dos obstáculos para trabalhos de Síntese Orgânica / Química Medicinal voltados para inositóis é a dificuldade de síntese destas substâncias. Processos de múltiplas etapas estão envolvidos (SURESHAN *et al*., 2003; POTTER & LAMPE, 1995; BILLINGTON, 1989). Devido à sua disponibilidade, boa parte dos estudos realizados nesta área fez uso do proprio *mio*-inositol para a construção de derivados quirais desta substância. As rotas baseadas no uso do *mio*-inositol têm como vantagem o uso de reações simples e disponibilidade de protocolos estabelecidos. Entretanto, existe a necessidade de resolução óptica de intermediários racêmicos (SURESHAN *et al*., 2003; POTTER e LAMPE, 1995; SIMAS *et al*., 2011; CUNHA *et al*., 2010).

A resolução óptica de intermediários racêmicos de *mio*-inositol, aqui estudados, foram realizadas por lipases através de reações de alcoólise (rota similar a apresentada na Figura 12, p. 23).

4.8. Síntese de (±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-3)

Um dos derivados racêmicos de *mio*-inositol utilizados como substrato, (±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol, é um intermediário da síntese de D-2,4,5 tri-*O*-benzil-*mio*-inositol. GIGG (1994) e DESAI *et al.* (1996) foram os autores que também sintetizaram o mesmo substrato, todavia uma rota diferente foi utilizada neste trabalho.

A síntese química de *rac*-3, realizada pela química Karla Ceodaro, NPPN-UFRJ, foi feita em apenas duas etapas, obtendo 48% de rendimento. Já para os outros autores mencionados acima, uma rota mais longa é utilizada para a síntese deste racemato, o que mostra mais uma vantagem para a metodologia do nosso grupo de estudo.

D-2,4,5 tri-benzil-*mio*-inositol é uma estrutura análoga ao D-1,4,5 tri-benzil-*mio*-inositol. Este é bem conhecido e comentado na literatura uma vez que desempenha um papel fundamental na mobilização de cálcio intracelular. Como muitas células de mamíferos possuem receptores para D-1,4,5 tri-benzil-*mio*-inositol, o estudo destes compostos, derivados de *mio*-inositol, são de extrema importância para um maior entendimento na sinalização celular (MILLS e POTTER, 2002 e DESAI *et al*. 1994).

4.9. Otimização do processo utilizando derivados do *mio*-inositol pela técnica de planejamento experimental

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, tem levado os profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas de planejamentos de experimentos (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O planejamento experimental, baseado nos fundamentos estatísticos, é sem dúvida alguma, uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas de um processo, desenvolvimento da formulação de produtos dentro das especificações desejadas ou

simplesmente para avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Inúmeras são as vantagens do planejamento experimental tais como redução do número de experimentos melhorando a qualidade da informação obtida através dos resultados, o que leva a uma diminuição do tempo empregado e do custo final; Análise de fatores simultaneamente permitindo a verificação e quantificação dos efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse; Estudar mais de uma variável de resposta ao mesmo tempo etc. (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Em função do número de fatores envolvidos, diversos são os tipos de planejamento experimentais possíveis.

O planejamento composto central deve ser utilizado quando se quiser verificar a curvatura de um plano, ou seja, para verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Os tipos de planejamentos possíveis quando se tem 4 variáveis (como no presente trabalho) são DCCR (Delineamento composto central rotacional) e Fracionado [Resolução IV- 2^3 + (4=123)]. Entretanto existem algumas estratégias que podem ser empregadas em cada um destes planejamentos:

DCCR- Com 4 variáveis, a estratégia seria um planejamento 2^4 =16 + pc (pontos centrais) +8 axiais. Quando este planejamento é utilizado podem ser obtidas informações tais como cálculo dos efeitos e análise de superfície de resposta.

Fracionado- Com 4 variáveis, a estratégia seria um planejamento 2^{4-1} = 8 + pc (pontos centrais). Quando este planejamento é utilizado podem se obter informações tais como cálculo dos efeitos principais e indicações das variáveis que devem ser incluídas nos delineamentos seguintes. Após este planejamento será definido as novas faixas que devem ser estudadas para cada variável. Vale ressaltar que neste planejamento o número de ensaios realizados deve ser no mínimo igual ao número de variáveis mais 4 ensaios (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O planejamento Plackett & Burman tem o mesmo objetivo que o planejamento Fracionário, escolha daquelas variáveis que devem ser incluídas nos planejamentos seguintes, porém quando se tem menos que 8 variáveis, este planejamento não é interessante. A partir de 8 variáveis este planejamento se torna mais interessante para a análise dos efeitos, pois são mais flexíveis quanto ao número de ensaios (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Independente do planejamento experimental escolhido é imprescindível a realização de no mínimo três repetições na condição dos pontos centrais. Com isso o erro puro pode ser estimado, sendo possível avaliar a repetibilidade do processo. Além disso, a curvatura do plano pode ser avaliada e a significância estatística dos fatores nestes (RODRIGUES e IEMMA, 2005; CALADO e MONTGOMERY 2003). Geralmente o número de pontos centrais variam 3 a 5.

4.9.1 Testes estatísticos para a verificação da adequação do modelo

Tabela Anova

A Análise de Variância (ANOVA) mostra a validade do modelo pelo teste F e o resíduo que mostra a magnitude do erro experimental.

Vale ressaltar que quanto menor o valor de "p-level" mais significativo é o efeito do fator sendo considerados significativos valores a baixo de 0,05. Os valores marginalmente significativos estão entre 0,050 e 0,100. Quanto maior o valor de *F* maior a significância do fator, devendo ser assim considerados os termos que apresentem um valor do teste *F* maior do que o valor de *F* tabelado.

A tabela de ANOVA apresenta ainda o valor do coeficiente de determinação (R^2), apresentado na tabela como R-sqr. O R^2 é uma medida da quantidade de redução na variabilidade de y, obtida pelo uso dos regressores x_1, x_2, ..., x_k . Como no caso da regressão múltipla simples, temos de ter $0 \leq R^2 \leq 1$ (sendo que R^2 é melhor quanto mais próximo de 1).

Erro experimental

O planejamento experimental permite o cálculo e a avaliação do erro experimental. Esta avaliação é fundamental para que se possa especificar o nível de confiança estatística com o qual se pode estimar a reprodutibilidade do resultado desejado. Com a avaliação do erro experimental, pode-se assegurar a estabilidade do processo, caso ocorra uma variação drástica na resposta, tem-se como saber se esta é fruto de uma alteração da condição de um parâmetro ou se é fruto de um erro experimental provocado por alterações laboratoriais (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Diagrama de pareto

O diagrama de Pareto é mais um artifício com o objetivo de mostrar quais fatores foram estatisticamente significativos pelo valor de p. Estes são apresentados em ordem decrescente de significância.

Análise Residual

Os resíduos do modelo de regressão múltipla, definidos por $e_i = y_i - \hat{y}_i$, desenvolvem um papel no julgamento da adequação do modelo, da mesma forma que para a regressão linear simples (MONTGOMERY e RUNGER, 2003).

Análise da variância

Ainda, para fazermos a verificação da adequação do modelo, é preciso realizamos a análise da variância. Esta é um teste exato de hipóteses de nenhuma diferença nas médias dos tratamentos. Dessa forma, é primordial verificar que essas suposições sejam válidas. Para isso, devem-se realizar vários testes nos resíduos.

Teste da Normalidade

A fim de se verificar a adequação do modelo, verifica-se no primeiro momento a suposição de normalidade dos erros. A análise pode ser vista pelo gráfico de probabilidade normal dos resíduos, gerado pelo software *Statistica*. O modelo esperado pode ser visto na Figura 19.

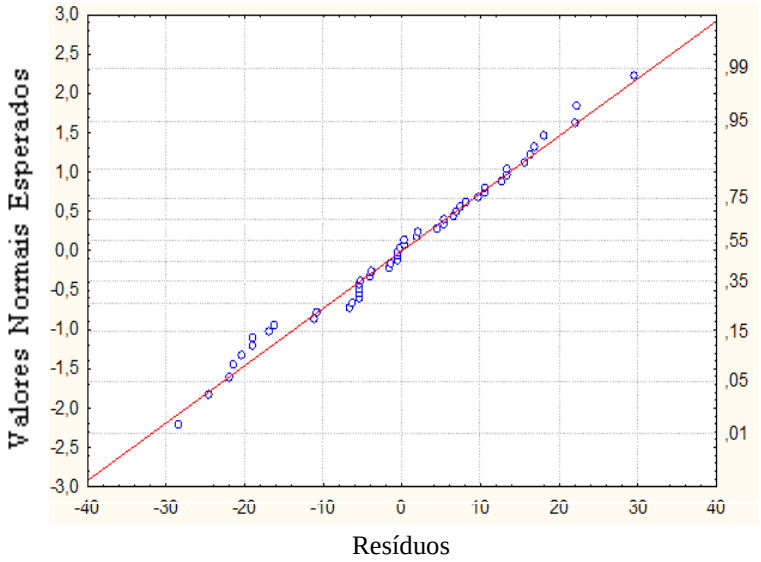


Figura 19. Modelo do Gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Reproduzido por CALADO e MONTGOMERY, 2003)

Quanto mais próximos os pontos experimentais estiverem da linha contínua, mais será válida a suposição da normalidade dos resíduos. Segundo CALADO e MONTGOMERY (2003), os pontos devem estar cobertos por um “lápis gordo” colocado sobre a linha reta. Isso garante a normalidade dos resíduos.

Outros gráficos comumente usados na análise residual são aqueles que relacionam os resíduos com a sequência de tempo, com os valores previstos da variável dependente ou com os valores da variável independente. CALADO e MONTGOMERY (2003) ressaltaram a análise do gráfico da homogeneidade da variância que pode apresentar quatro diferentes padrões de comportamento conforme apresentado na Figura 20.

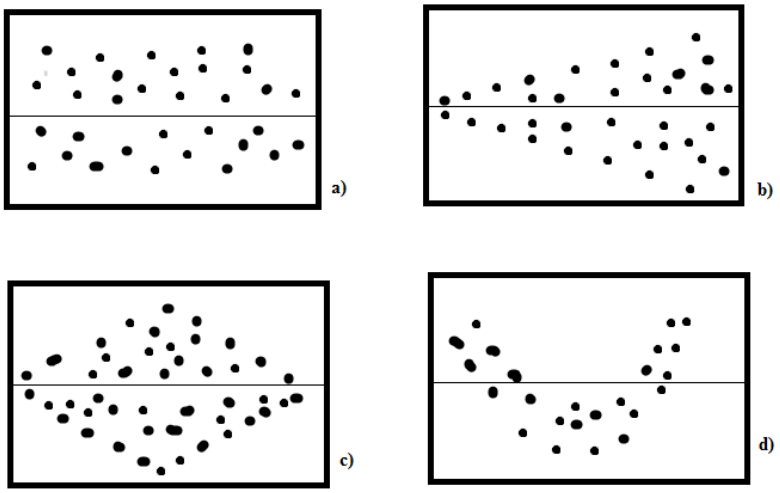


Figura 20. Padrões de comportamento dos gráficos dos resíduos (Reproduzido por MONTGOMERY, 2001).

A Figura 20 apresenta os possíveis padrões da análise do gráfico dos resíduos. A letra (a) mostra o aspecto esperado para este tipo de gráfico, a forma aleatória da variância que caracteriza uma variância constante dos erros. A letra (b) significa que há um aumento da variância com o tempo; a letra (c) esquematiza o padrão da desigualdade na variância e a letra (d) diz a respeito de termos de ordens superiores devem ser adicionados ao modelo.

O Planejamento Composto Central é um planejamento usado quando se quer verificar a curvatura de um plano, ou seja, para verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão.

Testes de Shapiro e Kolmogorov-Smirnov

Uma forma de obter uma análise quantitativa de teste de normalidade é realizando os testes de Shapiro e Kolmogorov-Smirnov (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Para ambos os testes, se o valor calculado é estatisticamente significativo (p=0,05) rejeita-se a hipótese que a distribuição é normal. Portanto para a distribuição ser considerada normal o valor de p deve ser maior que 0,05.

O teste de Kolmogorov-Smirnov baseia-se na máxima diferença entre a distribuição acumulada da amostra e a distribuição acumulada esperada.

Obtenção dos valores ótimos para o planejamento pela função *desirability*

Com o objetivo de se obter exatamente os fatores ótimos, a função *desirability* pode ser utilizada (programa *statistica*).

Quando se tem mais de uma variável de resposta, há o interesse de se colocar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam simultaneamente todos os requisitos necessários às variáveis dependentes. A busca da faixa desejável pode ser feita graficamente pela otimização com restrição onde métodos de programação (não lineares) são feitos (Calado e Montgomery 2003). Segundo os autores, a abordagem geral consiste primeiramente na conversão de cada resposta y1 em uma função individual: *desirability* (d_i). Esta função varia entre $0 \leq d_i \leq 1$ e é interpretado da seguinte forma: caso a resposta for aquela que se deseja, $d_i = 1$, porém se a resposta estiver fora da região de aceite, $d_i = 0$. No caso, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a *desirability* global. O *Statistica* usa esta abordagem, usada por DERRINGER e SUICH (1980).

5.0 Materiais e Métodos

As lipases utilizadas neste trabalho foram de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) e de *Candida antarctica* B (CalB, Novozym 435) obtidas pela Novozymes. As lipases de *Pseudomonas species* (PS Amano, PSC Amano II e PS-IM), *Rhizopus javonicus* (F-AP15), *Aspergillus niger* (A-12), *Pseudomonas fluorescens* (AK Amano), *Candida rugosa* (AY-30 Amano), *Penicillium camemberti* (lipase G Amano) e *Rhizopus oryzae* (lipase D Amano) foram obtidas pela Amano. Lipomod 34P foi obtida pela Biocatalysts e a lipase liofilizada de *Yarrowia lipolytica* foi obtida pelo laboratório Biose, da Escola de Química (EQ-UFRJ).

5.1 Síntese dos substratos

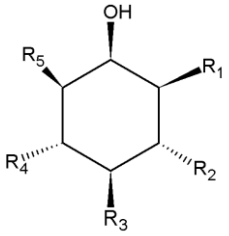
Os substratos foram sintetizados pelo laboratório Roderick Barnes, coordenado pelo Professor Alessandro B. C. Simas, NPPN (Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais), UFRJ. Estes são apresentados na Tabela 4 e estão relatados a seguir:

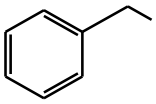
- (±)-1,4,5,6-tetra-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-1)

- (±)-1,4,5,6-tetra-*O*-alil-*mio*-inositol (*rac*-2)

- (±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-3)

Tabela 4. Derivados de mio-inositol tri e tetra-substituídos com grupamento benzila e tri-substituído com grupamento alila.

Substrato racêmico		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
	*rac*-1	OH	Obn	Obn	Obn	Obn
	rac-2	OH	OH	Acila	Acila	Acila
	rac-3	OBn	Obn	OH	OH	Obn

Bn = 

5.2. Acetilação enzimática dos substratos sintetizados *rac*-1, *rac*-2 e *rac*-3

As reações enzimáticas foram realizadas em frascos fechados termostatizados e agitados magneticamente (Figura 21).

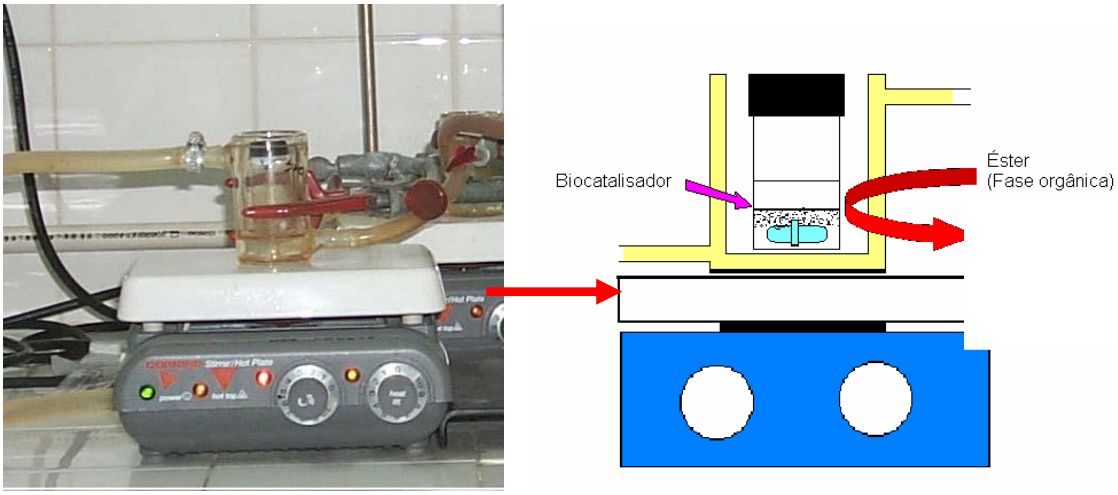


Figura 21. Foto da aparelhagem real e esquema do sistema experimental empregado nas reações de acetilação de *rac*-1, *rac*-2 e *rac*-3 (Reproduzido por BEVILAQUA, 2005).

Utilizou-se 5mg de substrato dissolvidos em 2,5mL de acetato de etila, acetato de vinila ou acetato de vinila: hexano (6:4) e 50mg de enzima imobilizada ou liofilizada a 30°C por 120 horas como primeira etapa. Estas foram condições realizadas anteriormente por nosso grupo de estudo e selecionadas para a primeira etapa deste trabalho. Após o período descrito acima, as reações foram paralisadas pela remoção do biocatalisador do meio reacional da seguinte forma: A amostra foi centrifugada com o objetivo de separar o biocatalisador do produto. O sobrenadante contendo o produto foi levado no Concentrador a vácuo de velocidade (*Speed vac concentrator*-Savant SPD 1010-Thermo scientific*)*. O biocatalisador foi lavado ca. de três vezes com 1mL de acetato de etila afim de se retirar todo o produto contido no frasco. O biocatalisador, já separado, foi levado ao Concentrador a vácuo de velocidade *(Speed vac concentrator)* para a evaporação do solvente residual para posterior reutilização do mesmo.

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada fina (CCF), sendo utilizadas cromato folhas de alumínio KieselGel 60 F254 e como fase móvel hexano:acetato de etila (7:3). A visualização das substâncias cromatografadas foi realizada por revelação de $KMnO_4$ (Permanganato de Potássio).

O $KMnO_4$ é um agente oxidante de coloração violeta e foi preparado da seguinte forma:

1º Adiciona-se 150mL de água e 10g de K_2CO_3;

2º Adiciona-se 2,5mL de NaOH (5% aq.) e homogeneizar o sistema;

3º Formação do $KMnO_4$.

5.3 Efeito do agente acilante na conversão e na enantiosseletividade

Diferentes agentes acilantes foram usados com o objetivo de se estudar a influência dos mesmos nas reações.

As reações enzimáticas foram realizadas em frascos fechados termostatizados contendo 5 mg de substrato dissolvidos em 2,5mL de agente acilante (acetato de etila, acetato de vinila ou acetato de isopropenila) em sistema livre de solvente, 50mg de enzima (atividade em U/g está representada na tabela 8, p.55) a 30°C. Alíquotas de 100µL foram retiradas nos intervalos de 0.5, 6, 24, 48, 72, 96 e 120h. As reações foram paralisadas pela remoção do biocatalisador do meio reacional e o solvente foi evaporado no Concentrador a vácuo de velocidade (*Speed Vac Concentrator*- Savant SPD 1010-Thermo scientific). As amostras

foram resolubilizadas com 1mL de fase móvel acetronitrila:H_2O (60:40) para a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa e em coluna quiral.

5.4 Efeito do solvente na conversão e na enantiosseletividade

Para aquela reação onde a acetilação resultou em formação de produto para um determinado substrato utilizado, seguiu-se com a análise do efeito do solvente.

Dada a reconhecida influência do solvente na enantiosseletividade, diferentes solventes orgânicos (grau analítico, Vetec®) foram avaliados, em duplicata, para a reação de resolução cinética dos derivados do *mio*-inositol, catalisada pelas diferentes lipases: terc-metil butil éter, hexano, acetato de etila, acetato de vinila e acetato de isopropenila. As reações enzimáticas foram realizadas em frascos fechados termostatizados contendo 5 mg do substrato selecionado dissolvidos em 1,0 mL de solvente (terc-metil butil éter, hexano, acetato de etila, acetato de vinila e acetato de isopropenila), 1,5mL de acetato de vinila e 50mg de enzima a 30°C. Alíquotas de 100µL foram retiradas nos intervalos de 0.5, 6, 24, 48, 72, 96 e 120h. As reações foram paralisadas pela remoção do biocatalisador do meio reacional igualmente como descrito no item 5.2. As amostras foram resolubilizadas com 1mL de fase móvel acetronitrila: água (60:40) para a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa e em coluna quiral. O volume injetado no foi de 20µL na coluna em fase reversa e 10 µL na coluna quiral.

5.5 Métodos Analíticos

5.5.1 Análise por CCF (Cromatografia de Camada Fina)

Previamente à análise quantitativa por HPLC, foram realizadas análises qualitativas por cromatografia em camada fina (ou delgada) - (CCF ou do inglês, TLC – *Thin Layer Chromatography*).

A cromatografia em camada delgada foi realizada aplicando, com auxílio de tubo capilar, uma pequena amostra do meio reacional ou das fases orgânica e aquosa (após a etapa de separação do produto e extração por solvente do produto da fase aquosa acidificada). Foi utilizada uma solução de acetato de etila: hexano (3:7) como fase móvel e a sílica, da placa de CCF, como a fase estacionária. Como revelador $KMnO_4$ foi utilizado seguido da secagem da placa de CCF em placa de aquecimento. O fator de retenção (R_f) foi utilizado como critério de distinção entre o R_f do substrato e o do produto formado através da Equação 11:

$$R_f = \frac{\text{deslocamento da substância}}{\text{Deslocamento do eluente}} \qquad \text{(Eq. 11)}$$

O termo R_f expressa a migração de uma substância em relação ao deslocamento total do solvente (*Front* do solvente) em um sistema cromatográfico, sendo constante e característico para cada substância.

A análise qualitativa do grau de conversão da reação através de CCF foi avaliada por um critério baseado na visualização das marcas do substrato e produto, comparado com seus respectivos padrões, assim como a intensidade dessas marcas quando a placa foi revelada como já mencionado.

5.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das reações de acetilação

5.5.2.1 Análise da conversão

A análise de conversão dos substratos: *rac*-1, *rac*-2 e *rac*-3 e dos compostos acetilados foi feita em CLAE em fase reversa, com coluna Kromasil-C18, uma bomba Shimadzu LC-20AT, fase móvel acetonitrila:água (60:40) com velocidade de fluxo de 0,5mL/min e coluna termostatizada a 40°C com o forno CTO-20A. Foi utilizado o detector UV/visível de comprimento de onda variável Shimadzu SPD-M20A com comprimento de onda 215nm e a integração do cromatograma foi feita utilizando o programa Shimadzu LCsolution. O t_r (tempo de retenção) do padrão do substrato *rac*-3 foi de 8,17min. O t_r referente ao seu respectivo mono-*O*-acetilado foi 12,45min; t_r referente ao segundo mono-acetilado, 13,29min; t_r do padrão do produto diacetilado foi 21,79min e o triacetilado 38,74min. As Figuras 22 e 24 apresentam os cromatogramas dos padrões mencionados acima.

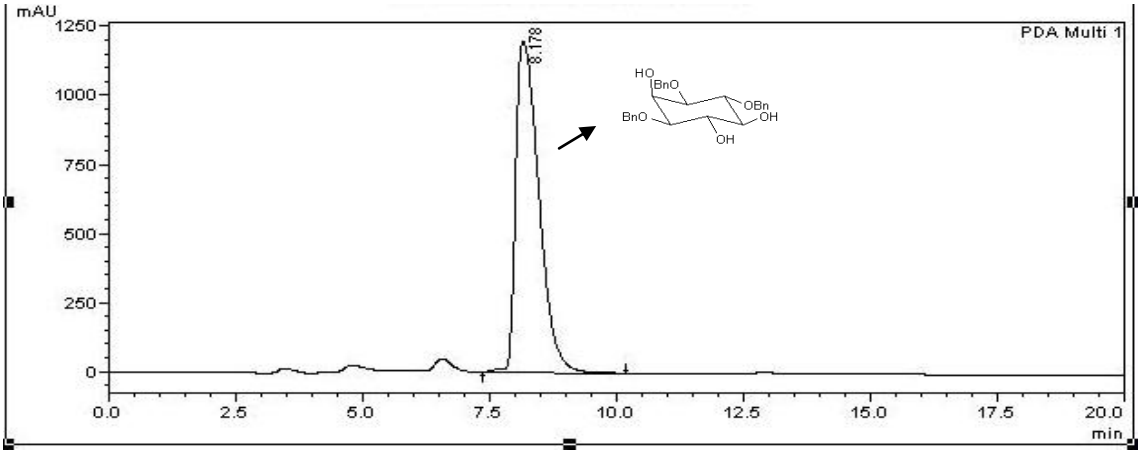


Figura 22. Cromatograma referente ao padrão do substrato (*rac*-3) por CLAE em fase reversa com t_r de 8,178min.

A concentração do substrato *rac*-3 foi comparada com os valores das áreas da curva de calibração (Figura 23) segundo a lei de Lambert- beer.

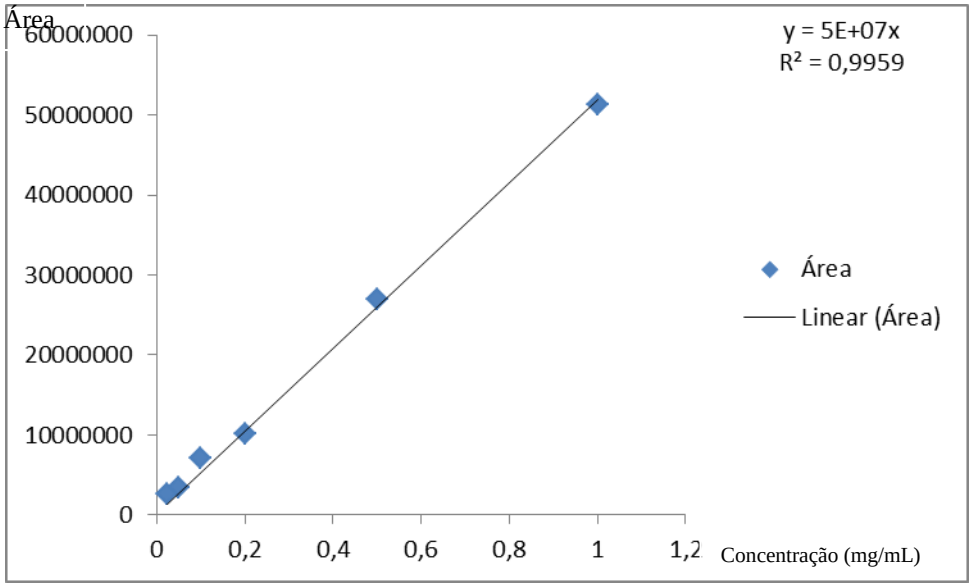


Figura 23. Cromatograma referente ao padrão do substrato (*rac*-3) por CLAE em fase reversa em diferentes concentrações (mg/mL)com t_r de 8,178min.

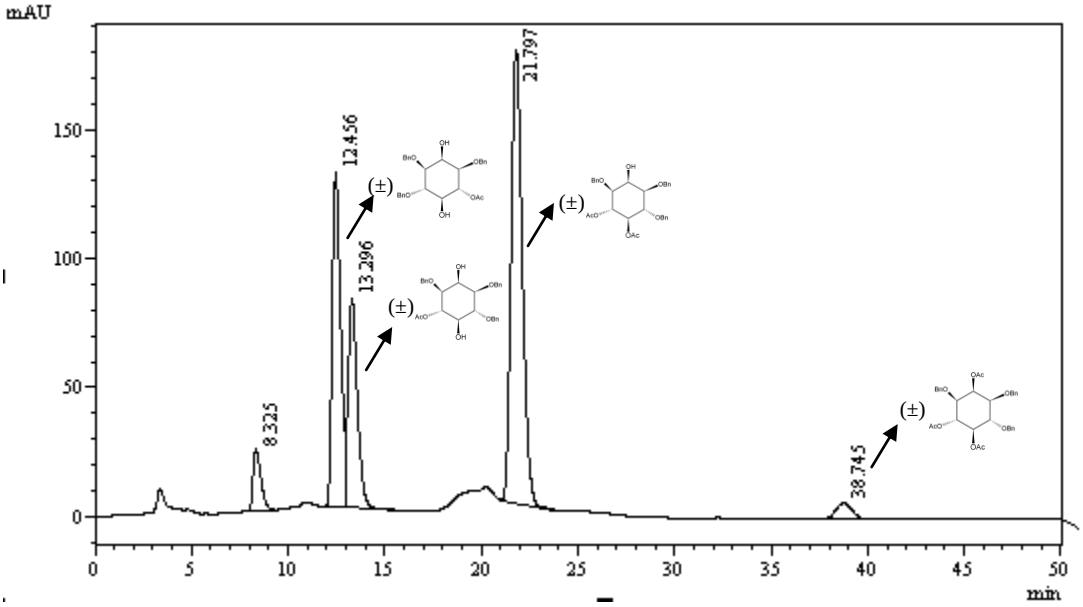


Figura 24 Cromatograma referente a mistura do padrão racêmico do produto analisados por CLAE em fase reversa. O t_r de 12,456min é referente ao primeiro monoacetilado, o t_r =13,296min é referente ao segundo. O t_r =21,797min é referente ao diacetilado e o t_r = 38,745min ao triacetilado. O t_r de 8,325min é referente ao substrato.

A Figura 24 representa o padrão sintético dos derivados acetilados de *rac*-3 obtido como componente de uma mistura contendo dois possíveis mono-acetilados, nos t_r= 12,456 e t_r=13,296 (acetila nas posições C5 e C6, respectivamente), diacetilado e uma pequena quantidade do substrato não acetilado (t_r= 8,325). A mistura de padrões foi importante para o acompanhamento inicial das reações enzimáticas.

A quantificação da conversão, foi feita segundo Chen *et al*. (1982) (eq. 6, 31p.) após a análise por CLAE.

5.5.2.2 Análise do excesso enantiomérico pelo produto

Após a análise por CLAE com coluna Kromasil-C18, pode-se ter o tempo de retenção do substrato não reagido em cada reação e do produto. O substrato não reagido e o produto são coletados por CLAE utilizando a coluna Kromasil-C18 conforme a programação feita no software vinculado ao sistema CLAE. Posteriormente, o excesso enantiomérico dos materiais coletados foi analisado na coluna quiral Chiralcel OD-H (fase móvel hexano: 2-propanol (7:3), fluxo 0,6 ml/min e comprimento de onda de 215 nm). Foram utilizados a mesma bomba, detector e integrador que os da análise em fase reversa. A Figura 25 apresenta o cromatograma dos isômeros do substrato (*rac*-3). Os tempos de retenção do padrão do produto foram de 36,1 min para o (D)-isômero e de 43,7 min (L)-isômero.

Uma vez que os tempos de retenção dos enantiômeros (+)-3 e (-)-3, no padrão racêmico puro mostraram-se ser muito próximos quando eluído nas colunas quirais utilizadas, não foi possível analisar com eficiência o excesso enantiomérico do padrão desta forma. Portanto outro procedimento foi pesquisado. Seguiu-se então LAUMEN e GHISALBA (1994). Após a reação enzimática, os autores fizeram uma reação de metanólise do produto da reação e analisaram o produto hidrolisado na coluna quiral.

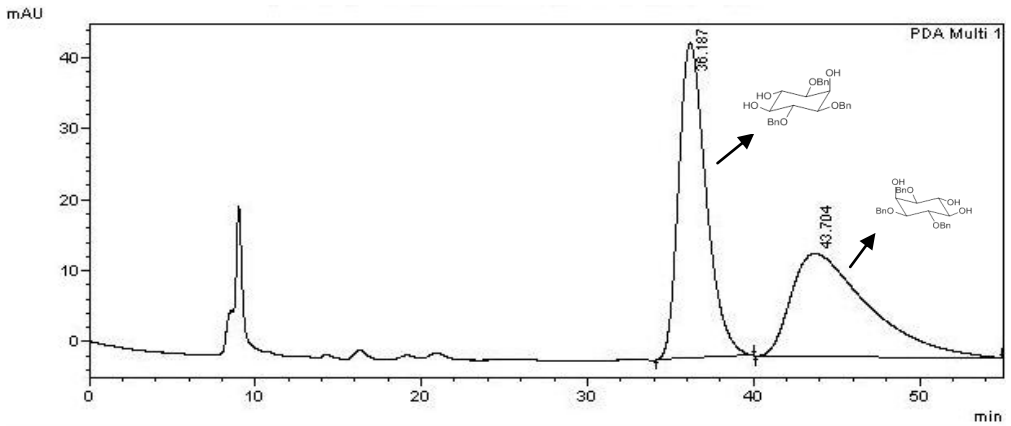


Figura 25 – Cromatograma do (D)-isômero e (L)-isômero do (±)- 1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-**3**).

No frasco contendo o produto da reação, já separado do substrato não reagido foi adicionado carbonato de potássio (K_2CO_3 -0,4g, 2,9mmol) e metanol (MeOH - 100ml). A reação de hidrólise ocorreu durante um período de 2h a temperatura ambiente. Os frascos foram agitados magneticamente para maior interação do sistema. Após a reação, adicionou-se no sistema 1mL do solvente orgânico diclorometano e 1mL de água, para uma extração líquido-líquido do sistema (afim de uma maior purificação do produto hidrolisado). O mesmo foi posteriormente seco no concentrador a vácuo de alta velocidade. Em seguida, a fase móvel foi então adicionada para a análise na Chiracel OD-H, pelo qual os valores dos excessos enantioméricos foram obtidos eficientementes. O produto da reação uma vez isolado foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) por alunos do laboratório Roderick Barnes, no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (CCS-NPPN-UFRJ).

LAUMEN e GHISALBA (1999) utilizam ainda outro método de hidrólise para a análise do produto da reação, obtendo bons resultados.

5.5.3 Dosagem de atividade hidrolítica por método espectrofotométrico

A atividade enzimática foi determinada a partir da reação de hidrólise do p-nitrofenil laurato catalisada pela lipase com a formação do produto cromóforo p-nitro fenol. 2,5mL de solução contendo 2,5mM de *p*-nitrofenil laurato em tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7,0) foi mantido a 30°C, por um período de 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 0,05mL solução enzimática ou enzima imobilizada da seguinte forma: Para a dosagem da AH (Atividade hidrolítica) da enzima liofilizada, após a calibração com o branco de reação, 0,05mL da solução enzimática foi adicionado a cubeta. A reação foi acompanhada através da leitura de absorvância em intervalos de 1 min. A unidade do cálculo obtido da dosagem da AH foi U/mL, porém estes valores foram convertidos em U/g para comparações com as enzimas imobilizadas. Para a dosagem da enzima imobilizada, o percurso da AH foi feito após a adição da solução enzimática na cubeta contendo agitador magnético. A unidade do cálculo obtido da dosagem da AH com as enzimas imobilizadas foi U/g $_{\text{de suporte}}$.

O progresso da reação de ambas as formas, enzima imobilizada ou liofilizada, foi acompanhado por espectrofotômetro com leituras de absorbância a 410nm. Uma unidade internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 µmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio.

$$A = \frac{(Abs/min) \times V_{final} \times f}{V_{am}\ ou\ g}$$

(Eq.12)

O cálculo da atividade foi realizado utilizando-se a Equação 12,

onde:

- A é atividade lipásica (Ul/mL quando enzimas liofilizadas e Ul/$g_{de\ suporte}$ quando enzimas imobilizadas).

- V_{final} é volume final de meio reacional (mL)

- V_{am} é volume de amostra (mL)

- g - massa de suporte (g);

- *f* é fator obtido na curva de calibração de p-nitro fenol (mM).

A determinação da atividade enzimática foi feita em triplicata.

5.5.4

A conversão e o excesso enantiomérico do substrato e do produto foram determinados pelas equações 6, 7 (pag.31) e 10 (pag. 32), respectivamente. A razão enantiomérica (E) do produto formado foi determinada pela equação 9 (pag. 32) de acordo com CHEN e colaboradores (1982).

5.6. Metodologia do Planejamento Experimental

Para a otimização dos experimentos foi feito um planejamento experimental utilizando o software *Statistica* 7.0.

5.6.1 Preparação dos solventes

Até este ponto do trabalho, os solventes utilizados não receberam nenhum tipo de tratamento prévio para retirada da água residual. Entretanto, sabe-se que em experimento com

quantidades controladas de água adicionada ao meio reacional, tem-se a enantiosseletividade afetada pela presença dessa água (GOSWAMI; GOSWAMI, 2005). Para estudar a influência da variável água no sistema foi realizado um tratamento prévio dos solventes com peneira molecular 4A (com tamanho de poro de 4 Å, Acros®), previamente seca em estufa a 210ºC. Neste caso, a peneira molecular foi adicionada ao solvente utilizado, 48h antes do seu uso no planejamento experimental.

5.6.2. Reações feitas no Planejamento experimental

As reações enzimáticas foram realizadas de acordo com a metodologia citada no item 5.2.

5.6.3. Composto Central

Para determinação das condições experimentais que maximizassem a resolução cinética do racemato selecionado nos experimentos prévios, realizou-se um Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR). No presente trabalho, o planejamento foi feito para 4 variáveis (2^4) mais 8 ensaios axiais com 4 repetições no ponto central totalizando 28 ensaios. Em cada caso a conversão e o excesso enantiomérico foram verificados. Aqui foi considerado que as variáveis menores que 0,05% (i.e. 95% de intervalo de confiança) eram consideradas de valor significativo e portanto, de influência significativa na maximização da resolução do racemato selecionado (*rac*-3). As variáveis e suas faixas foram escolhidas com base nos experimentos que antecederam o planejamento e com base na literatura.

As variáveis selecionadas para este planejamento foram temperatura do sistema reacional, concentração de substrato, enzima e água adicionada ao meio. Alíquotas foram retiradas nos intervalos 0h, 8h e 24h afim de ser selecionado o melhor tempo para o planejamento experimental. Os fatores e seus níveis (fatores codificados) selecionados para o estudo da resolução cinética de *rac*-3 por PS-IM em acetato de vinila são fornecidos na Tabela 5.

Tabela 5. Valores reais referentes aos valores das variáveis escalonadas

Níveis	[S] mg/ml	[E] mg/ml	H_20 (%m/v)	T (°C)
2	18	40	0,8	50
1	14	31	0,6	45
0	10	22	0,4	40
-1	6	13	0,2	35
-2	2	4	0	30

A equação do polinômio de segunda ordem para as variáveis foi a seguinte:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta iXi + \sum \beta ijXiXj + \sum \beta ii\, Xi^2 \qquad \text{(Eq.13)}$$

onde Y é a variável de resposta, β_o é o termo independente, β_i o coeficiente do efeito linear, β_{ii} o coeficiente do efeito quadrático, β_{ij} o coeficiente do efeito de interação, x_i e x_j, são as variáveis independentes.

As variáveis foram codificadas de acordo com a equação:

$$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i \qquad \text{(Eq.14)}$$

onde Volpato *et al*. (2008) explicam que x_i é o valor da variável codificada e X_i o real valor da variável independente, X_o é o valor real do ponto central e ΔX_i é a variação.

5.6.4. Análise de Dados

A verificação do modelo foi feita pela análise da variância (ANOVA), utilizando o programa *Statistica* 7,0. A significância do coeficiente de regressão e probabilidades associadas (p) foram determinadas pelo test t Student; o modelo da equação de primeira ordem foi determinada e testes como o *F* Fisher foram discutidos. A variância é explicada pelos autores pelo coeficiente de Determinação Múltipla (R^2) e análise de resíduos foi feita por diferentes testes no mesmo programa. Ainda para verificação do modelo foram feitos testes da normalidade dos resíduos e testes de Shapiro e Kolmogorov-Smirnov. Gráficos de Pareto, da superfície de resposta, os gráficos de contorno e a função *desirability* foram obtidos e analisados.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Seleção de biocatalisadores e dos substratos

Inicialmente, foi realizada uma triagem dos substratos a serem resolvidos por catálise enzimática por reações de alcoólise. Os substratos (±)-1,4,5,6-tetra-O-benzil-*mio*-inositol (*rac*-1), (±)-1,4,5,6-tetra-O-alil-*mio*-inositol (*rac*-2) e (±)-1,3,4-tri-O-benzil-*mio*-inositol (*rac*-3) foram os substratos propostos para investigar a viabilidade do emprego de lipases na resolução cinética enzimática de derivados de *mio*-inositol. Experimentos preliminares foram conduzidos com o objetivo da identificação do melhor sistema de solvente, da melhor solubilidade, de quais enzimas seriam capazes de catalisar a reação e quais seriam os agentes acilantes mais favoráveis na reação. Neste trabalho foram selecionadas quatorze lipases comerciais (imobilizadas e liofilizadas). Estas são biocatalisadores comumente citadas na literatura como sendo capazes de resolver misturas racêmicas (GOTOR *et al*., 2006, KISS *et al*., 2006).

Como primeira etapa foi feito um *screening* com todas as enzimas com *rac*-1. Posteriormente, o *screening* foi realizado com o *rac*-2 e em seguida com o *rac*-3. As condições empregadas nas reações de alcoólise para *rac*-1, *rac*-2 e *rac*-3 foram as mesmas. Primeiramente, a acetilação enantiosseletiva foi realizada em acetato de etila. Nesta, o acetato de etila foi utilizado como solvente e agente acilante. Paralelamente às reações supra-mencionadas foram realizadas reações em acetato de vinila. Este também foi utilizado como solvente e agente acilante. Após 48h de reação o solvente foi evaporado e as reações dos resultados dos *screening* foram analisadas pela técnica de Cromatografia em Camada Fina (CCF) previamente descrita. Apesar da análise com CCF ser pouco precisa, esta foi útil para indicar as lipases capazes de catalisar a reação enzimática.

Um novo derivado de *mio*-inositol tri-substituído foi sintetizado como um possível substrato em potencial para a resolução racêmica pelos biocatalisadores, o *rac*-3. Uma vez que há em *rac*-3 a presença de três hidroxilas livres, há três possibilidades de acetilações, como apresentado no padrão dos possíveis produtos (Fig. 21 e 22; 47p.).

Nenhuma das lipases empregadas foi capaz de catalisar a reação de acetilação dos substratos *rac*-1 e *rac*-2. Provavelmente, o fato do *rac*-1 ter uma cadeia carbônica tetra-substituída, impossibilitou a ação dos biocatalisadores utilizados, uma vez que este derivado de *mio*-inositol se encontrava estericamente impedido.

Os resultados obtidos da análise por CCF das reações de acetilação dos substratos *rac*-1**,** *rac*-2 e *rac*-3 podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultado dos experimentos preliminares de resolução enantiomérica dos substratos com as lipases.

	Reação de Alcoólise					
	rac-1	*rac*-2	*rac*-3	*rac*-1	*rac*-2	*rac*-3
Lipase	**Acetato de etila**			**Acetato de vinila**		
Novozym 435	-	-	+	-	-	+
PS-C "Amano" II	-	-	+	-	-	+
PS-IM "Amano"	-	-	+	-	-	+
PS "Amano" (lyophilized)	-	-	+	-	-	+
Lipozyme RM-IM	-	-	+	-	-	+
A "Amano" 12	-	-	+	-	-	+
AK "Amano"	-	-	+	-	-	+
Lipomod 34P	-	-	+	-	-	+
Lipozyme TL-IM	-	-	-	-	-	-
lipase F Amano AP15	-	-	-	-	-	-
lipase D "Amano"	-	-	-	-	-	-
lipase G "Amano"	-	-	-	-	-	-
lipase AY "Amano" 30	-	-	-	-	-	-
lipase de *Yarrowia lipolytica*	-	-	-	-	-	-

Dos substratos utilizados nas reações, a acetilação ocorreu apenas em *rac*-3, apresentando a formação de produto tanto em acetato de etila quanto em acetato de vinila. Entretanto o acetato de vinila foi escolhido como agente acilante, uma vez que apresentou valores maiores de conversão em um menor intervalo de tempo.

Posteriormente às análises por CCF, as amostras foram analisadas por CLAE e o valor da produtividade foi calculado. A Tabela 7 mostra os resultados da acetilação de *rac*-3.

Apesar de *rac*-3 ter sido catalisado por oito lipases diferentes, a conversão do produto mostrou um valor razoável apenas quando as lipases Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica*, lipase comercial imobilizada em resina polimérica), PSC Amano II (lipase de *Pseudomonas species*, lipase comercial imobilizada em cerâmica) e PS-IM Amano (lipase de *Pseudomonas species*, lipase imobilizada em terra de diatomácea) foram utilizadas.

Comparando a lipase PS-IM e PSC Amano II, nota-se que o mesmo valor de conversão (X%) é obtido. Todavia para a primeira, o máximo de conversão é obtido em 48h, enquanto que para a segunda o tempo é de 96h.

Tabela 7. Resultados do *screening* realizado com as diferentes lipases na resolução cinética de *rac*-**3** utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante.

Lipase	Conversão (X%)	ee_s[a]	ee_p[b]	E[c]	Tempo de reação (h)	[d]Produtividade mgP/(mgE.h)
Candida antarctica B – CALB (Novozym 435)	43.5	77.40	97.70	>200	120	3.88×10^{-4}
Pseudomonas cepacia (PSC "Amano" II)	47.7	88	99	>200	96	4.45×10^{-4}
Pseudomonas cepacia (PS-IM "Amano")	48.9	99	99	>200	48h	1.13×10^{-3}
Rhizomucor miehei (Lipozyme RM IM)	1.26	---	---	---	48	2.65×10^{-5}
Thermomyces lanuginosusa (Lipozyme TL IM)	---	---	---	---	48	-----
Burkholderia cepacia (PS "Amano")	2.5	1	---	0	112	2.23×10^{-5}
Candida rugosa (AY "Amano" 30)	---	---	---	---	48	-----
Aspergillus niger (A "Amano" 12)	2.1	---	---	---	48	4.37×10^{-5}
Rhizopus javonicus (F "Amano" AP15)	---	---	---	---	48	----
Rhizopus oryzae (D "Amano")	---	---	---	---	48	----
Penicillium camembertii (G "Amano")	---	---	---	---	48	----
Pseudomonas fluorescens (AK "Amano")	2,1	---	---	---	48	4.37×10^{-5}
Lipomod 34P	2.3	---	---	---	48	4.80×10^{-5}
lipase de *Yarrowia lipolytica*	1.0	-	-	-	48	-

a- ee_s- Excesso enantiomérico pelo substrato
b- ee_p - Excesso enantiomérico pelo substrato
c- E- Razão enantiomérica
d- Produtividade: [mg de produto] / [mg de enzima x tempo (h)]

Em relação à produtividade, observa-se que o maior valor foi obtido quando PS-IM foi utilizada.

As atividades hidrolíticas dos extratos enzimáticos, determinadas pelo método do *p*-NPL (p-nitrofenil laurato), são apresentadas na Tabela 8 (enzimas imobilizadas e liofilizadas, respectivamente).

Tabela 8. Atividade hidrolítica (AH) para as lipases imobilizadas e liofilizadas

	AH (U/g suporte)		**AH (U/g enzima liofilizada)**		**AH (U/g enzima liofilizada)**
Candida antarctica B – CALB (Novozym 435)	10,00	*Burkholderia cepacia* (PS "Amano")	30,00	*Penicillium camembertii* (G "Amano")	255.837,00
Pseudomonas species (PSC "Amano" II)	836,00	Candida rugosa (AY "Amano" 30)	41,22	*Pseudomonas fluorescens* (AK "amano")	13.230,00
Pseudomonas species (PS-IM)	17.763,00	*Aspergillus niger* (A "Amano" 12)	151,00	Lipomod 34P	35.999,00
Rhizomucor miehei (Lipozyme RM IM)	33,00	*Rhizopus javonicus* (F "Amano" AP15)	12.824,00		
Thermomyces lanuginosusa (Lipozyme TL IM)	500,00	*Rhizopus oryzae* (D "Amano")	256,00		

Dentre as três lipases imobilizadas selecionadas, a que apresentou maior valor de conversão foi a PS-IM, com atividade de 17.673,00 U/g $_{\text{suporte}}$.

6.2 Resolução cinética da acetilação de *rac*-3 utilizando Novozym 435

Com o objetivo de encontrar um valor maior de conversão utilizando Novozym 435 como biocatalisador, alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos. O solvente das reações foi evaporado e as amostras seguiram para a análise em CLAE em fase reversa. A Figura 26 apresenta a cinética feita com os resultados supradescritos em uma curva de progressão da conversão (X%) *versus* tempo (horas).

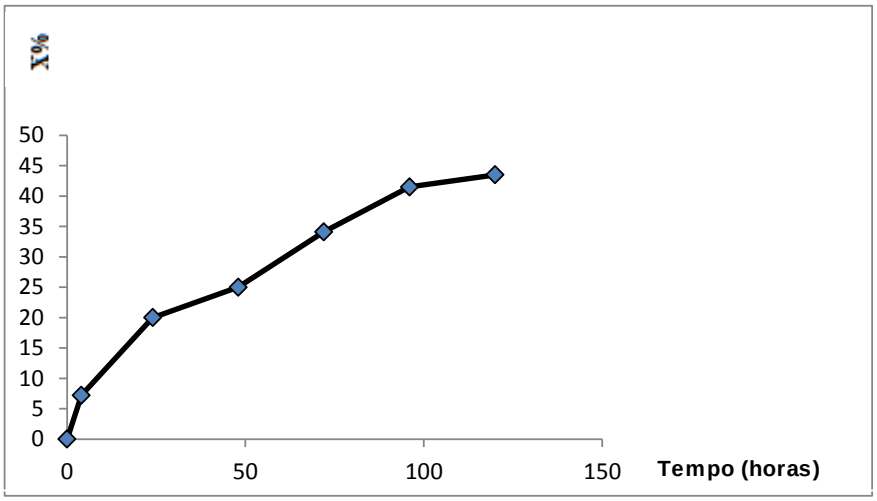


Figura 26. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela Novozym 435 em acetato de vinila.

Alíquotas foram retiradas nos diferentes intervalos de tempo sendo a reação interrompida após as 120h de tempo reacional. As amostras referente as alíquotas em diferentes intervalos foram analisadas e a formação de produto do último ponto retirado da reação pode ser visualizada no cromatograma da Figura 27.

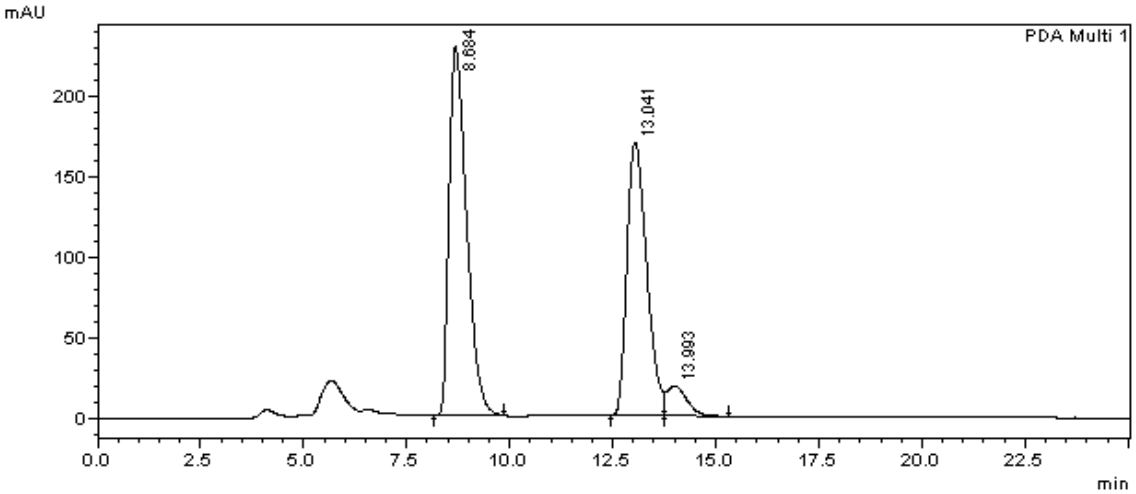


Figura 27 . Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de *rac*-3 catalisada por Novozym 435 por CLAE em fase reversa em 120h de tempo de reação onde o pico do no t_r de 8,68, 13,04 e 13,9min correspondem ao substrato, primeiro e segundo monoacetilado, respectivamente.

A reação mostrou a formação preferencial do produto mono-*O*-acetilado com 43,5% de conversão. Não houve formação de produto diacetilado. O fato pode ser comprovado ao analisarmos o respectivo cromatograma, onde não houve formação de pico no t_r de 21.7min (vide Fig 24, 46p.).

A análise da pureza óptica do produto de acetilação de *rac*-3 foi feita através da coluna quiral (Chiracel OD-H) como descrito na seção de metodologia. Ambos, substrato não reagido da reação e o produto, após reação de metanólise, foram analisados e podem ser visualizados nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

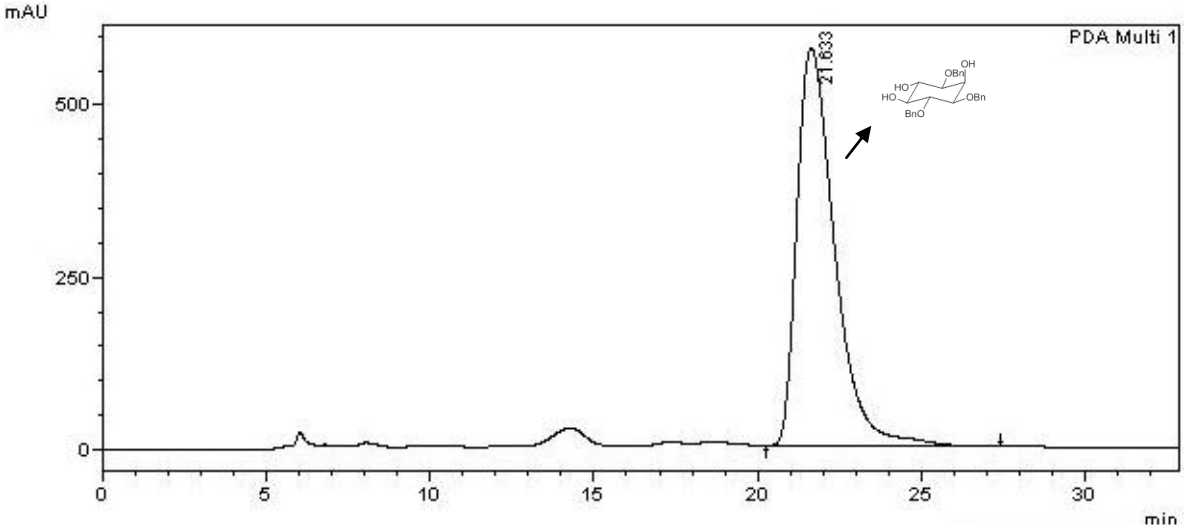


Figura 28. Cromatograma do substrato não reagido no t_r de 21,6min obtido na reação de acetilação do *rac*-**3** no período de 120h, utilizando Novozym 435 como catalisador em acetato de vinila.

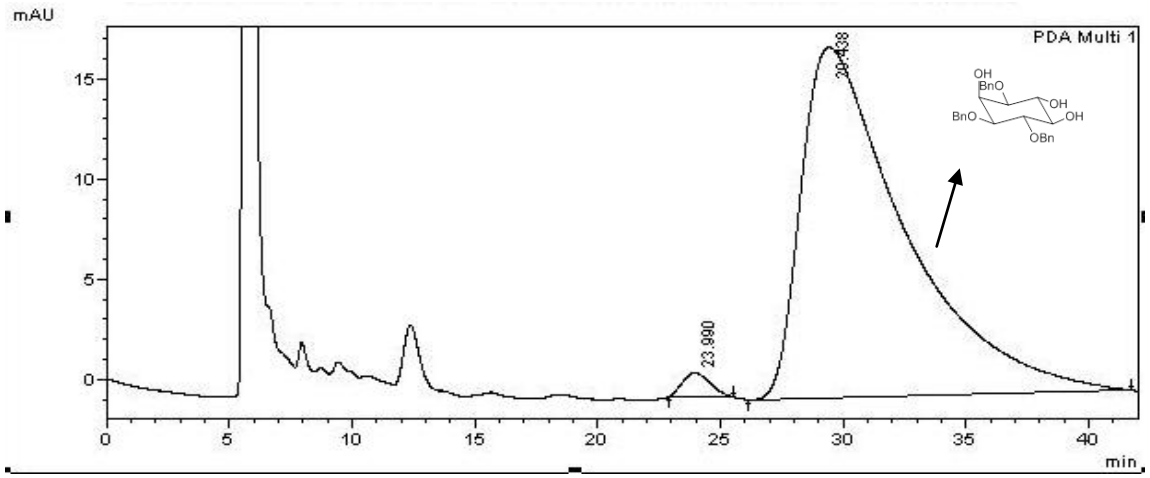


Figura 29. Cromatograma do produto após reação de metanólise obtido na reação de acetilação do *rac*-**3** no período de 120h, utilizando Novozym 435 como catalisador em acetato de vinila.

A Figura 29 mostra a formação preferencial de um dos isômeros no t_r de 29,4min.

O produto de reação, uma vez isolado, foi ainda analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a determinação do grupamento acetila. Os espectros obtidos revelaram

que a reação foi regiosseletiva ocorrendo apenas acetilação do grupo hidroxila no carbono 5 (C-5).

A análise da pureza óptica pela coluna quiral constatou que houve formação preferencial de um dos isômeros com excesso enantiomérico de 98%, com razão enantiomérica (E) >200. A análise mostrou que o catalisador empregado, Novozym 435, apresentou uma alta seletividade na reação de resolução de *rac*-3.

No início deste trabalho, para confirmamos que o produto foi realmente hidrolisado e que a análise do produto hidrolisado na coluna quiral era coerente, foi feita uma reinjeção desta amostra, pós-análise na coluna quiral, em CLAE na fase reversa. Para isso, a amostra foi seca e a fase móvel característica da fase reversa foi adicionada. Como o produto foi hidrolisado, apenas o pico correspondente ao substrato (no t_r deste) deveria aparecer na C18 (fase reversa). O resultado pode ser visto na Figura 30, mostrando realmente apenas a presença do substrato.

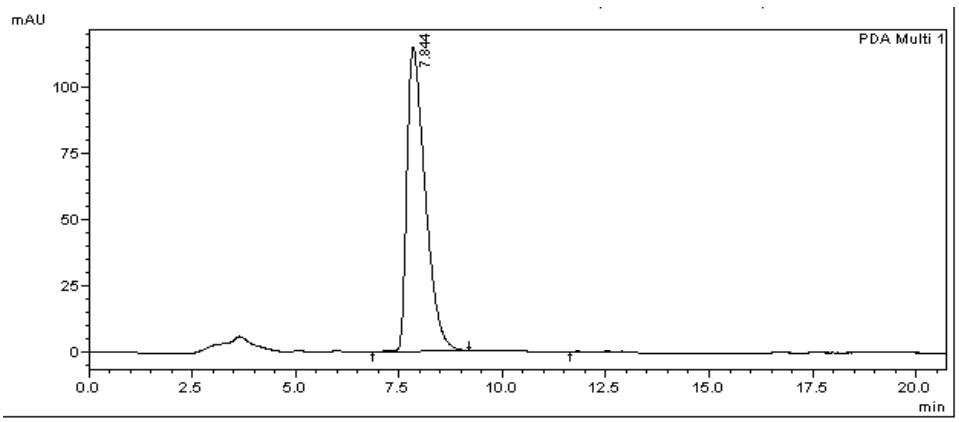


Figura 30. Reinjeção da amostra em fase reversa mostrando no cromatograma de confirmação que todo produto foi anteriormente hidrolisado;

Segundo a literatura, POTTER e MILLS (2002) e GIGG (1994) descreveram o mesmo substrato (±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-3). Observou-se que o produto formado, L-5-*O*-acetil-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol ((-)-L-2), é aqui citado pela primeira vez. A determinação da configuração absoluta de (-)-L-2 deu-se para comparação da rotação óptica específica (α-D) do substrato recuperado com os dados da literatura. O material de partida recuperado é o D-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol.

O esquema da reação de acetilação enantiosseletiva de *rac*-3 pode ser visualizado na Figura 31.

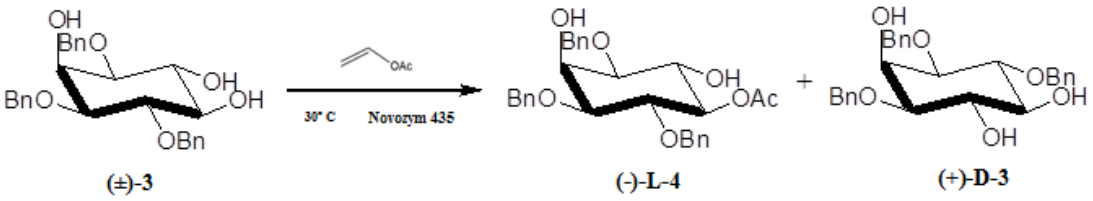


Figura 31. Resolução cinética enzimática do racemato *rac*-3 catalisada pela Novozym 435 em acetato de vinila.

Nota-se que a acetilação seria mais provável nos grupos hidroxilados no carbono 5 ou no carbono 6. Isso porque a hidroxila do carbono 2 se encontra estericamente impedida pelos grupos benzilas, como relatado anteriormente.

SIMAS *et al*. (2011) utilizaram Novozym 435 como catalisador nas reações de alcoólise na resolução de (±)-3,6-dibenzil-1,2-*O*-isopropilideno-*mio*-inositol. Os autores obtiveram 43% de conversão em 24h de reação, 99% de excesso enanciomérico (ee) e 449 de razão enantiomérica. A reação foi regio- e enantiosseletiva gerando apenas o L-isômero.

Reações regio- e enantiosseletivas foram obtidas por LAUMEN e GHISALBA (1999), no estudo da resolução cinética enzimática de (±)2,6-di-*O*-benzil-*mio*-inositol. Os autores obtiveram 49,5% de conversão, ee>99% utilizando como biocatalizador a lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435), em 92h de tempo de reação. A reação foi feita com acetato de vinila em sistema livre de solvente.

Outros autores como CHUNG e colaboradores (1998) utilizando como biocatalisador a lipase de *Candida rugosa* na resolução racêmica de 1,2:5,6-O-diisopropilideno-*mio*-inositol, observaram a formação do produto L-4-O-acetil-1,2:5,6-O-diisopropilideno-*mio*-inositol com 48% de conversão e 84% de excesso enantiomérico. O sistema utilizado foi éter dietílico na presença de anidrido acético como agente acilante.

6.3 Efeito do agente acilante na reação de acetilação de *rac*-3 catalisada por Novozym 435

Vários trabalhos têm relatado o uso de diferentes agentes acilantes no efeito sobre a enantiosseletividade da enzima (ANTHONSEN e HOFF, 1998; STOKES e OEHLSCHLAGER, 1987; HOF e KELLOGG, 1996; HOFF *et al*., 1996b, CUNHA *et al*., 2010). Como discutido anteriormente, tanto a concentração como o tipo do agente acilante na reação de acetilação são fatores importantes. O uso de ésteres vinílicos como solventes tem vantagens por formarem subprodutos carbonílicos, ao invés de álcoois, tornando as reações

irreversíveis, aumentando também a velocidade inicial de reação (CUNHA *et al.*, 2010). Portanto, nesta pesquisa, estudou-se o efeito de diferentes agentes acilantes na reação de acetilação de *rac*-3.

O estudo da resolução de *rac*-3 foi feito utilizando como agente acilante os ésteres acetato de vinila, acetato de etila e acetato de isopropenila em sistema livre de solvente. Alíquotas foram retiradas em determinados intervalos e a reação foi interrompida quando a última alíquota foi retirada da reação, após 120h de tempo reacional. A curva de progresso está apresentada na Figura 32.

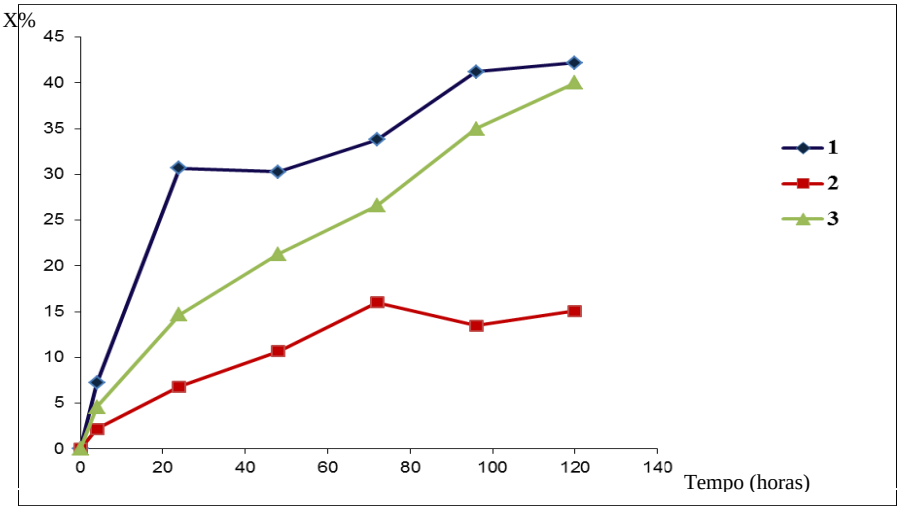


Figura 32. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada pela Novozym 435 em diferentes agentes acilantes: 1- Acetato de vinila; 2- Acetato de etila; 3-Acetato de isopropenila.

A velocidade de reação foi menor quando acetato de etila foi utilizado como solvente e agente acilante, tendo ainda o menor valor de conversão e de velocidade inicial (15,1% de conversão em 120h).

A avaliação da reação de acilação do *rac*-**3** empregando acetato de vinila, acetato de etila e acetato de isopropenila como agente acilante pode ser visualizada na Tabela 9.

Tabela 9. Efeito de diferentes agentes acilantes nos diferentes parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato (ee_s), excesso enantiomérico pelo produto(ee_p) e razão enantiomérica (E), na resolução de *rac*-3 em 120h.

Agente acilante	**X%**	**ees**	**eep**	**E**
Acetato de vinila	43,5	77,4	97,7	>200
Acetato de etila	12,2	26	91,5	27
Acetato de isopropenila	38,9	61	90	33

Observa-se que em 120h foi obtido uma conversão máxima foi 43,5% quando acetato de vinila foi utilizado como solvente e agente acilante. O ee_s foi de 77,4%, ee_p 97,7% e E>200 (231).

Quando acetato de isopropenila foi utilizado como agente acilante e solvente na resolução do *rac*-3, observou-se uma diminuição da conversão, 38,9%. O valor de ee_s foi de 61%, ee_p de 90% com E=33. Todavia a diminuição da enantiosseletividade foi mais acentuada quando acetato de etila foi utilizado como agente acilante e como solvente na reação de acetilação, com apenas 12,2% de conversão, 26% de ee_s, 91,5% de ee_p e E=27. Logo, pelos resultados obtidos, fica evidente que o melhor agente acilante foi o acetato de vinila.

Ésteres ativados em transesterificação enantiosseletiva têm como vantagem o aumento da velocidade de reação e conversão.

Nos experimentos realizados por CUNHA *et al.* (2010), na comparação de diferentes agentes acilantes utilizados como solventes na resolução cinética de (±)-3,6-O-dibenzil-1,2-O-isopropilideno-*mio*-inositol obtiveram alta regiosseletividade e enantiosseletividade na reação. Os autores quando utilizaram o éster acetato de etila, no tempo de reação de 24h, 33,6% de conversão obtiveram 99% de ee_p e E>100. Todavia quando o éster acetato de vinila foi empregado 49,9% de conversão foi obtido; o ee_p >99% e E >100, em 48h de reação. Os autores também observaram que o solvente TBME aumentou a velocidade inicial de reação; contudo, os valores de conversão não foram os mais altos.

6.4 Efeito de diferentes solventes na reação de acetilação de *rac*-3 catalisados por Novozym 435

Com o objetivo do estudo da interação enzima-solvente na resolução de *rac*-3, utilizando Novozym 435 como catalisador, diferentes solventes orgânicos foram utilizados como meio reacional neste estudo, tendo sido selecionados: TBME (terc-metil-butil-éter), hexano, acetato de vinila, acetato de etila e acetato de isopropenila. Em todos os sistemas de solventes empregados, o acetato de vinila foi utilizado como agente acilante. A Figura 33 apresenta as curvas de progresso das reações de acetilação do *rac*-**3** catalisada por Novozym 435 em diferentes sistemas de solventes.

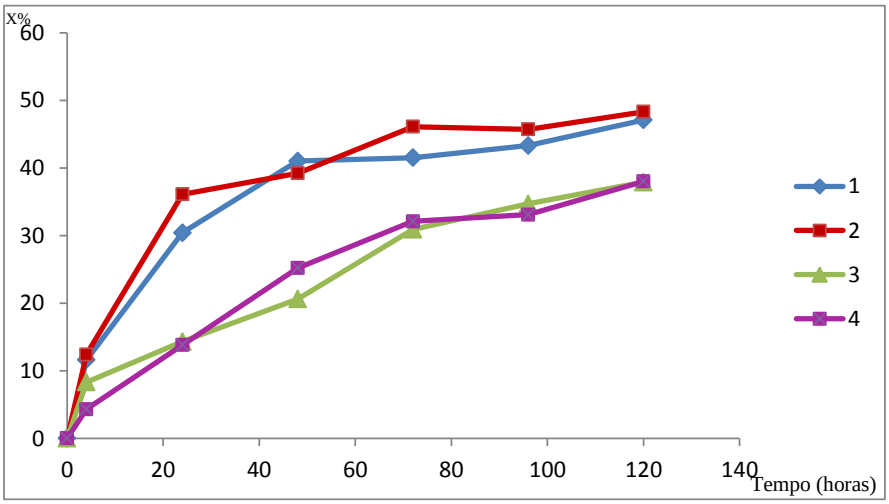


Figura 33. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada por Novozym 435 em diferentes sistemas de solventes: 1- TBME; 2- Hexano; 3-Acetato de etila; 4-Acetato de isopropenila utilizando Acetato de vinila como agente acilante.

A escolha dos solventes foi feita principalmente pela estabilidade das lipases utilizadas, por serem solventes bastante empregados em resolução enantiomérica na literatura e/ou pela eficiente solubilidade do substrato nestes solventes. A reação foi interrompida ao se aproximar do máximo de 50% de conversão, em 120h.

O uso de diferentes solventes influenciou a velocidade inicial das reações. O maior valor de conversão foi obtido com Hexano (48,3%), seguido de TBME (46,7%) no período de 120h.

Em resolução de racematos, observa-se que ao se aproximar dos 50% de conversão ocorre uma acentuada diminuição na velocidade. Como a velocidade de transformação de cada enantiômero varia com o grau de conversão, a razão dos dois enantiômeros não permanece constante durante a reação.

O estudo da influência do solvente no ponto de vista da enantiosseletividade de Novozym 435 também foi realizado. Os parâmetros podem ser vistos na Tabela 10.

A alta velocidade inicial quando Hexano e TBME foram utilizados juntamente com acetato de vinila (agente acilante) pode ser explicada pela hidrofobicidade destes solventes, favorecendo a reação.

Nota-se que a utilização de diferentes solventes e agentes acilantes mostrou diferenças quando Novozym 435 foi utilizada como catalisador na reação. As reações que mostraram ser altamente seletivas foram quando acetato de vinila foi utilizado como solvente e agente acilante e quando TBME foi utilizado como solvente. Nestes, o valor de E foi maior que 200 e o ee_p foi 97,7% e 96,4%, respectivamente. Embora as reações utilizando hexano tenham

apresentado valor de conversão mais alto (48,3%), este diminuiu a enantiosseletividade da enzima, resultando em E=192. Como já discutido no tópico anterior, o uso de acetato de etila e acetato de isopropenila como solvente e agente acilante diminuiram muito a enantiosseletividade da enzima. Os valores de razão enantiomérica foram 27 e 33, respectivamente.

Apesar da grande influência dos solventes na enantiosseletividade, não foi possível estabelecer nenhuma ligação entre os resultados obtidos com os valores de log P.

Tabela 10. Conversões, valores de excesso enantiomérico (ee) e razão enantiomérica (E) obtidas na resolução cinética de *rac*-3, catalisada por Novozym 435 no período de 120h

Agente acilante	**Solventes**	**Conversão%**	ee_s	ee_p	**E**
Acetato de vinila	Acetato de vinila	43,5	77,4	97,7	>200
	Hexano	48,3	87,8	96,9	192
	TBME	46,7	98,6	96,4	>200
	Acetato de etila	29,4	42,6	93,0	39
	Acetato de isopropenila	23,0	20,3	66,4	5,9

COSTA *et* al. (2004) estudaram a resolução de (*R S*)-β-hidroxi seleneto utilizando PPL (Lipase pancreática suína- 42 U/mg de proteína), PSL (PS Amano-30 U/g) e CALB (Novozym 435- 10 U/g) como biocatalisadores em diferentes solventes orgânicos na presença de acetato de vinila. A maior estereosseletividade foi obtida com CALB (6h de reação), quando hexano foi utilizado como solvente. Os autores obtiveram o produto (*R*)-1- (Fenil-selênio)-2-propanol com 50% de conversão, 99% de ee. Os diferentes solventes utilizados não mostraram efeito na enantiosseletividade e na enantioespecificidade da enzima, obtendo sempre o mesmo enantiômero.

6.5 Cinética de acetilação de *rac*-3 catalisada pelas lipases PSC Amano II e PS-IM

Com o objetivo de se obter a cinética de cada reação, as amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo. Os resultados da cinética se encontram nas Figuras 34 e 35 para as lipases, PS-IM e PSC Amano II, respectivamente.

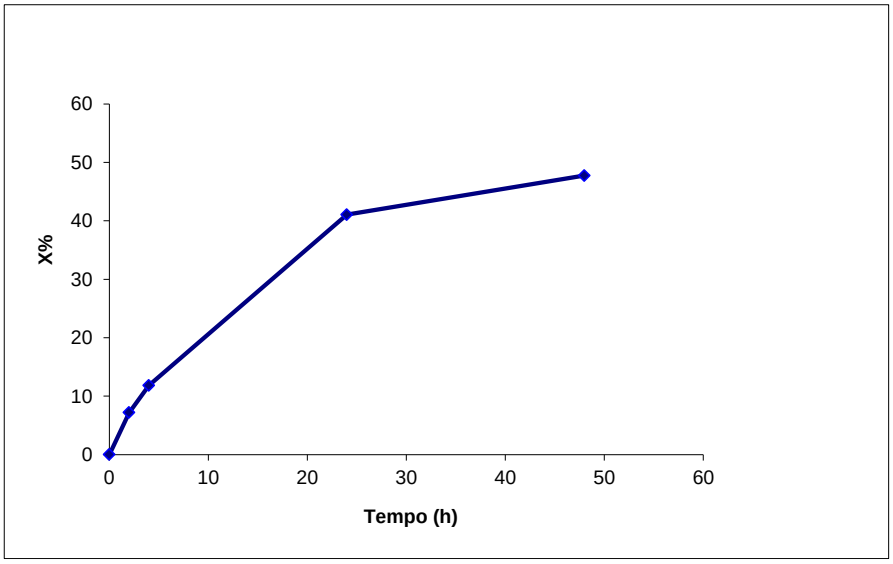


Figura 34. Curva de progresso da resolução enzimática do *rac*-3 catalisada por PS-IM: Reação em acetato de vinila, livre de solvente.

A curva da reação apresentada na Figura 34 foi interrompida em 48h onde obteve-se o máximo de 48% de conversão. O produto da reação foi analisado em seguida. O solvente das reações foi evaporado e as amostras seguiram para a análise em CLAE em fase reversa.

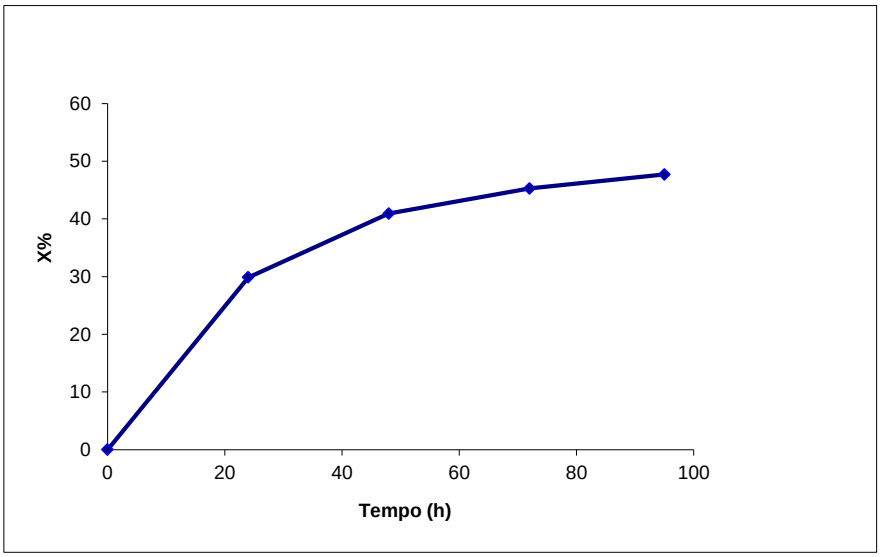


Figura 35. Curva de progresso da resolução enzimática de *rac*-3 catalisada por PSC Amano II: Reação em acetato de vinila, livre de solvente.

A curva da reação apresentada na Figura 35 para a lipase PSC amano II foi interrompida em 96h onde obteve-se o máximo de 47,7% de conversão. O produto da reação foi analisado em seguida. O solvente das reações foi evaporado e as amostras seguiram para a análise em CLAE em fase reversa.

As Figuras 36 e 37 mostram os cromatogramas analisados por CLAE.

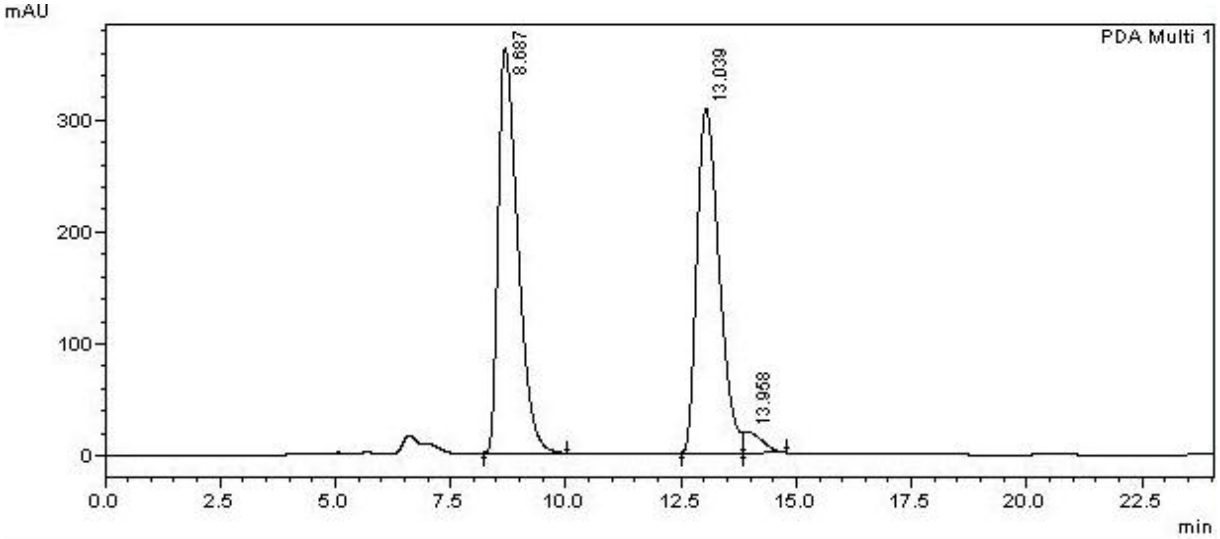


Figura 36. Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de *rac*-3 catalisada pela lipase de *Pseudomonas species* imobilizada em terra de diatomácea (PS-IM). A análise por CLAE em fase reversa mostrou em 48h a conversão de 48%.

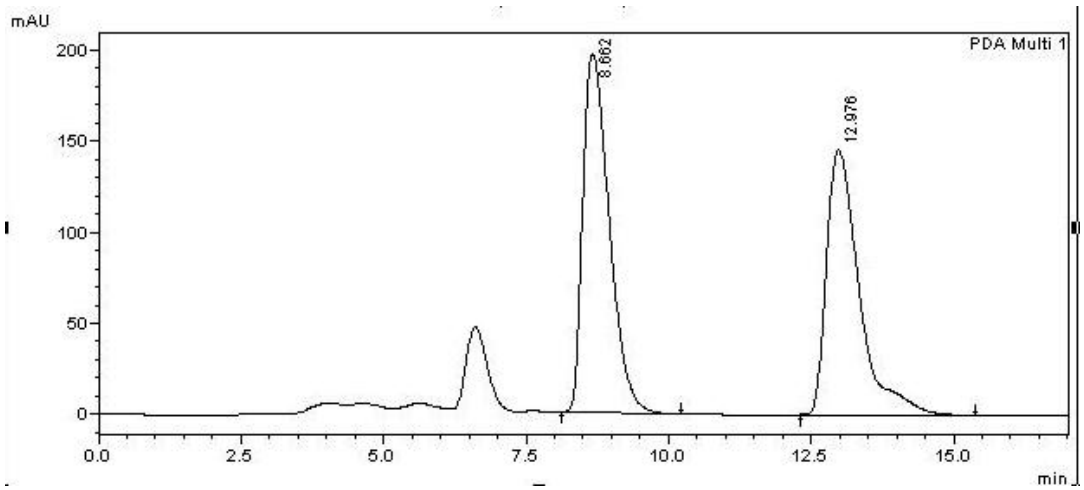


Figura 37. Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de *rac*-3 catalisada pela lipase de *Pseudomonas species* imobilizada em cerâmica (PS-C amano II). A análise por CLAE em fase reversa mostrou em 96h a conversão de 47,7%.

A formação de produto gerada na reação de acetilação de *rac*-3 catalisada por *Pseudomonas species* imobilizada em diferentes suportes, pode ser visualizada nos cromatogramas das Figuras 37 e 38.

Ambas as reações foram realizadas em sistema livre de solvente (acetato de vinila atuou como solvente e agente acilante). Não houve formação de produto diacetilado nas

reações. O fato pode ser comprovado ao analisarmos os respectivos cromatogramas, onde não houve formação de pico no t_r de 21,7 min.

Posteriormente a análise dos produtos gerada na reação de acetilação de *rac*-3 catalisada por *Pseudomonas species* imobilizada em diferentes suportes foi realizada a análise da pureza óptica por sistema CLAE em coluna quiral. Os cromatogramas podem ser visualizados nas Figuras 38, 39 e 40.

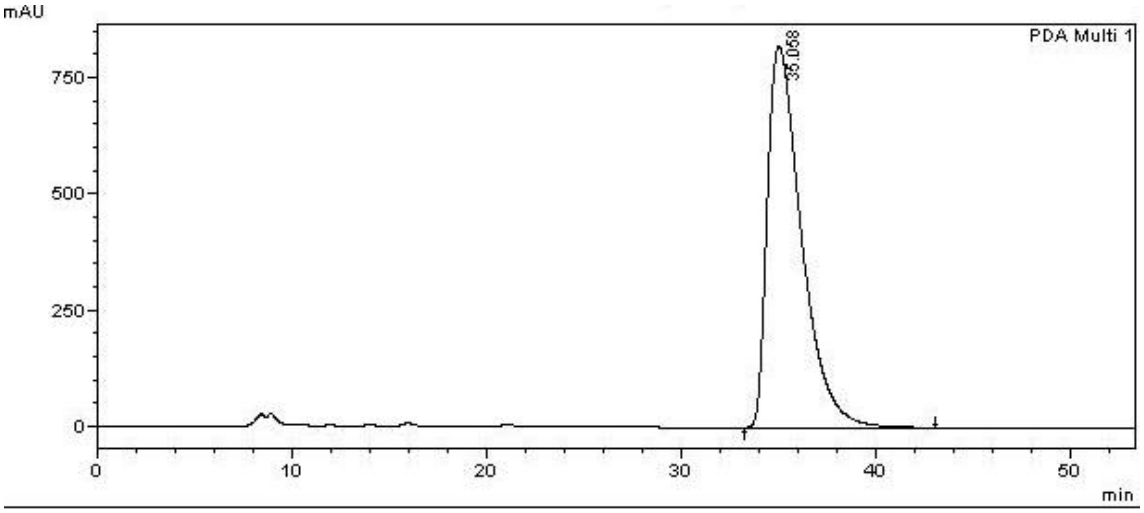


Figura 38. Cromatograma do substrato não reagido obtido na reação de acetilação de *rac*-**3** analisado por sistema CLAE em coluna quiral, utilizando lipase de *Pseudomonas species*, imobilizada em terra de diatomácea (PS-IM), utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante.

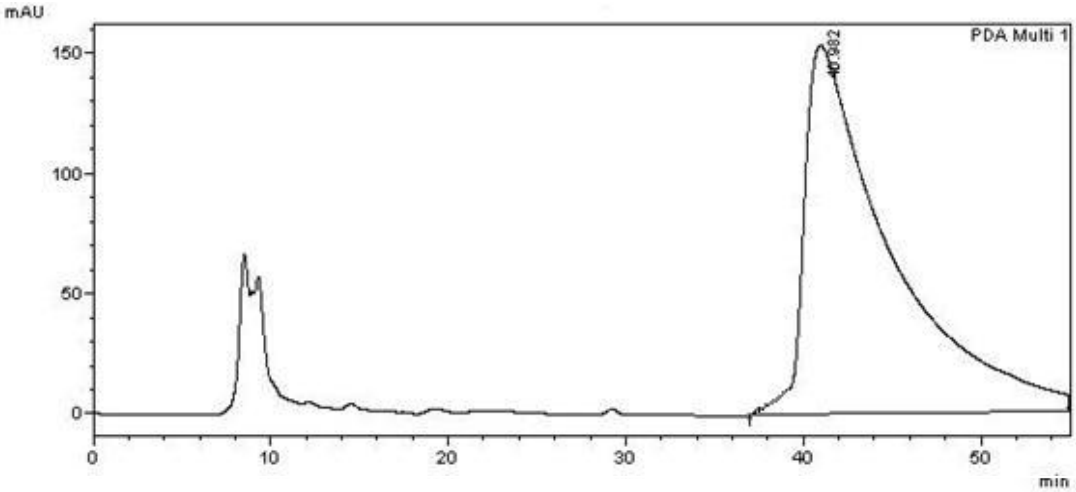


Figura 39. Cromatograma do produto hidrolisado obtido na reação de acetilação de *rac*-**3** analisado por sistema CLAE em coluna quiral, utilizando lipase de *Pseudomonas species*, imobilizada em terra de diatomácea (PS-IM), utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante, com ee_p de 98%.

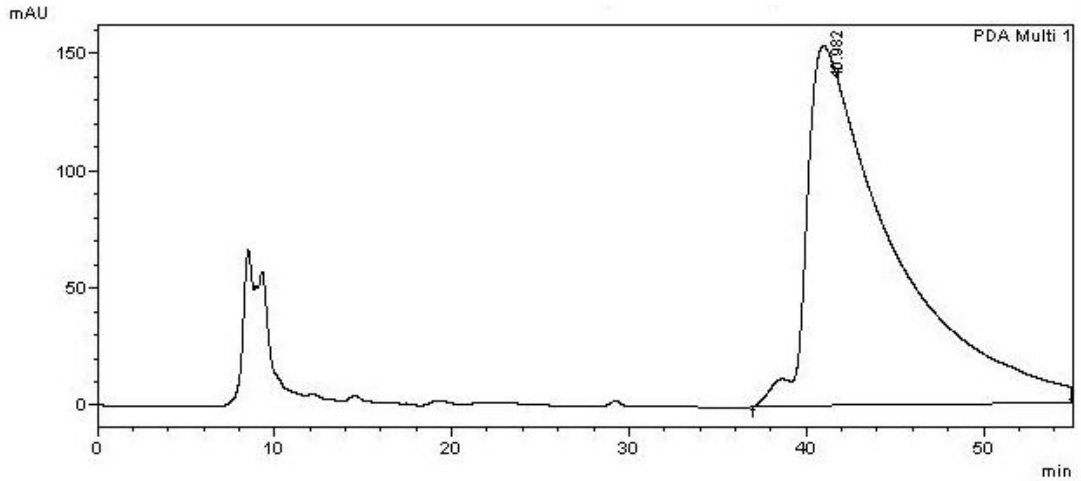


Figura 40. Cromatograma do produto hidrolisado obtido na reação de acetilação de *rac*-**3** analisado por sistema CLAE em coluna quiral, utilizando lipase de *Pseudomonas species*, imobilizada em cerâmica, utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante, com ee_p de 98%.

Os produtos das reações uma vez isolados foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a determinação do grupamento acetila. Os espectros obtidos revelaram que a reação foi regiosseletiva ocorrendo apenas acetilação do grupo hidroxila no carbono 5 (C-5).

A análise da pureza óptica pela coluna quiral constatou que houve formação preferencial de apenas um dos isômeros com ee_p de 99% e 98%, quando PS-IM e PSC amano foram utilizadas, respectivamente, com razão enantiomérica (E) >200 para ambas as reações. As análises mostraram que o catalisador empregado, lipase de *Pseudomonas species*, tanto quando imobilizado em cerâmica quanto em terra de diatomácea, apresentou uma alta seletividade na reação de resolução de *rac*-3.

A reação de resolução de *rac*-3 catalisada por lipase de *Pseudomonas species*, imobilizadas nos dois diferentes suportes formou o produto L-5-*O*-acetil-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol, similarmente às reações quando Novozym 435 foi utilizada como casalisador, onde a luz polarizada é desviada para a esquerda (-) produzindo o L-isômero. O α-D foi determinado e igualmente comparado com o da literatura. O material de partida recuperado é o D-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol.

O esquema da reação de acetilação enantiosseletiva de *rac*-3 pode ser visualizado na Figura 41.

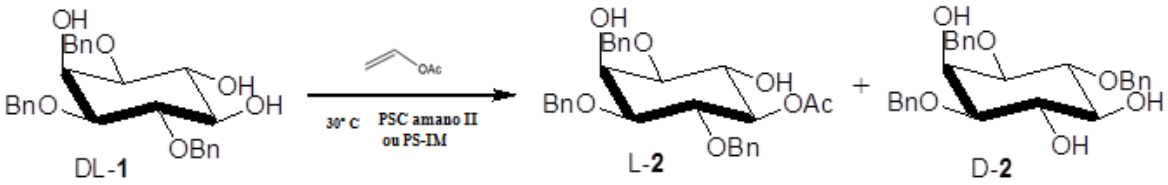


Figura 41. Resolução cinética enzimática do racemato *rac*-3 catalisada por lipase de *Pseudomonas species* imobilizada em dois diferentes suportes em acetato de vinila.

A resolução racêmica pela lipase de *Pseudomonas* sp. tem sido empregada por alguns autores frente a diversos derivados de *mio*-inositol. O racêmico 1,2:3,4-di-O-ciclohexilideno-*mio*-inositol foi resolvido pela lipase de forma regio- e enantiosseletiva em 1,4-dioxano utilizando anidrido acético como agente acilante (LING *et al*., 1994). A resolução gerou o L-isômero produzindo o L-1-O-acetil-2,3-O-ciclohexilideno-*mio*-inositol com 49% de conversão e 98% de excesso enantiomérico.

6.6 Efeito do agente acilante sobre a reação de acetilação de *rac*-3 catalisada pelas lipases PS-IM e PSC Amano II

O estudo da resolução de *rac*-3 foi feito utilizando como agente acilante os ésteres acetato de vinila e acetato de isopropenila em sistema livre de solvente. Os resultados podem ser vistos na Figura 42.

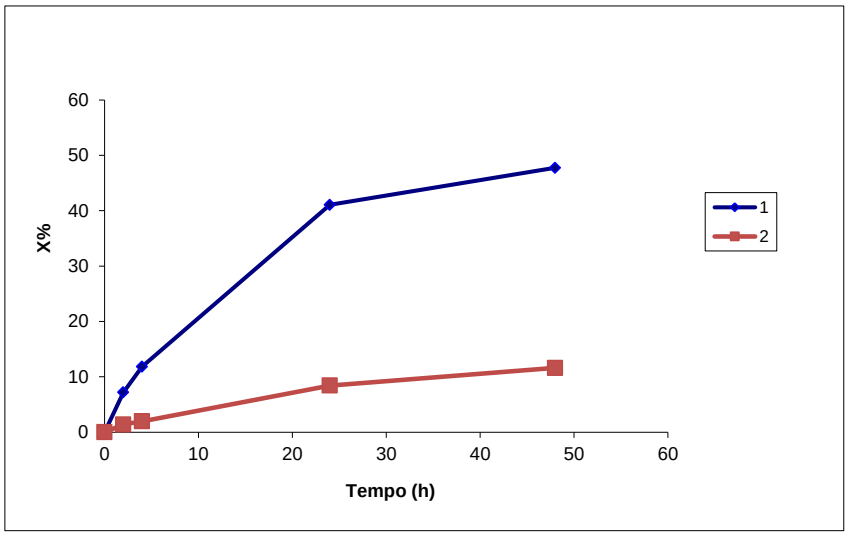


Figura 42. Curva de progresso da resolução enzimática de *rac*-3 catalisada por PS-IM na presença de dois diferentes agentes acilantes: 1- Reação em acetato de vinila; 2- Reação em acetato de isopropenila. As reações foram feitas em sistema livre de solvente.

A Figura 42 ilustra a diminuição da conversão com o tempo para ambos agentes acilantes utilizados. A reação foi interrompida após 48h quando a conversão máxima foi de 48% e 11,6% quando acetato de vinila e acetato de isopropenila foram utilizados, respectivamente.

A avaliação da reação de acilação de *rac*-**3** empregando acetato de vinila e acetato de isopropenila como agente acilante utilizando PS-IM pode ser vista na Tabela 11.

Tabela 11. Efeito de diferentes agentes acilantes na resolução de *rac*-3 utilizando PS-IM e acetato de vinila como solvente da reação; apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato(ee_s), excesso enantiomérico pelo produto(ee_p) e razão enantiomérica (E).

	PS-IM (48h)			
Agente acilante	**X%**	**ees**	**eep**	**E**
Acetato de vinila	48	98	99	>200 (311)
Acetato de isopropenila	11,6	28	70	6,2

Nota-se que em 48h foi obtida uma conversão máxima de 48% quando acetato de vinila foi utilizado como solvente e agente acilante, empregando PS-IM. O ee_s foi de 99%, ee_p 98% e E>200 (311).

O mesmo procedimento foi realizado com a lipase PSC Amano II. A curva de progresso está apresentada na Figura 43.

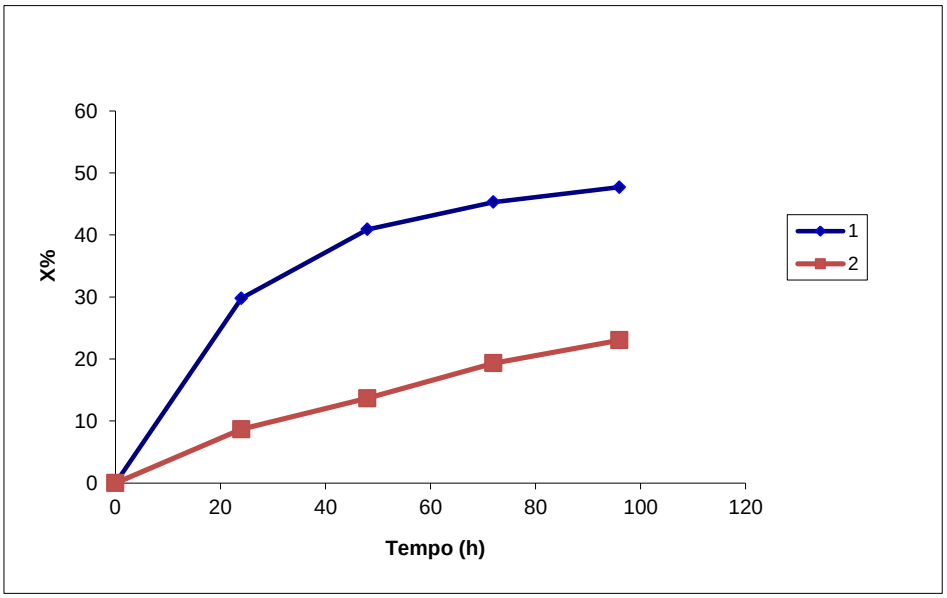


Figura 43. Curva de progresso da resolução enzimática de *rac*-3 catalisada por PSC Amano II na presença de dois diferentes agentes acilantes: 1- Reação em acetato de vinila; 2- Reação em acetato de isopropenila. As reações foram feitas em sistema livre de solvente.

As reações foram interrompidas no tempo de 96h. As alíquotas neste último ponto foram analisadas obtendo um máximo de conversão de 47,7% quando acetato de vinila foi utilizado e 23% quando foi usado acetato de isopropenila. A diminuição da conversão com o tempo ocorre quando acetato de vinila foi empregado. Enquanto isso, as reações em acetato de isopropenila mostraram que a conversão ainda tenderia a crescer com um tempo superior.

A análise do excesso enantiomérico e da razão enantiomérica foram feitas posteriormente. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Efeito de diferentes agente acilante na resolução de *rac*-3 utilizando PSC amano II e acetato de vinila como solvente apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato(ee_s), excesso enantiomérico pelo produto(ee_p) e razão enantiomérica (E).

	PSC Amano II (96h)			
Agente acilante	**X%**	**ees**	**eep**	**E**
Acetato de vinila	47,7	88	98	>200 (645)
Acetato de isopropenila	23	20	66	5,9

Quando PSC Amano II foi utilizada, observou-se que em 96h de tempo de reação foi obtido uma conversão máxima de 47,7%. O ee_s foi de 88%, ee_p 99% e E>200 (645).

Observou-se que os diferentes ésteres empregados influenciaram a enantiosseletividade da enzima imobilizada em diferentes suportes. O acetato de vinila usado como solvente e agente acilante favoreceu PS-IM e PSC Amano II, aumentando a enantiosseletividade, comparativamente aos outros ésteres utilizados. Quando acetato de isopropenila foi utilizado como agente acilante e solvente na resolução do *rac*-3, observou-se uma diminuição da conversão e da enantiosseletividade utilizando lipase de *Pseudomonas species* imobilizada em suportes diferentes.

Durante esta parte do estudo foi observado que não só o agente acilante usado, mas também o emprego da lipase de *Pseudomonas cepacia*, imobilizada em diferentes suportes, modificavam os valores da enantiosseletividade. Para maiores comparações, foram realizadas reações com a lipase de *Pseudomonas species* liofilizada. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultado obtido da reação de *rac*-3 catalisada por lipase de *Pseudomonas species* na forma imobilizada e liofilizada utilizando acetato de vinila como agente acilante e solvente da reação, apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato(ee_s), excesso enantiomérico pelo produto(ee_p) e razão enantiomérica (E).

Catalisador	**X%**	**ees**	**eep**	**E**
PS-IM (48h)	48	99	98	>200 (311)
PSC Amano II (96h)	47,7	88	>99	>200 (645)
PS Amano (112h)*	2,5	1	----	0

*enzima liofilizada

Como pôde ser observado, foi imprescindível a utilização do catalisador na forma imobilizada e ainda, o uso de lipase de *Pseudomonas species* imobilizada em terra de diatomácea, tornou a reação mais rápida do que aquela imobilizada em cerâmica.

A princípio foram utilizadas 890U de lipase imobilizada nas reações. Porém foi observado que mesmo utilizando 2.092,5U de PSC Amano II (50mg), 2,3 vezes que o valor utilizado para PS-IM, foi preciso o dobro de tempo a fim de se ter uma alta conversão ou uma conversão similar a de PS-IM, ou seja, PS-IM foi mais eficiente.

6.7 Efeito de diferentes solventes na reação de acetilação de *rac*-3 pelas lipases PS-IM e PSC Amano II

Após os estudos sobre a influência de agentes acilantes, o estudo da influência de diferentes solventes utilizando PS-IM e PSC Amano II na resolução de *rac*-3 foi realizado.

Os solventes selecionados para este trabalho foram TBME (terc-metil butil éter), hexano, acetato de vinila, acetato de etila e acetato de isopropenila. A escolha dos solventes foi feita principalmente pela estabilidade das lipases utilizadas, por serem solventes bastante empregados em resolução enantiomérica na literatura e/ou pela eficiente solubilidade do substrato nestes solventes.

A Figura 44 apresenta as curvas de progresso das reações de acetilação de *rac*-**3** catalisada por lipase de *Pseudomonas species* imobilizada em cerâmica, em diferentes sistemas sistemas de solvente.

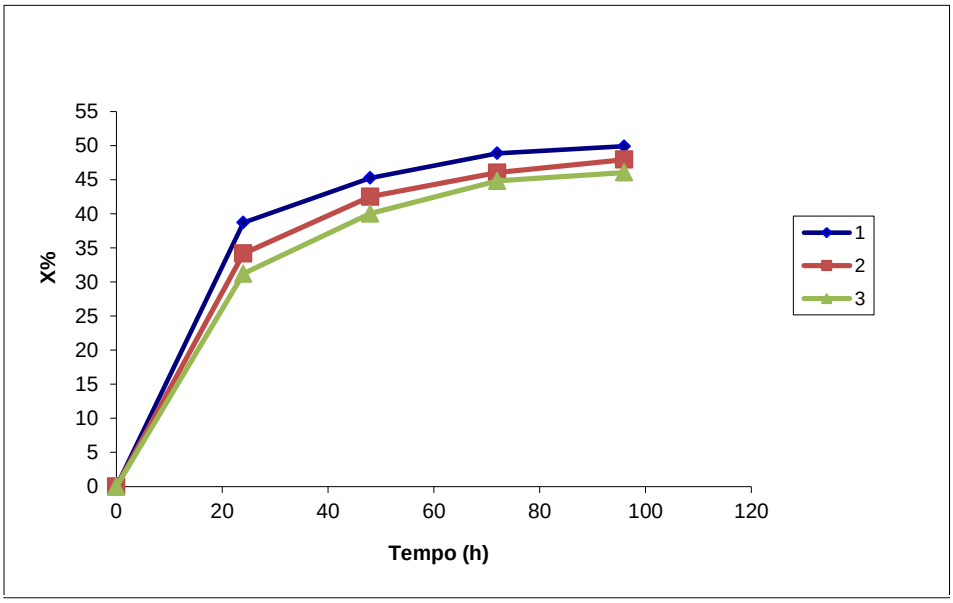


Figura 44- Curva de progresso das reações de resolução enzimática do *rac*-3 em diferentes sistemas de solventes catalisada por PSC Amano II: 1- TBME; 2- hexano e 3-acetato de etila. Em todas as reações acetato de vinila foi utilizado como agente acilante.

O uso de diferentes solventes influenciou a conversão das reações (Figura 44). Dependendo da hidrofobicidade do solvente, o grau de conversão e a velocidade inicial se comportam de maneiras distintas. Quando TBME e hexano foram utilizados como solvente foi obtido 45,25% e 42,52%, respectivamente, em 48h de reação. Após este período a formação de produto ficou mais lenta. A reação foi interrompida quando atingiu 49,9% de conversão (TBME e acetato de vinila) em 96h de reação.

A velocidade de reação foi menor quando acetato de isopropenila foi utilizado como solvente e agente acilante. Em 96h de tempo de reação foi convertido 23%.

A ação dos dois solventes hidrofóbicos, TBME (log P= 2,00) e Hexano (log P=3,90), mostrou diferença quando estes foram utilizados juntamente com acetato de vinila como agente acilante. Todavia a enantiosseletividade foi maior quando TBME e acetato de vinila foram utilizados como solvente. Para ambas as reações o valor da razão enantiomérica foi maior que 200. Os valores reais se encontram em parêntesis.

Na resolução de *rac*-3, o emprego do éster acetato de isopropenila diminuiu a enantiosseletividade da enzima (Tabela 14).

Tabela 14 - Parâmetros de conversão (X%), de excesso enantiomérico do produto (ee) e a razão enantiomerica (E) obtidos com PSC Amano II na acetilação enantiosseletiva do *rac*-**3** em diferentes solventes.

Agente acilante	Solventes	% X_{HPLC}	ee_s	ee_p	E
Acetato de vinila	Hexano	47,9	89	92	65
	TBME	49,9	97	>99	>200 (1057)
	Acetato de etila	46,0	97	>99	>200 (535)

Os valores de ee_p foram similares quando acetato de etila e acetato de vinila foram utilizados como solventes, ambos utilizando acetato de vinila como agente acilante.

A Figura 45 apresenta as curvas de progresso da resolução enzimática de *rac*-3 catalisada por PS-IM.

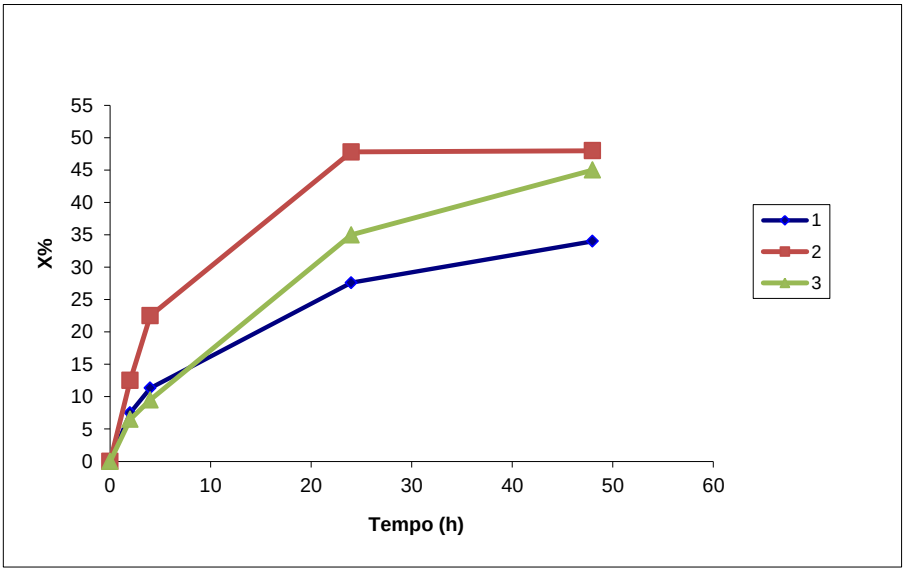


Figura 45- Curva de progresso das reações de resolução enzimática do *rac*-3 catalisada por PS-IM utilizando acetato de vinila como agente acilante, em diferentes sistemas de solventes: 1- TBME; 2- Hexano e 3- Acetato de etila.

Nota-se que as reações têm a velocidade de conversão diminuída após o período de 25h, enquanto as reações catalisadas por PSC Amano II apresentam um decréscimo na conversão após as 20h de reação.

O estudo da influência do solvente utilizando PS-IM mostrou resultados diferentes daqueles com PSC Amano II. PS-IM apresentou diferenças no excesso enantiomérico e na razão enantiomérica em relação aos solventes testados (Tabela 15).

Tabela 15 - Parâmetros de conversão (X%), de excesso enantiomérico do produto (ee) e a razão enantiomérica (E) obtidos com PS-IM na acetilação enantiosseletiva do *rac*-**3** em diferentes solventes.

Agente acilante	Solventes	$X\%_{HPLC}$	ees	eep	E
Acetato de vinila	Acetato de vinila	48,0	99	98	>200 (311)
	Hexano	49,0	95	97	>200 (226)
	TBME	34,0	43	95	63
	Acetato de etila	45,0	79	97	160

Para ambas lipases PS-IM e PSC Amano II, as reações realizadas em acetato de vinila e hexano, os dois como solventes da reação, foram altamente enantiosseletivas, apresentando ee_p de 98% e 97%; E de 311 e 226, respectivamente. As reações foram interrompidas em 48h de reação, quando se obteve 49% de conversão no sistema hexano-acetato de vinila.

A enantiosseletividade foi menor quando TBME foi utilizado como solvente. Apenas 34% foram convertidos nesta reação, o ee_p foi de 95%, a razão enantiomérica obtida foi igual a 63, diferentemente das reações realizadas com PSC Amano II. Por outro lado, a enantiosseletividade foi maior quando acetato de vinila foi utilizado como agente acilante e solvente. A maior conversão foi obtida utilizando hexano como solvente enquanto que nas reações com PSC Amano II, as maiores conversões foram obtidas com TBME.

Similarmente às reações catalisadas por PSC Amano II, em PS-IM o éster usado (acetato de isopropenila) como solvente e agente acilante, diminuiu a enantiosseletividade da enzima apresentando E de 6,2 (tabela 11, 69p.).

Assim como para Novozym 435, houve grande influência dos solventes na enantiosseletividade quando a lipase de *Pseudomonas species* imobilizada em cerâmica e em terra de diatomácea foi utilizada. Entretanto assim como discutido anteriormente, não foi possível estabelecer nenhuma ligação entre os resultados obtidos com os valores de log P.

MACHADO *et al*. (2009) avaliaram o efeito de diferentes solventes na reação de transesterificação do álcool racêmico 1-fenil etanol em acetato de vinila como agente acilante. Os biocatalisadores de maiores destaques mencionados nesta dissertação, foram igualmente utilizados pelos autores: lipase de *Candida antarctica* (CAL-B, Novozym 435), e de *Pseudomonas cepacia* [PS-IM (PSD) e PSC Amano II]. O maior valor de conversão foi obtido quando PS-IM foi o biocatalisador com 68,6% de conversão, seguida de 66,7% em PSC e 48,7% em Novozym 435 na formação do acetato de 1-feniletanol. O solvente mais eficiente para a biocatálise foi o hexano.

GHANEM *et al.* (2004) relataram a alta enantiosseletividade quando a lipase de *P. cepacia* é utilizada como biocatalisador na reação na resolução de álcoois. A desimetrização de diferentes misturas racêmicas de derivados BINOL foi feita em acetato de vinila em sistema livre de solvente obtendo o produto (monoacetato) com 32-44% de conversão e 78-96% dependendo do substrato utilizado.

A resolução de *RS*-ciano-3- fenoxibenzil acetato foi realizada por ZHOU e XU (2005) em uma reação de alcoólise, utilizando *P. cepacia* em diferentes solventes orgânicos. O produto *S*-α-ciano-3- fenoxibenzil álcool foi resolvido com 19,3% de conversão com 98,3% de ee.

O efeito da adição de solventes orgânicos na reação de hidrólise de 2-acetóxi-6-metil-5-hepteno (acetato do sulcatol) catalisada pela lipase PPS (*Pseudomonas cepacia)* foi estudado por KINOSHITA e OHNO (1996). Os solventes alteraram o perfil enantiosseletivo de diferentes formas. Por exemplo, a adição de hexano, embora tenha aumentado a enantiosseletividade devido ao efeito de inibição sobre o enantiômero *S*, diminuiu a reatividade de ambos os enantiomeros. Por outro lado, 2,2 dimetil-butano, solvente com características semelhantes ao hexano, foi ativador dos dois enantiômeros, porém não alterou a enantiosseletividade. Quando ciclopentano foi adicionado, houve um aumento da enantiosseletividade da lipase PPS, elevando a reatividade do enantiomero *R*, diminuindo a reatividade do enantiômero *S*. Ciclohexano mostrou um efeito inverso a este último.

6.8 Planejamento experimental da reação de acetilação de *rac*-3 utilizando a lipase PS-IM

De acordo com os resultados dos experimentos realizados neste trabalho, foram pré-estabelecidas algumas condições de análise como a seleção do melhor agente acilante, o melhor sistema de solventes e aquelas lipases que fossem capazes de catalisar a reação de forma enantiosseletiva de *rac*-3.

Com o objetivo de otimizar as condições de trabalho que serão capazes de maximizar a produção do derivado de *mio*-inositol e obter uma resposta sobre quais as condições reacionais ótimas (máxima conversão com o mínimo de gasto material e energético), e ainda, a construção de um modelo, para avaliar a influência das variáveis do processo no rendimento, foi realizado um planejamento experimental Composto Central.

Os experimentos foram realizados variando temperatura, quantidade de água, substrato e enzima no meio reacional.

6.8.1 Planejamento experimental composto central rotacional (DCCR)

O primeiro conjunto de experimentos realizados visava avaliar as variáveis nas seguintes faixas: 4 a 40mg de lipase PS-IM (atividade 71 a 310,5U) por mL de solvente; 2 a 18mg de substrato por ml de solvente e 0 a 0,8%m/v de H_2O, como consta na metodologia (Tabela 4).

Após ensaios preliminares, selecionou-se a lipase PS-IM, acetato de vinila (como solvente e agente acilante) nas reações do planejamento experimental e o tempo de 24h.

A matriz do planejamento Composto Central foi gerada com com os valores reais (não escalonados) e com as variáveis codificadas (ou escalonadas) conforme exposto na Tabela 16.

Tabela 16. Planejamento Composto Central em termos das variáveis não escalonadas e escalonadas (entre parêntesis) dos respectivos resultados experimentais, no período de 24h, utilizando a lipase PS-IM e como agente acilante e solvente o acetato de vinila.

Ensaios	[S]	[E]	%H_2O	T ^oC	X(%)	ee_p
1	6 (-1)	13 (-1)	0,2 (-1)	35 (-1)	0,6	13,2
2	6 (-1)	13 (-1)	0,2 (-1)	45 (1)	1,6	46,0
3	6 (-1)	13 (-1)	0,6 (1)	35 (-1)	0,1	4,9
4	6 (-1)	13 (-1)	0,6 (1)	45 (1)	1,4	45,5
5	6 (-1)	31 (1)	0,2 (-1)	35 (-1)	6,0	50,8
6	6 (-1)	31 (1)	0,2 (-1)	45 (1)	8,7	82,8
7	6 (-1)	31 (1)	0,6 (1)	35 (-1)	2,1	53,1
8	6 (-1)	31 (1)	0,6 (1)	45 (1)	4,6	74,9
9	14 (1)	13 (-1)	0,2 (-1)	35 (-1)	0,7	23,9
10	14 (1)	13 (-1)	0,2 (-1)	45 (1)	2,0	40,8
11	14 (1)	13 (-1)	0,6 (1)	35 (-1)	0,1	4,3
12	14 (1)	13 (-1)	0,6 (1)	45 (1)	0,5	5,4
13	14 (1)	31 (1)	0,2 (-1)	35 (-1)	1,6	62,6
14	14 (1)	31 (1)	0,2 (-1)	45 (1)	4,1	64,1
15	14 (1)	31 (1)	0,6 (1)	35 (-1)	0,7	14,3
16	14 (1)	31 (1)	0,6 (1)	45 (1)	1,8	38,4
17	2 (-2)	22 (0)	0,4 (0)	40 (0)	5,8	83,6
18	18 (2)	22 (0)	0,4 (0)	40 (0)	1,6	37,8
19	10 (0)	4 (-2)	0,4 (0)	40 (0)	0,3	1,9
20	10 (0)	40 (2)	0,4 (0)	40 (0)	3,5	73,9
21	10 (0)	22 (0)	0 (-2)	40 (0)	5,5	74,6
22	10 (0)	22 (0)	0,8 (2)	40 (0)	0,5	16,7
23	10 (0)	22 (0)	0,4 (0)	30 (-2)	0,6	17,3
24	10 (0)	22 (0)	0,4 (0)	50 (2)	2,6	56,8
25	10 (0)	22 (0)	0,4 (0)	40 (0)	1,4	39,5
26	10 (0)	22 (0)	0,4 (0)	40 (0)	1,4	39,5
27	10 (0)	22 (0)	0,4 (0)	40 (0)	1,4	39,4

28	10 (0)	22 (0)	0,4 (0)	40 (0)	1,4	50,3

Onde:
X%- Valor de conversão em 24h
ee_p – Excesso enantiomérico pelo produto
[S]- Concentração de substrato
[E]- Concentração de enzima
%[H_2O]- Percentual de água
T ^oC- Temperatura

6.8.1.1. Análise Estatística dos Dados e Validação do modelo

Análise da variável de resposta: Conversão

Verifica-se na tabela de ANOVA (Tabela 17) os valores das somas quadrática (SS), das médias quadrática (MS), os valores da distribuição de Fisher (F) e os valores de *p-level* (p).

Tabela 17- ANOVA sem os efeitos não-significativos

	SS	df	MS	F	p
(1) [S](L)	20,1566	1	20,15658	298277,3	0,000000
[S](Q)	6,9038	1	6,90382	102162,8	0,000000
(2) [E](L)	34,4816	1	34,48156	510258,4	0,000000
(3) %H2O (L)	24,1878	1	24,18777	357930,7	0,000000
%H2O (Q)	2,7678	1	2,76775	40957,2	0,000000
(4) T(L)	11,5783	1	11,57829	171335,6	0,000000
1L by 2L	10,2344	1	10,23440	151448,7	0,000000
2L by 3L	4,5293	1	4,52934	67025,2	0,000000
Lack of fit	9,6942	16	0,60589	8965,9	0,000002
Pure error	0,0002	3	0,00007		
Total SS	123,3115	27			

A Análise de Variância (ANOVA) mostra a validade do modelo pelo teste F e o resíduo que mostra a magnitude do erro experimental (Tabela 18). O valor de F tabelado ($F_{0.95, 8, 19}$=1.95) foi menor que o valor de F calculado (27,83), mostrando a validade do modelo experimental. O valor do resíduo (9,69) foi baixo quando comparado com a regressão, e o valor do erro puro (0,0002) indica boa reprodutibilidade da análise. Os valores do teste F mostraram ser significativos, uma vez que o F-calculado foi maior que o F –tabelado, levando então a rejeição da hipótese nula.

Tabela 18. Análise de variância para desenvolvimento experimental

	erro puro 95%					
	SQ	*GL*	*QM*	*Fcalc*	*F tabelado*	p-valor
Regressão	*113,6173*	*8*	*14,20217*	*27,83532*	*1,95*	6,48503E-09
Resíduos	*9,6942*	*19*	*0,510221*			
Falta de ajuste	9,6942	16				
Erro puro	0,0002	3				
TOTAL	123,3115	27				
95% de confiança						

R^2=92,13%

Com os dados da ANOVA, em relação ao *p-level*, verificou-se que não houve valores marginalmente significativos (valores entre 0,05<x<0,10).

O valor do coeficiente de determinação (R^2), apresentado pela tabela da ANOVA foi de 92,13%.

O diagrama de Pareto (Figura 46) apresenta de forma rápida e clara os fatores que foram estatisticamente importantes.

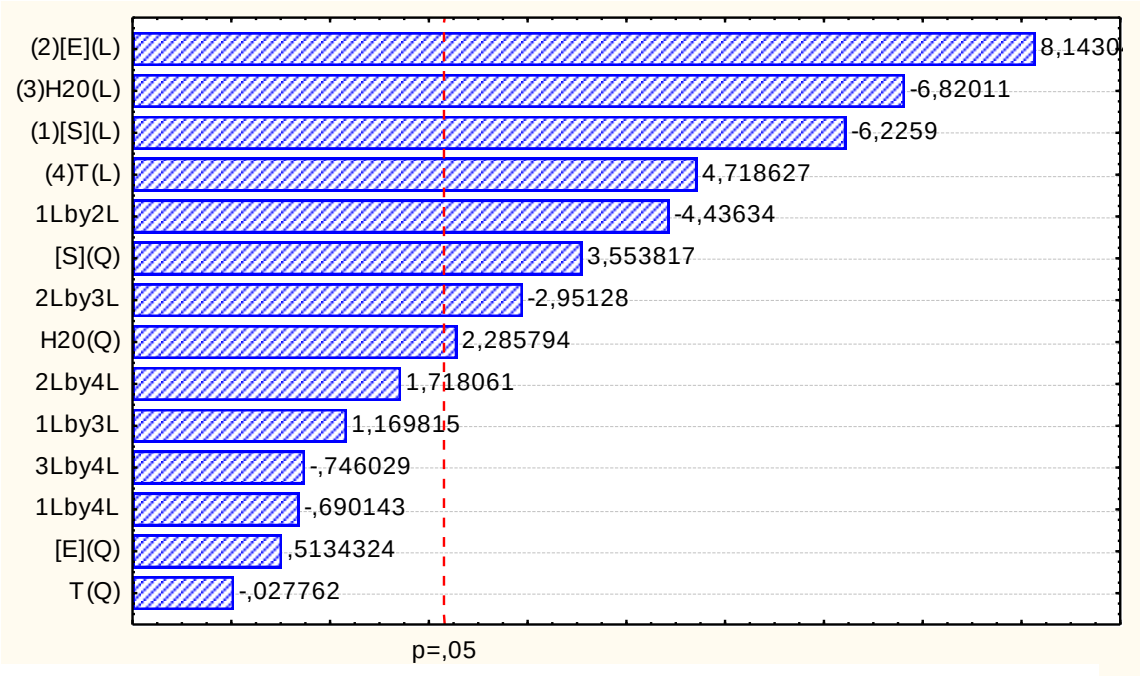


Figura 46. Gráfico de Pareto

Os fatores significativos foram os seguintes termos lineares: concentração de substrato, concentração de enzima, H_2O (%m/v) e a interação entre os termos lineares X_1 e X_2 (concentração de substrato e concentração de enzima, respectivamente), além da interação dos termos lineares X_3 e X_5 (concentração de enzima e %m/v de H_2O, respectivamente). Os

termos quadráticos da concentração do substrato e da e %m/v de H_2O apresentaram efeito positivo sobre a variável conversão.

Os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória (p=0.05) devem ser considerados no modelo matemático, ou seja, se os fatores que estão representados segundo o teste *t* de *Student* ultrapassarem a linha rejeitam a hipótese nula, sendo então significativos. Os fatores que não ultrapassam essa linha divisória aceitam a hipótese nula e por isso são considerados não significativos estatisticamente. Os valores encontrados no teste *t* de *Student* são utilizados nesse tipo de análise em módulo, não se considerando os sinais positivos ou negativos. Os valores ao lado de cada retângulo representam a estatística de teste *t* de Student, que também podem ser encontrados na tabela de coeficiente de correlação.

Os efeitos estimados (em termos das variáveis escalonadas) estão apresentados na Tabela 19. Nesta tabela também se pode analisar o valor do test t, observando a significância estatística dos parâmetros.

A análise da significância dos coeficientes é feita pela tabela dos efeitos estimados (coeficientes das variáveis escalonadas, uma vez que as variáveis originais apresentam valores com diferentes ordens de grandeza).

Tabela 19. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas

	Effect	Std. Err.	t	p	-95%	95%	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95%	95%
Mean/Interc.	1,44205	0,360559	3,99948	0,001514	0,66311	2,22099	1,44205	0,360559	0,66311	2,220991
(1) [S](L)	-1,83288	0,294395	-6,22590	0,000031	-2,46888	-1,19687	-0,91644	0,147198	-1,23444	-0,598436
[S](Q)	1,04623	0,294395	3,55382	0,003531	0,41022	1,68223	0,52311	0,147198	0,20511	0,841115
(2) [E](L)	2,39728	0,294395	8,14305	0,000002	1,76127	3,03328	1,19864	0,147198	0,88064	1,516639
[E](Q)	0,15115	0,294395	0,51343	0,616263	-0,48485	0,78715	0,07558	0,147198	-0,24243	0,393577
(3) %H2O (L)	-2,00781	0,294395	-6,82011	0,000012	-2,64381	-1,37181	-1,00390	0,147198	-1,32191	-0,685903
%H2O (Q)	0,67293	0,294395	2,28579	0,039691	0,03692	1,30893	0,33646	0,147198	0,01846	0,654465
(4) T (L)	1,38914	0,294395	4,71863	0,000401	0,75314	2,02514	0,69457	0,147198	0,37657	1,012572
T (Q)	-0,00817	0,294395	-0,02776	0,978274	-0,64418	0,62783	-0,00409	0,147198	-0,32209	0,313915
1L by 2L	-1,59956	0,360559	-4,43634	0,000671	-2,37850	-0,82062	-0,79978	0,180280	-1,18925	-0,410311
1L by 3L	0,42179	0,360559	1,16982	0,263076	-0,35715	1,20073	0,21089	0,180280	-0,17858	0,600364
1L by 4L	-0,24884	0,360559	-0,69014	0,502240	-1,02778	0,53010	-0,12442	0,180280	-0,51389	0,265052
2L by 3L	-1,06411	0,360559	-2,95128	0,011244	-1,84305	-0,28517	-0,53206	0,180280	-0,92153	-0,142586
2L by 4L	0,61946	0,360559	1,71806	0,109494	-0,15948	1,39840	0,30973	0,180280	-0,07974	0,699202
3L by 4L	-0,26899	0,360559	-0,74603	0,468926	-1,04793	0,50995	-0,13449	0,180280	-0,52396	0,254977

Considere [S](L)= X1; [S](Q)= (X1)2; [E](L)=X2; [E](Q)=(X2)2; %H2O(L)=X3; %H2O(Q)= (X3)2; T oC (L)= X4; T oC (Q)= (X4)2; 1L by 2L= X1X2; 1L by 3L= X1X3; 1L by 4L= X1X4; 2L by 3L= X2X3; 2L by 4L= X2X4 e 3L by 4L= X3X4.
R^2 =96,51%

Após a retirada dos efeitos não significativos, a nova tabela dos efeitos estimados foi gerada na Tabela 20.

Tabela 20. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas sem as variáveis não significativas

	Effect	Std. Err.	t	p	-95%	95%	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95%	95%
Mean/Interc.	1,52784	0,225883	6,76384	0,000002	1,05506	2,00062	1,52784	0,225883	1,05506	2,000616
(1) [S](L)	-1,83288	0,291614	-6,28528	0,000005	-2,44323	-1,22252	-0,91644	0,145807	-1,22161	-0,611260
[S](Q)	1,01763	0,276649	3,67842	0,001596	0,43860	1,59666	0,50882	0,138325	0,21930	0,798332
(2) [E](L)	2,39728	0,291614	8,22072	0,000000	1,78692	3,00763	1,19864	0,145807	0,89346	1,503815
(3) %H2O (L)	-2,00781	0,291614	-6,88516	0,000001	-2,61816	-1,39745	-1,00390	0,145807	-1,30908	-0,698727
%H2O (Q)	0,64433	0,276649	2,32906	0,031044	0,06530	1,22336	0,32217	0,138325	0,03265	0,611682
(4) T (L)	1,38914	0,291614	4,76363	0,000135	0,77879	1,99950	0,69457	0,145807	0,38939	0,999748
1L by 2L	-1,59956	0,357153	-4,47865	0,000257	-2,34709	-0,85203	-0,79978	0,178576	-1,17355	-0,426017
2L by 3L	-1,06411	0,357153	-2,97943	0,007704	-1,81164	-0,31658	-0,53206	0,178576	-0,90582	-0,158292

A Tabela 20 apresenta as variáveis que resultaram em um efeito positivo e negativo no tocante ao aumento da conversão. Nota-se que ocorre uma diminuição da conversão quando há interação dos termos lineares da concentração de substrato e da enzima assim como no efeito de interação entre os termos lineares da concentração de enzima e de água. Observou-se ainda o aumento da conversão quando uma menor concentração de substrato era adicionada na reação, tendo o termo linear da concentração do substrato um efeito negativo sobre a concentração. Resultados similares foram obtidos com a concentração de água, que também mostrou um efeito negativo, no qual a concentração de 0%m/v foi a mais satisfatória. Isso pode significar um provável deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da reação de hidrólise.

As condições ótimas para a obtenção da máxima conversão da reação foram com as maiores quantidades de enzima e menores concentrações de substrato, menor quantidade de água. Como não foi obtido nenhum efeito para a variável independente temperatura, a de 30°C foi escolhida, uma vez que altas temperaturas elevam o custo no processo e ainda, temperaturas muito elevadas podem diminuir a estabilidade da enzima. A análise das superfícies de resposta mais adiante deste trabalho explicita melhor estes resultados.

Diante do exposto, o modelo para descrever o efeito do aumento da conversão (considere X%= Y) foi gerado a partir dos coeficientes das variáveis escalonadas, presente na tabela dos efeitos estimados, originando a seguinte Equação (13):

$$\mathbf{Y} = 1{,}527 - 0{,}91X_1 + 0{,}51(X_1)^2 + 1{,}20X_2 - 1{,}00\,X_3 + 0{,}32(X_3)^2 + 0{,}69X_4 - 0{,}80\,X_1X_2 - 0{,}53X_2X_3 \qquad \text{Eq.13}$$

Análise dos resíduos

Ainda, para fazermos a verificação da adequação do modelo, é preciso realizamos a análise da variância. Este é um teste exato de hipóteses de nenhuma diferença nas médias dos tratamentos. Dessa forma, é primordial verificar que essas suposições sejam válidas. Para isso, devem-se realizar vários testes nos resíduos.

Teste da Normalidade

O gráfico de probabilidade normal dos resíduos foi gerado e apresentado na Figura 47.

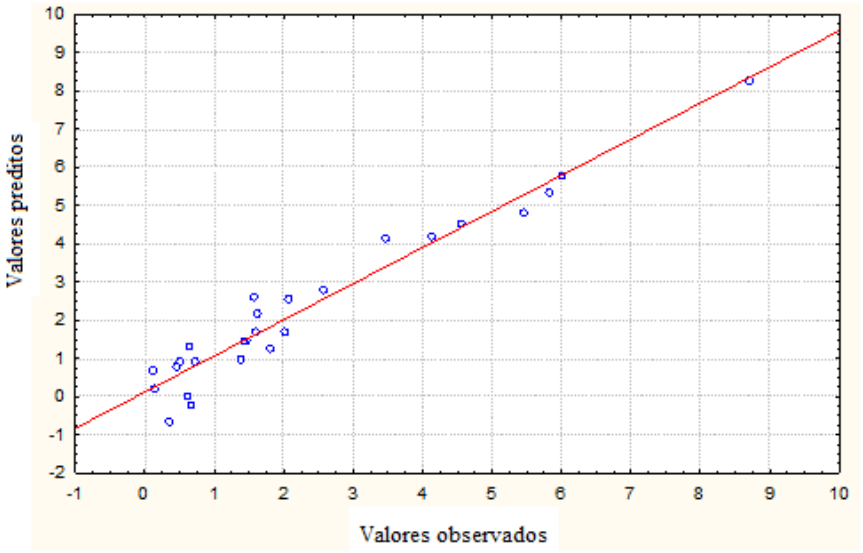


Figura 47. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos

Desta forma, verificou-se que os resíduos seguem uma distribuição normal, visto que os pontos experimentais estão próximos da linha contínua, o que é representativo de um bom modelo. Quanto mais próximos os pontos experimentais estiverem da linha contínua, mais será válida a suposição da normalidade dos resíduos. Segundo CALADO e MONTGOMERY (2003), os pontos devem estar cobertos por um “lápis gordo” colocado sobre a linha reta. Isso garante a normalidade dos resíduos.

Com o objetivo de averiguar a variância constante dos erros, a Figura 48 foi gerada.

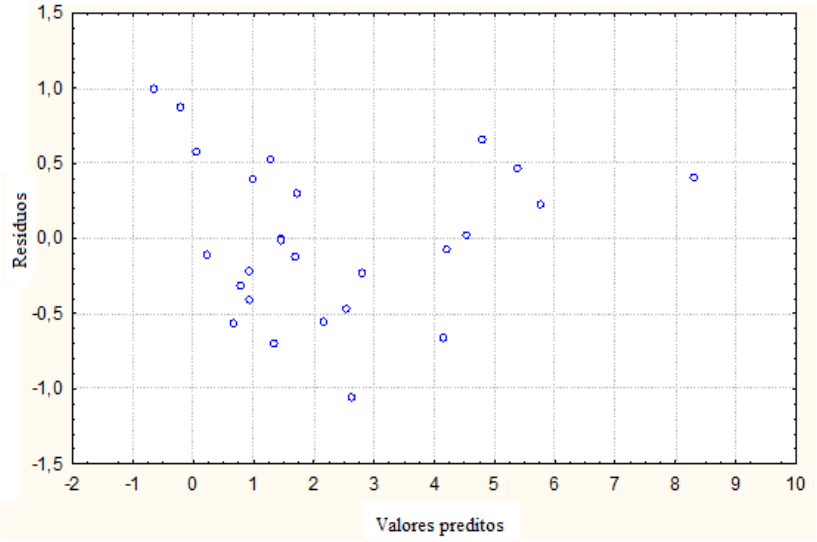


Figura 48. Gráfico da homogeneidade da variância-valores preditos x Resíduos

Como discutido no item 4.8.1., a análise do gráfico de homogeneidade da variância pode apresentar 4 diferentes padrões de comportamento, sendo a forma aleatória o aspecto esperado deste gráfico. A Figura 48 apresenta o padrão de comportamento obtido na análise da variável de resposta (conversão). Comparando o resultado obtido nesta Figura com os padrões de comportamento da homogeneidade da variância, pode-se concluir que o padrão na forma aleatória é o que melhor descreve o comportamento obtido neste trabalho.

Uma forma de obter uma análise quantitativa de teste de normalidade é realizando os testes de Shapiro e Kolmogorov-Smirnov. O teste foi realizado e confirmou a normalidade dos resíduos (Figura 49).

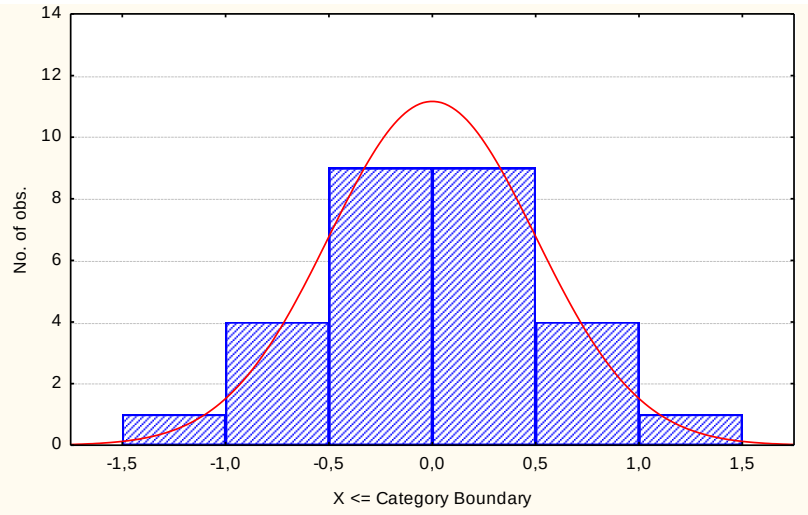


Figura 49. Gráfico de Shapiro e Komogorov com p= 0,969 e p>0,20, respectivamente.

Neste trabalho, os testes confirmaram a suposição de normalidade dos resíduos, tanto para Shapiro (p = 0, 969), quanto para Kolmogorov (p > 0,20). Logo a hipótese nula (Ho) foi aceita significando que os resíduos têm distribuição normal.

6.8.1.1.1. Estudo da conversão na análise da Superfície de Resposta

A partir dos resultados obtidos no planejamento, as superfícies de respostas foram geradas. A Figura 50 apresenta as superfícies de resposta variando a concentração de substrato e de enzima.

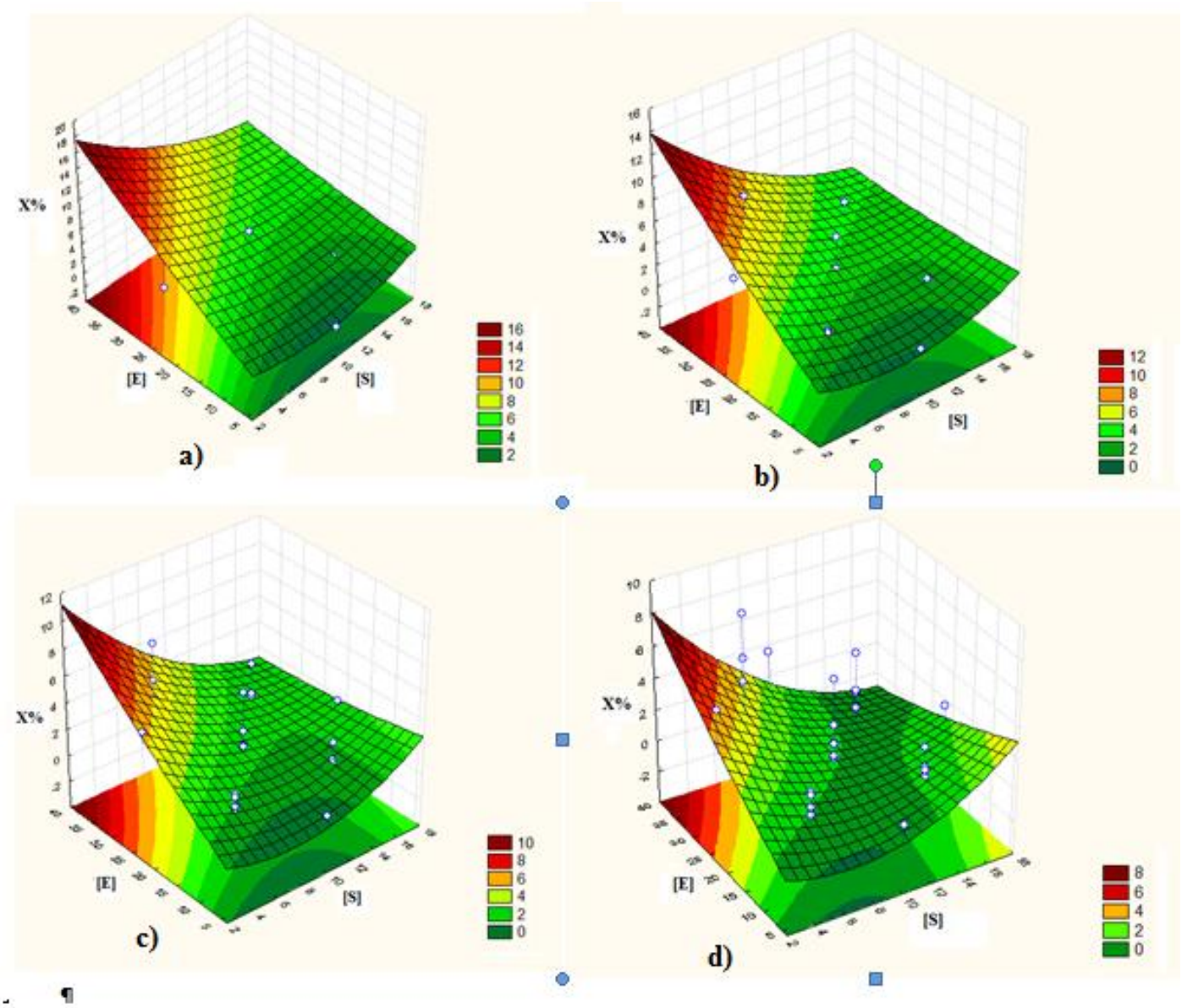


Figura 50. Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para a resolução cinética de *rac*-3 como resposta para concentração de enzima e substrato: a) Valores fixados de 0%m/v de água e 40°C de Temperatura e b) 0%m/v de água e 30°C de Temperatura c) Valores fixados de 0,4%m/v de água e 40°C de Temperatura d) 0,4 %m/v de água e 30 °C de Temperatura.

Nas Figuras 50a e 50c foi fixado o valor de 40º C, variando a concentração de água. Os valores para a variável independente temperatura foi fixado em 30º C nas Figuras 50b e 50d, variando a concentração de H_2O.

Nota-se que os maiores valores para a variável de resposta conversão foram obtidos com a maior concentração de enzima, temperatura de 40ºC, 0% de água

A Figura 51 mostra os resultados quando os valores da temperatura e da concentração de enzima foram avaliados. Para esta análise, os valores da concentração de água e do substrato foram fixados (0%m/v e 2mg/mL).

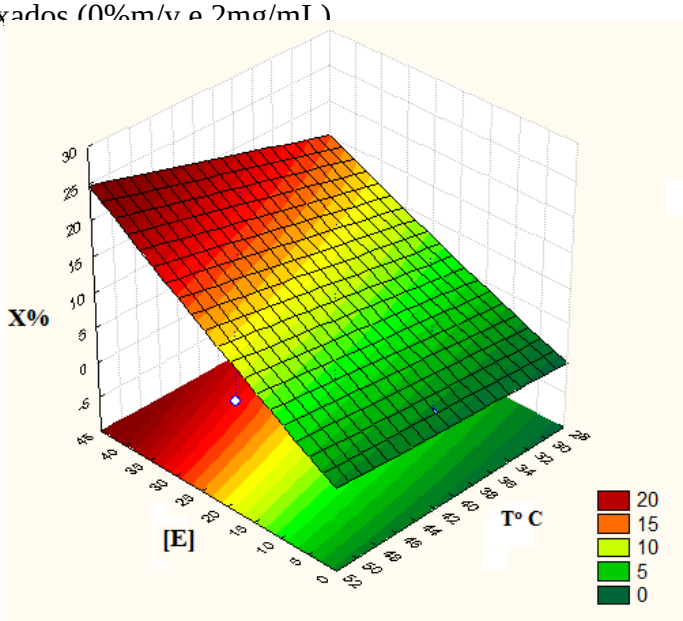


Figura 51. Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para a resolução cinética de *rac*-3: influência da temperatura e da concentração de enzima sobre a conversão.

O gráfico de superfície apresentado (Figura 51) mostra que valores maiores de temperaturas, utilizando uma maior concentração de enzima, resultam em uma maior conversão.

6.8.1.2. Análise da variável de resposta: excesso enantiomérico pelo produto (ee_p)

Analisando os resultados obtidos pela tabela da ANOVA (Tabela 21), verifica-se os valores das somas quadrática (SS), das médias quadrática (MS), os valores da distribuição de Fisher (F) e os valores de *p-level* (p). Nota-se que os termos lineares concentração de substrato, enzima, água, temperatura e a interação entre os termos lineares concentração de substrato e enzima foram significativos. O termo quadrático, concentração de substrato, mostrou-se ser significativo.

Tabela 21. Tabela Anova gerada para a variável de resposta ee_p

	SS	df	MS	F	p
S(L)	2179,56	1	2179,564	74,7062	0,003258
S(Q)	547,73	1	547,733	18,7739	0,022675
E(L)	7375,38	1	7375,376	252,7964	0,000541
%H2O(L)	3243,02	1	3243,022	111,1569	0,001823
T(L)	2200,79	1	2200,787	75,4336	0,003212
1L by 3L	560,61	1	560,605	19,2151	0,021983
Lack of fit	1499,41	18	83,300	2,8552	0,210552
Pure error	87,53	3	29,175		
Total SS	17694,02	27			

O valor do F tabelado ($F_{0.95,\ 6,21}$=1,95) foi menor que o valor do F calculado (37,80), mostrando a validade do modelo experimental. O valor do resíduo (1499,41) foi baixo quando comparado com a regressão, e o valor do erro puro (87,53) indica boa reprodutibilidade da análise (Tabela 22).

Tabela 22. Análise de variância para desenvolvimento experimental

	SQ	*GL*	*QM*	*Fcalc*	*F tabelado*	p-valor
Regressão	*16194,61*	*6*	*2699,102*	*37,80229223*	*1,95*	3,40126E-10
Resíduos	*1499,41*	*21*	*71,40048*			
Falta de ajuste	*1499,41*	*18*				
Erro puro	87,53	*3*				
TOTAL	*17694,02*	*27*				

95% de confiança

R^2=96,04%

Com os dados da ANOVA, em relação ao *p-level*, verificou-se que não houve valores marginalmente significativos (valores entre 0,05 < x < 0,10). O valor do coeficiente de determinação (R^2), apresentado na tabela como *R-sqr*, foi de 96,04%.

Os efeitos em termos das variáveis escalonadas estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas

	Effect	Std. Err.	t	p	-95%	95%	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95%	95%
Mean/Interc.	42,1589	3,666088	11,49970	0,000000	34,2388	50,0790	42,1589	3,666088	34,2388	50,07900
(1) [S](L)	-19,0594	2,993349	-6,36725	0,000025	-25,5261	-12,5927	-9,5297	1,496674	-12,7631	-6,29633
[S](Q)	7,6153	2,993349	2,54407	0,024465	1,1486	14,0820	3,8077	1,496674	0,5743	7,04102
(2) [E](L)	35,0604	2,993349	11,71276	0,000000	28,5936	41,5271	17,5302	1,496674	14,2968	20,76355
[E](Q)	-3,7964	2,993349	-1,26826	0,226947	-10,2631	2,6704	-1,8982	1,496674	-5,1315	1,33519
(3) %H2O (L)	-23,2487	2,993349	-7,76680	0,000003	-29,7155	-16,7820	-11,6244	1,496674	-14,8577	-8,39100
%H2O (Q)	0,0746	2,993349	0,02494	0,980483	-6,3921	6,5414	0,0373	1,496674	-3,1960	3,27069
(4) T (L)	19,1520	2,993349	6,39817	0,000024	12,6852	25,6187	9,5760	1,496674	6,3426	12,80935
T (Q)	-4,2111	2,993349	-1,40682	0,182936	-10,6778	2,2556	-2,1056	1,496674	-5,3389	1,12782
1L by 2L	-8,3585	3,666088	-2,27995	0,040123	-16,2786	-0,4384	-4,1793	1,833044	-8,1393	-0,21920
1L by 3L	-11,8386	3,666088	-3,22920	0,006587	-19,7587	-3,9184	-5,9193	1,833044	-9,8793	-1,95922
1L by 4L	-7,9702	3,666088	-2,17405	0,048764	-15,8904	-0,0501	-3,9851	1,833044	-7,9452	-0,02507
2L by 3L	-4,4715	3,666088	-1,21968	0,244253	-12,3916	3,4487	-2,2357	1,833044	-6,1958	1,72433
2L by 4L	-4,0038	3,666088	-1,09210	0,294614	-11,9239	3,9164	-2,0019	1,833044	-5,9619	1,95818
3L by 4L	3,0448	3,666088	0,83053	0,421230	-4,8753	10,9649	1,5224	1,833044	-2,4377	5,48245

R^2=96,04%

Considere [S](L)= W_1; [S](Q)= $(W_1)^2$; [E](L)=W_2; [E](Q)= $(W_2)^2$; %H2O(L)=W_3; %H2O(Q)= $(W_3)^2$; T °C (L)= W_4; T °C (Q)= $(W_4)^2$; 1L by 2L= W_1W_2; 1L by 3L= W_1W_3; 1L by 4L= W_1W_4; 2L by 3L= W_2W_3; 2L by 4L= W_2W_4 e 3L by 4L= W_3W_4.

Com os resultados obtidos na tabela dos efeitos, nota-se que os termos lineares de concentração de substrato e concentração de água mostraram efeito significativo negativo quando o ee_p foi avaliado como variável de resposta. Já os termos lineares concentração de enzima e temperatura mostraram efeito positivo para a variável de resposta. As interações dos termos lineares W_1W_2; W_1W_5 e W_1W_7 tiveram efeito significativo negativo no planejamento, o que significa que com a interação há uma diminuição da variável de resposta (ee_p). O termo quadrático concentração de substrato foi significativo com efeito positivo.

O diagrama de Pareto com os fatores em ordem decrescente de significância é apresentado na Figura 52.

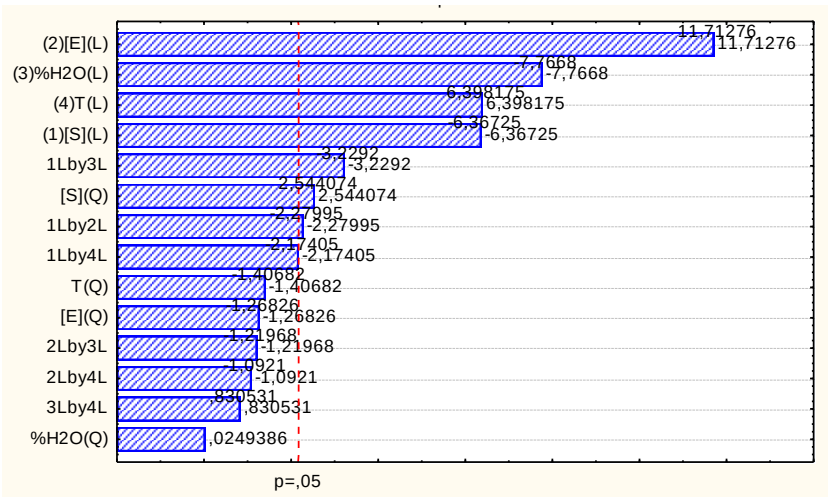


Figura 52. Gráfico de Pareto mostrando os fatores que são significativos, em ordem crescente de significância onde fatores significativos estão após a linha na vertical de cor vermelha.

Abaixo, pode-se analisar a Tabela 24, sem os termos que não foram significativos.

Tabela 24. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas sem as variáveis não significativas

	Effect	Std. Err.	t	p	-95%	95%	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95%	95%
Mean/Interc.	38,1925	1,861463	20,51747	0,000000	34,2964	42,0886	38,1925	1,861463	34,2964	42,08859
(1) [S](L)	-19,0594	3,039756	-6,27004	0,000005	-25,4217	-12,6971	-9,5297	1,519878	-12,7108	-6,34856
[S](Q)	8,9374	2,843431	3,14319	0,005353	2,9861	14,8888	4,4687	1,421716	1,4930	7,44440
(2) [E](L)	35,0604	3,039756	11,53394	0,000000	28,6981	41,4226	17,5302	1,519878	14,3490	20,71132
(3) %H2O (L)	-23,2487	3,039756	-7,64822	0,000000	-29,6110	-16,8865	-11,6244	1,519878	-14,8055	-8,44323
(4) T (L)	19,1520	3,039756	6,30049	0,000005	12,7897	25,5142	9,5760	1,519878	6,3948	12,75712
1L by 2L	-8,3585	3,722926	-2,24514	0,036855	-16,1507	-0,5663	-4,1793	1,861463	-8,0753	-0,28316
1L by 3L	-11,8386	3,722926	-3,17991	0,004931	-19,6307	-4,0464	-5,9193	1,861463	-9,8154	-2,02319
1L by 4L	-7,9702	3,722926	-2,14086	0,045467	-15,7624	-0,1781	-3,9851	1,861463	-7,8812	-0,08904

R^2=96,04%

Considere [S](L)= W_1; [S](Q)= $(W_1)^2$; [E](L)=W_2; [E](Q)= $(W_2)^2$; %H2O(L)=W_3; %H2O(Q)= $(W_3)^2$; T °C (L)= W_4; T °C (Q)= $(W_4)^2$; 1L by 2L= W_1W_2; 1L by 3L= W_1W_3; 1L by 4L= W_1W_4; 2L by 3L= W_2W_3; 2L by 4L= W_2W_4 e 3L by 4L= W_3W_4.

O modelo com as variáveis codificadas que representam a variável de resposta excesso enanciomérico pelo produto (ee_p) (considere ee_p = K) foi gerado a partir dos coeficientes das variáveis escalonadas, presente na tabela dos efeitos estimados (Tabela 24), originando a seguinte Equação (14):

$$\mathbf{K} = 38{,}1925 - 9{,}53W_1 + 4{,}468(W_1)^2 + 17{,}53W_2 - 11{,}624W_3 + 9{,}576W_4 - 4{,}179\,W_1W_2 - 5{,}919\,W_1W_3 - 3{,}985\,W_1W_4$$

Eq.14

Análise dos resíduos

Teste da Normalidade

A fim de se verificar a adequação do modelo para a variável de resposta excesso enantiomérico, o gráfico de probabilidade normal dos resíduos foi gerado (Figura 53).

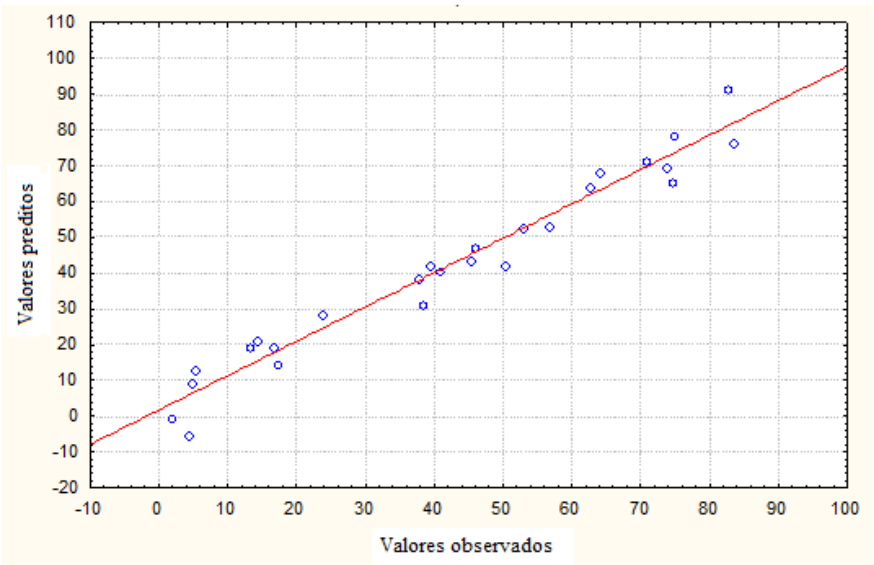


Figura 53. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos

Desta forma, verificou-se que os resíduos seguem uma distribuição normal, visto que os pontos experimentais estão próximos da linha contínua, o que é representativo de um bom modelo para a variável de resposta ee_p.

A fim de estudar a variância constante dos erros a Figura 54 foi gerada.

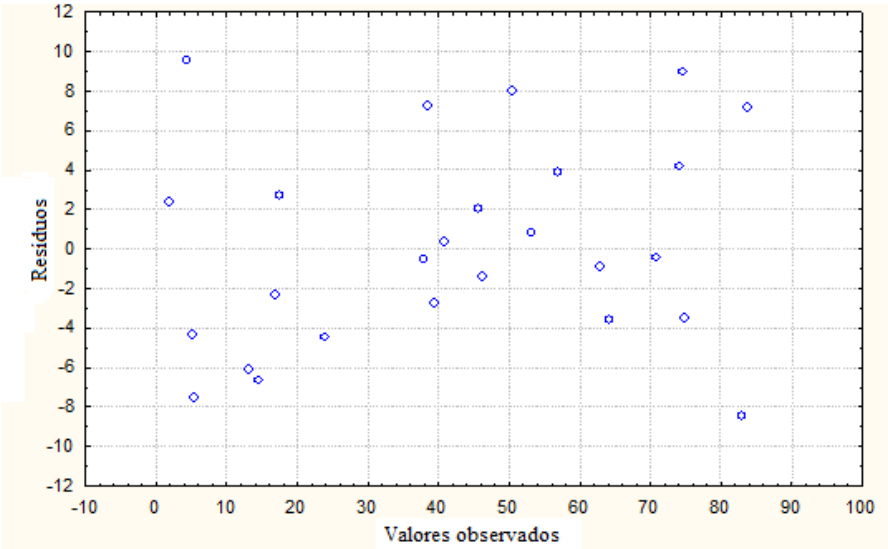


Figura 54. Gráfico da homogeneidade da variância-valores observados x Resíduos

Após a análise do gráfico da homogeneidade da variância, pode-se visualizar o padrão de comportamento aleatório que é o aspecto esperado do gráfico da homogeneidade da

variância. Este padrão de comportamento caracteriza uma variância constante dos erros. A Figura 54 apresenta o padrão de comportamento obtido com êxito.

Ao realizar a análise quantitativa de teste de normalidade pelos testes de Shapiro e Kolmogorov-Smirnov, pôde-se confirmar a normalidade dos resíduos (Figura 55).

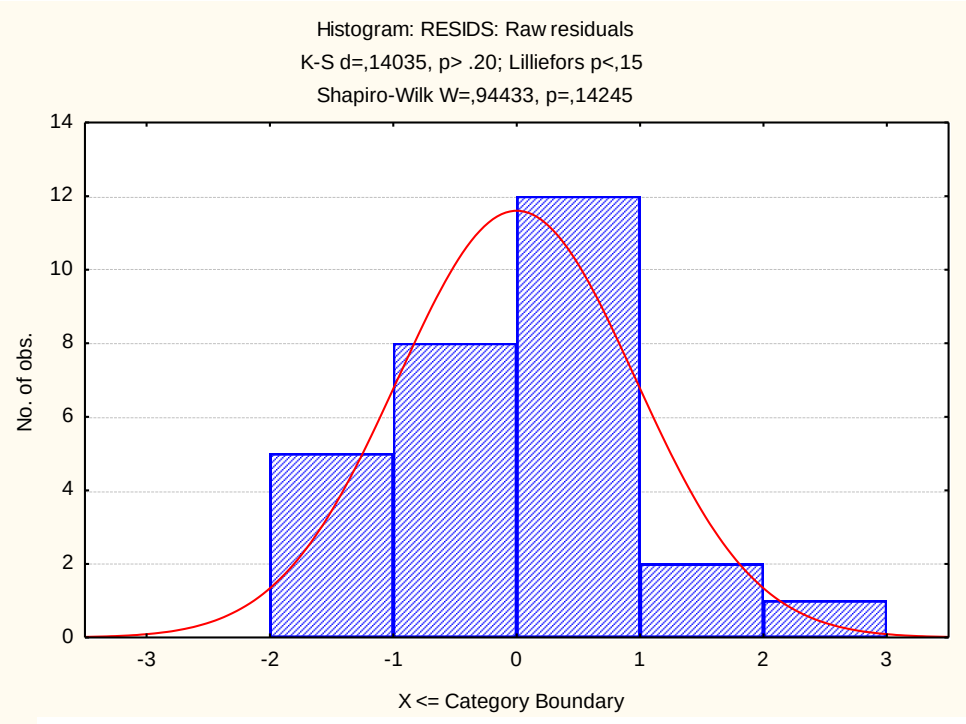


Figura 55. Gráfico de Shapiro e Komogorov com p= 0,944 e p>0,20, respectivamente.

Os testes confirmaram a suposição de normalidade dos resíduos, tanto para Shapiro (p= 0,14245), quanto para Kolmogorov (p > 0,20). Logo a hipótese nula (H_o) foi aceita significando que os resíduos têm distribuição normal.

6.8.1.2.1. Estudo da razão enantiomérica (E) na análise da Superfície de Resposta

Confirmando todos os testes realizados no trabalho, a curva de superfície de resposta foi gerada avaliando os efeitos sobre a razão enantiomérica (E). A Figura 56a e 56b mostra o efeito da temperatura e da concentração de enzima, Figura 56c e 56d mostra o efeito da concentração de enzima e substrato, ambos os efeitos foram analisados sobre a E.

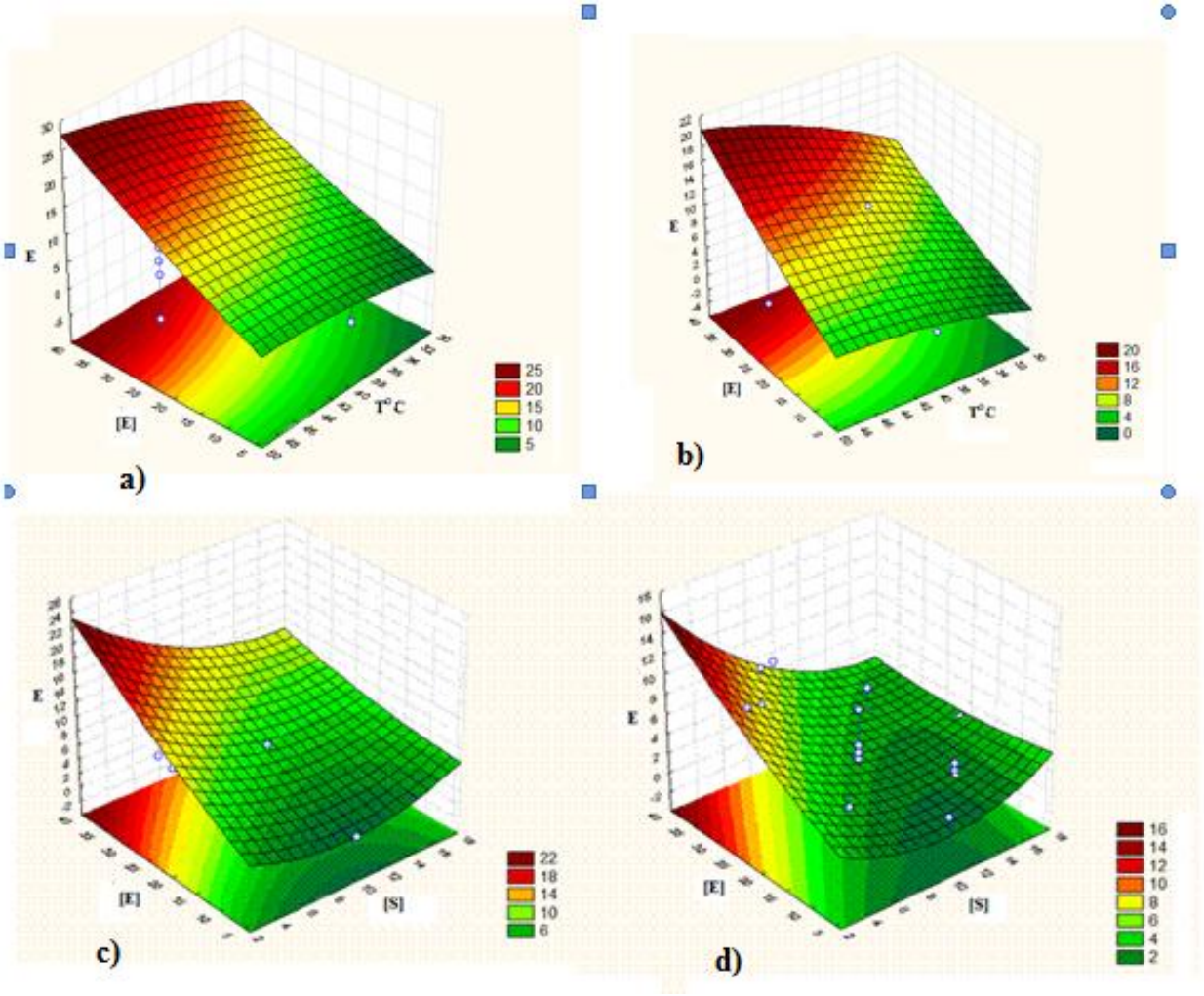


Figura 56. Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para a resolução cinética de *rac*-3 como resposta para a razão enantiomérica (E) utilizando concentração de enzima e temperatura como variáveis independentes, em 56a e 56b e concentração de enzima e substrato em 56c e56d: a) Valores fixados de 2 mg/mL de substrato e 0%m/v H_2O , b) 2 mg/mL de substrato e 0,4 %m/v H_2O. C) Os valores fixados de 0%m/v H_2O e 40^oC de Temperatura e d) 0,4%m/v H_2O e 40^oC de Temperatura.

A Figura 56 mostra os resultados quando os valores da concentração de enzima e temperatura (56a e 56b) e concentração de enzima e substrato (56c e 56d) foram avaliados. Nota-se que os maiores valores da E foram quando as maiores concentrações de enzima e temperatura foram utilizados (56a e 56b) e ainda, menores concentrações de substrato em maiores concentrações de enzima também mostraram a mesma resposta, o aumento da E.

As condições de pontos ótimos para a variável conversão e para o ee_p foram quando a menor concentração de água e substrato, na maior concentração de enzima dentro da faixa experimental, foram empregados nas reações. Com os valores obtidos na conversão e no ee_p, pôde-se calcular a E e realizar o estudo das variáveis independentes sobre a mesma.

GARCIA *et al.* (2002) utilizaram os planejamentos composto central e fatorial afim de se obter o máximo de conversão e do excesso enantiomérico do éster 2-hidroxi-5-hexenil-2-clorobutirato, utilizando *Mucor miehei* como biocatalisador. Os autores utilizaram como variáveis de resposta a temperatura e a concentração do biocatalisador e os resultados mostraram que o efeito da temperatura foi significativo, com uma inflluencia positiva para a conevrsão, porém esta variável independente mostrou um efeito negativo quando o excesso enantiomérico (ee) foi analisado. O efeito da concentração do biocatalisador foi negativo para ambas as variáveis de resposta. Os valores ótimos para a reação foram de 80º C e 5% de concentração do biocatalisador para a conversão e 60º C com 10% de concentração do biocatalisador para o ee. O valor máximo de conversão foi de 53,1% com máximo de 40% para o ee. Os autores não realizaram o cálculo para a E.

CUNHA *et al*. (2011) realizaram um planejamento experimental para a resolução cinética de 1-D-6-desoxi-6-flúor-*mio*-inositol pela lipase Novozym 435 em dois agentes acilante, acetato de etila e acetato de vinila, em sistema livre de solvente no período de 24h. Na análise, os autores otimizaram as condições de ensaio e obtiveram resultados interessantes quando os diferentes ésteres foram utilizados. Em uma primeira condição foi utilizado acetato de etila, em 45ºC, 28mg de substrato, 80mg de enzima e 0%m/v de H_2O. Na segunda condição utilizando acetato de vinila, a mesma temperatura foi usada, porém com apenas 10mg de substrato e com uma quantidade inferior de enzima, 26mg. Ainda na segunda condição foi obtido a conversão máxima do produto L-(-)-2 com 49,3% conversão e um produto opticamente puro (ee > 99), enquanto em acetato de etila apenas 30,4% foi convertido (ee> 99) e E> 100.

Os resultados relatados na literatura, como supracitados, mostram que diferentes solventes afetam a enantiosseletividade no sistema, o que foi observado neste trabalho.

A concentração do derivado de mio-inositol em CUNHA *et al.* (2010), não apresentou efeito significativo enquanto que nesta dissertação a concentração da variável substrato mostrou um efeito significativo negativo, mostrando que diferentes derivados de mio-inositol apresentam comportamentos distintos no sistema em que são empregados.

6.8.1.3. Obtenção dos valores ótimos para o planejamento

Com o objetivo de se obter exatamente os valores ótimos, a função *desirability* foi utilizada (programa *statistica*).

Quando se tem mais de uma variável de resposta, há o interesse de se colocar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam simultaneamente todos os requisitos necessários às variáveis dependentes. A busca da faixa desejável pode ser feita graficamente através da otimização, com restrição, onde métodos de programação (não lineares) são feitos (CALADO e MONTGOMERY 2003). Segundo os autores, a abordagem geral consiste primeiramente na conversão de cada resposta y1 em uma função individual: *desirability* (d_i). Esta função varia entre 0 e 1 e é interpretado da seguinte forma: caso a resposta for quela que se deseja, $d_i = 1$, porém se a reposta estiver fora da região de aceite, d_i igual a zero (0). No caso, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a *desirability* global. O *Statistica* usa esta abordagem, usada por DERRINGER e SUICH (1980). Logo, esta otimização foi feita neste trabalho.

A parte do estudo da função *desirability* pode ser visualizada na Figura 57.

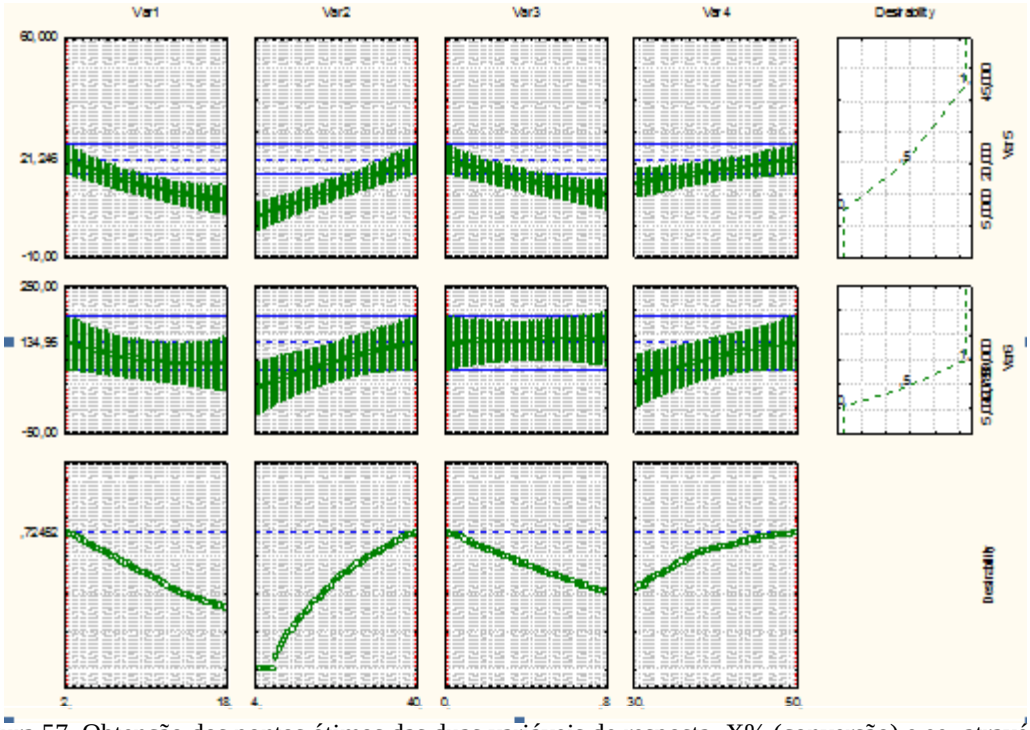


Figura 57. Obtenção dos pontos ótimos das duas variáveis de resposta, X% (conversão) e ee_p através da função *desirability* para a var1(concentração de substrato); var2 (concentração de enzima); var3 (concentração de água) e var4 (temperatura em ^oC). A aproximação da linha tracejada em azul indica os pontos ótimos.

A Figura 57 mostra os valores dos pontos ótimos das 2 variáveis de resposta: Conversão (45%- canto inferior direito) e eep (99% - canto superior direito). As condições operacionais que levam ao ótimo das respostas seriam a menor concentração de substrato (2mg/ml), a maior concentração de enzima (40mg/ml), a menor concentração de H_2O (0%

m/v) e temperatura de 50º C. A função *desirability* global foi igual a 0,724. Apesar da função *desirability* apresentar a temperatura ótima de 50º C, pode-se observar na Figura 57 que valores de temperatura acima de 40º C, igualmente se aproximam da linha tracejada que caracteriza os pontos ótimos. Logo a temperatura de 40º C foi selecionada, uma vez que temperaturas elevadas podem diminuir a atividade da enzima além de aumentarem o custo do processo.

Quanto às demais variáveis, observa-se um ponto máximo na concentração de substrato de 2mg/mL, enzima de 40mg/mL e de água de 0% m/v.

7.0 Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- A resolução de (±)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-3) foi obtida com êxito quando as lipases de *Candida antarctica* (CALB) e a de *Pseudomonas cepacia*, imobilizadas em dois diferentes suportes, foram empregadas nas reações.

- A escolha do solvente e do agente acilante afetou a enantiosseletividade da reação sendo os melhores resultados obtidos com a lipase de *Pseudomonas cepacia*, imobilizada em terra de diatomácea (PS-IM 17.763 U/g), onde se obteve a a formação de um produto inédito, L-1-O-acetil-2,3-O-ciclohexilideno-*mio*-inositol com o máximo de 48% de conversão, 98% de ee_p e E> 200 nas seguintes condições: 48h de tempo reacional, 30º C e empregando acetato de vinila como agente acilante, em sistema livre de solvente.

- Os melhores resultados obtidos com CALB (10 U/g) foram no tempo reacional de 120h, 30º C de temperatura, utilizando acetato de vinila como agente acilante, em sistema livre de solvente. Nestas condições foram obtidos 43,5% de conversão, 97,7% de eep e E > 200.

- Os melhores resultados obtidos com a lipase de *Pseudomonas cepacia*, imobilizada em cerâmica (PSC Amano II- 836U/g), foram quando TBME foi utilizado como solvente e acetato de vinila como agente acilante na reação apresentando 49,9% de conversão, ee_p de 99% e E >200. Os resultados foram obtidos em 96h e 30º C de temperatura.

As variáveis concentração de enzima, substrato e água, e ainda, a variável temperatura foram utilizadas no planejamento experimental. Os resultados demonstraram que as condições ótimas foram T = 40°C, S = 2 mg/ml, H_2O = 0% m/v e E = 40 mg/ml. Com os resultados do planejamento experimental, pôde-se utilizar as menores concentrações de substrato e água no tempo reacional de 24h.

8.0 Perspectivas Futuras

O trabalho desenvolvido nesta dissertação não encerra as possibilidades de investigações adicionais sobre o tema estudado. Pretende-se continuar os estudos dos aspectos fundamentais e tecnológicos dos processos de produção e utilização de metabólitos de origem microbiana de interesse para a indústria farmacêutica visando principalmente:

- ✓ Realizar processos de imobilização de lipases, como a LIPB (gene LIPB clonado e expressado referente a lipase B de *Candida antarctica* em *P. pastoris* – PI 0905122-8), obtidas por tecnologia de genes sintéticos sobre diferentes suportes, com o objetivo de obter um biocatalisador eficiente e inédito, tanto do ponto de vista da enzima quanto do suporte.
- ✓ Caracterizar estes biocatalisadores, obtidos por engenharia genética, visando determinar o pH e a temperatura ótimos, estabilidade em diferentes solventes e estabilidade de estocagem de modo a vislumbrar sua atuação biotecnológica posterior.
- ✓ Aplicar estes biocatalisadores em reações com substratos que possuam potencial farmacológico buscando a seleção do melhor par enzima imobilizada-substrato.
- ✓ Otimizar as reações descritas acima estabelecendo as melhores condições através do planejamento de experimentos para a otimização de processos biotecnológicos.
- ✓ Realizar experimentos em reatores com o melhor par lipase imobilizada e substrato, na condição otimizada, utilizando o reciclo de enzima nas reações.
- ✓ Buscar alternativas biotecnológicas que levem a aplicação dos produtos obtidos no setor farmacológico como testes celulares para novas drogas.

9.0 Referências Bibliográficas

ABIGOR, R.D., UADIA, P.O., FOGLIA, T.A., HAAS, M.J., JONES, K.C., OKPEFA, E., OBIBUZOR, J.U.e BAFOR, M.E. 2000. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem. Soc. Transactions.*, v. 28, p. 979-981.

ADLERCREUTZ, P. 1994. Enzyme-catalyzed lipid modification. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 12, 231-254.

ADLERCREUTZ, P. 1996. "Modes of using enzymes in organic media" In: Enzymatic reactions in organic media, Eds: Koskinen e Klibanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain.

ALMEIDA, M.V., SILVA, D.S., SOUZA, M.V.N. e BENÍCIO, A.A.A. 2003. A Cascata dos fosfoinositídeos. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 1, 105-111.

ALMEIDA, M.V. "Clonagem, Expressão, Caracterização e Modelagem Estrutural de uma Esterase Termoestável de *Pyrococcus furiosus*". Tese de doutorado, Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005. 109p.

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

ANDERSON E.M, LARSSON K.M. e KIRK O. 1998. One biocatalyst—many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransform.* 16:181–204.

ANOVÁ,C.M. e HUTTA, M. 2003. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by Liquid Chromatography. *J. Chromatog.* B, Amsterdam, v. 797, p. 91-109.

ANTHONSEN, T. e HOFF, B.H. 1998. Resolution of derivatives of 1,2 propanediol with lipase B from *Candida Antarctica*, Effect of substrate structure, medium, water activity and acyl donor on enantiomeric ratio. Chemistry and Physics of lipids 93, 199-207p.

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

AIRES-BARROS, M. R. 2002. Biocatálise em solventes orgânicos. *B.Biotecnol.*, Lisboa, n.72, p. 2-13.

BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L. e MALCATA, F. X. 1996."Bioreactors with immobilized lipases", Enzyme and Microbial Technology, v. 18, p. 392-416.

BARON, A.M. "Biocatálise em ambientes aquo-restrictos:comparação de diferentes sistemas reacionais", tese de mestrado, Universidade federal do Paraná, Curitiba. 2003.

BEN SALAH, R., ZOUARI, N., REINBOLT, J. e MEJDOUB, H., 2003. Purification of turkey pancreatic phospholipase A2. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 2139–2144.

BEVILAQUA, J. V. Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático. Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE. 2005. 1-165p.

BEVILAQUA, J.V., PINTO, J.C., LIMA, L.M., BARREIRO, E.J., ALVES, T.L.M., FREIRE, D.M.G. 2004. "Enzymatic hydrolysis by immobilized lipase applied to a new prototype anti-asthma drug", Biochemical Engineering Journal, v. 21, p. 103–110.

BILLINGTON, D.C. 1989. Recent Developments in the synthesis of *myo*-inositol phosphates. Chem. Soc. Rev. 18, 83-122.

BORNSCHEUER, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiol. Review.**, v. 733, p. 1-9.

BRADY, L., BROZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S., DODSON, E.,. DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J. P., CHRISTIANXEN, L., JUGE-JENSEN, B., ORSKOV, L. e MENGE, U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. Nature, v. 343, p. 767-770.

BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S., DODSON, G. G., LAWSON, D. M., TURKENBURG, J. P., BJORKLING, F., HUGE-JENSEN, B., PATKAR, S. A. e THIM, L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase–inhibitor complex, Nature, v. 351, p. 491–494.

BRZOZOWSKI, A.M., SAVAGE, H., VERMA, C.S., TURKENBURG, J.P., LAWSON, D.M., SVENDSEN, A. e PATKAR, S. 2000. "Structural origins of the interfacial activation in Thermomyces (Humicola) lanuginosa lipase", Biochemistry, v. 39, p. 15071–15082.

BUCALÁ, V., FORESTI, M.L., TRUBIANO, G., FERREIRA, M.L., BRIOZZO, M. e BOTTINI, S. 2006. Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions. Enzyme Microbial Technol**.,** v. 38, p. 914-920.

CAJAL, Y., SVENDSEN, A., GIRONA, V., PATKAR, S. A. and ALSINA, M. A. 2000. Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase. Biochemistry. 39:413–423.

CAJAL, Y., SVENDSEN, A., DE BOLÓS, J., PATLAR, S.A. e ALSINA, M.A. 2000b. Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic of a fungal lipase. Biochimie., 82, 1053-1061.

CALADO, V. e MONTGOMERY, D. C. 2003. Planejamento de experimentos usando o *Statistica.* Rio de Janeiro: E-papers Serviços editoriais, 260 p.

CAMMAROTA, M. C. e FREIRE, D. M. G. 2006. *A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content*. Bioresource Technology, *97*:2195-210.

CAMMAROTA, M. C., TEIXEIRA, G. A. e FREIRE, D. M. G. 2001. *Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewater with high fat content*. Biotechnology Letters, *71*:44-50.

CAREY, F. e SUNDBERG, R. 2007. Advanced Organic Chemistry: Structure and Mechanisms, 5 ed., Springer:Virginia, 1212p.

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

CASTRO-OCHOA**,** L. D., RODRÍGUEZ-GÓMEZ**,** C., VALERIO-ALFARO**,** G. **e** ROS**,** R.O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology,* v. 37 (6), 648-654p.

CAVALCANTI, E.D.C., MACIEL, F.M., VILLENEUVE, P., LAGO, R. C. A., MACHADO, O. L. e FREIRE, D.M.G. 2007. Acetone Powder from Dormant Seeds of *Ricinus communis* L.: Lipase Activity and Presence of Toxic and Allergenic Compounds. Applied Biochemistry and Biotechnology. , v.136, p.57 – 65.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.A., SILVA, P.R., RAMOS, A.P., DONATO, D.A.G. e FREIRE, D.M.G. 2011. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus*. Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. Enzyme Research, Volume 2011, Article ID 618692, 8 pages.

CHEN, C.S., FUJIMOTO, Y., GIRDAUKAS, G. e SIH, C.J. 1982.“Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enatiomers”, Journal Amerian Chemical Society, v. 104, p. 7294–7299.

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

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

CHUNG, S.K., CHANG, Y.T., LEE E. J., SHIN, B.G., KWON, Y.U., KIM K.C., LEE, D.H. e KIM, M.J. 1998. “ Syntheses of two enantiomeric pairs of *myo*-inositol(1,2,4,5,6) and (1,2,3,4,5) pentakisphosphate”, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 8, p. 1503-1506.

COFFEN, D.L., 1997. Enzyme-catalyzed reactions, in Ahuja, S. (Ed.), Chiral Separations: Applications and Technology, American Chemical Society, Washington, DC, p. 59–91.

COSTA, C. E., GIULIANO, C. C., BARCHESI, H.B., ZANOTTO, S.P., NASCIMENTO, M.G. e COMASSETO, J.V. 2004. Enzymatic resolution of (RS)-beta-hydroxy selenides in organic media. Tetrahedron : Asymmetry, v. 15, n. 24, p. 3945-3954.

COSTA, V.E.U. e AMORIN, H.L. 1999. "O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiomeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influencia do solvente", Química Nova, v. 22, n. 6, p. 863-873.

CUNHA, A.G. Resolução cinética de derivados de *mio*-inositol catalisada por lipases. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2011.140p.

CUNHA, A.G., DA SILVA, A.A.T, DA SILVA, A.J.R., TINOCO, L.W., ALMEIDA, R.V., DE ALENCASTRO, R.B., SIMAS, A.B.C. e FREIRE, D.M.G. Efficient kinetic resolution of (±)-1,2-*O*-isopropylidene-3,6-di-*O*-benzyl-*myo*-inositol with the lipase B of *Candida antarctica*. 2010. Tetrahedron: *Asymmetry*, vol 21 issue 24, p. 2899-2903.

CYGLER, M. e SCHRAG, J. D. 1997. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. Methods Enzymol, 284, part A, p. 3-27.

DEREWENDA, Z. S., DEREWENDA, U. , DODSON, G. O. 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 A resolution. J. Mol. Biol. 227:818-839.

DEREWENDA, U., SWENSON, L. GREEN, R., WEI, Y., DODSON, G.G., YAMAGUCHI, S., HAAS, M.J. e DEREWENDA, Z.S. 1994. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nat. Struc. Biol.*, 1, 36-47.

DERRINGER, G., e SUICH, R. 1980. "Simultaneous Optimization of Several Response Variables," *Journal of Quality Technology*, 12, 4, 214-219.

DESAI, T., GIGG, J., GIGG, R. e MARTIN-ZAMORA, E. 1994. The preparation of intermediates for the synthesis of lD-myo-inositol 1,4,5- and 2,4,5-trisphosphates, 1,4-bisphosphate 5-phosphorothioate, and 4,5 bisphosphate 1-phosphorothioate from lD-3,6-di-O-benzyl-l,2-O-isopropylidene-*myo*-inositol. *Carbohydrate Research*, 262, 59-77.

DESAI, T., GIGG, J., GIGG, R. e MARTIN-ZAMORA, E. 1996. The preparation of racemic and enantiomerically pure *myo*-inositol derivatives as intermediates for the synthesis of phosphatidylinositol3-, 3,4-bis-and 3,4,5-tris-phosphates and for the synthesis of analogues of lD-*myo*-inositol 1,3,4,5tetrakisphosphate. *Carbohydrate Research*, 296, 97-133.

EGGERT, T., VAN POUDEROYEN G., DIJKSTRA, B.W., JAEGER, K.E. 2001. Lipolytic enzymes LipA and LipB from Bacillus subtilis differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. FEBS Lett 502:89–92.

EGLOFF, .P., RANSAC, S., MARGUET, F., ROGALSKA, E., VAN TILBEURGH, H., BUONO, G., CAMBILLAU, C. e BERGER, R. 1995. Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In Malcata, F.X. (Ed). Engineering of/with lipases.. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

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

EMA, T., MAENO, S., TAKAYA, Y., TAKASHI, S. e UTAKA, M. 1996. Significant effect of acyl groups on enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterifications. *Tetrahedron Asym.* v.7 (3), p. 625-628.

FABER, K. 1997. Biotransformations in organic chemistry: A textbook. 3 ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft. p. 1-24.

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.

FERNANDES, M.L.M., KRIEGER, N., BARON, A.O, ZAMORA, P.P., RAMOS, L.P. e MITCHELL, D.A. 2004. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by Thermomyces lanuginosa lipase in OT/Isooctane reversed micellar system. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic., v. 30, p. 43-49.

FERNANDES, M.L.M., SAAD, E.B., MEIRA, J.A., RAMOS, L.P., MITCHELL, D.A. e KRIEGER, N.2006. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. J. *Mol. Catalysis B*: Enzymatic., v. 263, p. 8-13.

FERRABOSCHI, P., GRISENTI, P. e SANTANIELLO, E. 1990. New hemoenzymic synthesis of (R)- and (S)-4-(phenylsulfonyl)-2-methyl-1-butanol: a chiral C5 isoprenoid synthon. *J. Org. Chem*. v. *55* (25).

FITZPATRICK, P.A. e KLIBANOV, A.M. 1991. Journal American Chemical Society, v.113, p. 3166.

FORESTI, M.L. e FERREIRA, M.L. 2006. "Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications", Enzyme and Microbial Technology, v. 40 (4), p. 769-777.

FREIRE, D.M.G. e CASTILHO L. R. 2010. ENZIMAS EM BIOTECNOLOGIA: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E MERCADO. 1 prova, p. 367-383.

GARCIA, R., MARTINEZ, M. e ARACIL, J. 2002. Enzimatic esterificatioon of na acid with na epoxide using na immobilized lipase from Mucor miehei as catalyst: Optimization of the yield and isomeric excess of ester by statistical analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 28, p. 173-179.

GARCIA,Q. E., AZANZA, J.R., SÁDABA, B., MUNOZ, M.J., GIL, I. e ACMPANERO, M.A. 2007. Pharmocokinetics of tramadol enantiomers and their respective phase I metabolites in relation to CYP2D6 phenotype. *Pharmacol. Research*, v.55, p. 122-130.

GHAMGUI, H., MILED, N., ABOUNI, M.K. e GARGOURI, Y. 2007. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized Rhizopus oryzae lipase onto CaCO3: A comparative study" Biochemical Engineering Journal, v. 37 (1), p. 34-41.

GHAMGUI, H., KARRA-CHAÂBOUNI, M. e GARGOURI. 2004. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from Rhizopus oryzae: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. Enzyme Microbiol. Technol., v. 35 (4), p. 335-363.

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

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

GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, M.N., EL-AZZOUNY, A. e EL-BEHAIRY, M.F. 2010. Lipase-mediated enantioselective kinetic resolution of racemic acidic drugs in non-standard organic solvents: Direct chiral liquid chromatography monitoring and accurate determination of the enantiomeric excesses. *J. Chromatogr.* A 1217, 1063–1074.

GOFFIC F. L., BRAUN, J. e BOUSQUET, O. R. 1995. *Tetrahedron Lett.* v. *37*, p.8195.

GORMAN, L. A. e DORDICK, J. S. 1992. *Biotechnol. Bioeng.* v. *39*, p.392.

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

GOTOR, V. F., BRIEVA, R. e GOTOR, V. 2006. “Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 40, p. 111-129.

GROCHULSKI, P., BOUTHILLIER, F., KAZLAUSKAS, R.J., SERREQI, A.N., SCHRAG, J.D., ZIOMEK, E. e CYGLER, M. 1994. “Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase”, Biochemistry, v. 33, p. 3494–3500.

GROENER, J.E.M., BAX, W., STUANI C. e PAGANI, F. 2000. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 27, p. 155-162

HADFIELD, T. M., COTE, G. L. e HARIBANSH, K. S., *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1353,

HALLING, P.J. 2003. Protein Structure and Molecular. *Biochimica et Biophysica Acta*. Enzymology, v. 1040 (2), p. 225-228.

HASAN, F., SHAH, A. A. e HAMEED, A. 2006. “Industrial applications of microbial lipases”, Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p. 235-251.

HASAN, F., SHAH, A. A. e HAMEED, A. 2006. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251.

HELLYER, S. A., CHANDLER, I. C. e BOSLEY, J. A., Can the Fatty Acid Selectivity of Plant Lipases be Predicted from the Composition of the Seed Triglyceride? Biochemica et Biophysica Acta, 1440, No. 2-3, 215 (1999).

HIDE, W., CHAN, L. e LI, W. 1992. *J. Lipid. Res*., v. 33, p. 167-178.

HOF, R.P. e KELLOGG, R.M. 1996. Lipase AKG mediated resolutions of a,a-disubstituted 1,2-diols in organic solvents: Remarkably high regio- and enantio-selectivity. Perkin Trans. 1, 2051–2060.

HOFF, B.H., ANTHONSEN, H.W. e ANTHONSEN, T., 1996b. The enantiomer ratio strongly depends on the alkyl part of the acyl donor in transesterification with lipase B from Candida antarctica. *Tetrahedron: Asymmetry* 7, 3187–3192.

HOLMQUIST, M., CLAUSEN, I.G., PETKAR, S., SVENDSEN, A. e HULT, K. 1995. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of Humicola lanuginosa lipase through transesterification reactions in organic solvent. *J. Protein. Chem*. 14, 217-224.

HSU, AN-FEI., JONES, K.C., FOGLIA, T.A. e MARMER, W.N. 2004. Transesterification activity of lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. Biotechnol. Letters., v. 26, p. 917-921.

IJIRO, K., HATANO, A. e OKAHATA, Y. 1995. Enhancing enantioselectivity of a lipid-coated lipase via imprinting methods for esterification in organic solvents Tetrahedron Asym. v. 6 (6), 1311-1322.

ILLANES, A. 1994. “Biotecnologia de enzimas“, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile.

ISO, M., CHEN, B., EGUCHI, M., KUDO T. e SHRESTHA, S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.16, p.53–58.

JAEGER, K. E. e EGGERT, T. 2002. Lipases for biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol., 13, 390-397.

JAEGER, K.E., SCHNEIDER, B., ROSENAU, F., WERNER, M., LANG, D., DIJKSTRA, B.W. e REETZ, M.T. 1997. Bacterial lipases for biotechnological applications. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic., v. 3, p. 3–12.

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

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

KAZLAUSKAS, R., WEISSFLOCH, A.N.E., RAPPAPORT, A.T. e CUCCIA, L.A. 1991. 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.

KIM, K. K., SONG, H. K., SHIN, D. H., HWANG, K. Y. e SUH, S. W. 1997. The Crystal Structure of a Triacylglycerol Lipase from Pseudomonas cepacia Reveals a Highly Open Conformation in the Absence on a bound Inhibitor. Structure, 5, 173-185.

KINOSHITA, M. e OHNO, A. 1996. Factors influencing enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis. Tetrahedron, v. 52 (15), p. 5397-5406.

KIRK, O, BORCHERT T.V. e FUGLSANG C.C. 2002. Industrial Enzymes applications. Current Op. Biotechnol., v. 13, p.345–351.

KISS, V., EGRI, G, BÁLINT, J., LING, I., BARKÓCZ, J. e FOGASSY, E. 2006. “Kinetic and chemical resolution of different 1-phenyl-2-propanol derivatives”, *Tetrahedron Asymmetry*, v. 17, p. 2220–2234.

KOTIK M., BRICHAC J. e KYSLÍK P. 2005. Novel microbial epoxide hydrolases for biohydrolysis of glycidyl derivatives. *J Biotechnol*., v. 120, p. 364–375.

KOZIKOVSKI, A. P., FAUQ, A. H., POWIS, G. e MELDER, D. C. 1990. *J. Am. Chem*. Soc. v. 112, p. 4528-4531.

KRIEGER, N., BHATNAGAR, T., BARATTI, J.C., BARON, A.M., LIMA, V.M.G. e MITCHELL, D. 2004. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. Food *Technol. Biotechnol*., v. 42 (4), p.279–286.

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

LAUMEN, K. e GHISALBA, O. 1994. “Preparative-scale chemo-enzymatic synthesis of optically pure D-*myo*-inositol-1-phosphate., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 58, p. 2046-2049.

LAUMEN, K. e GHISALBA, O. 1999. “Chemo-enzymatic synthesis of both enantiomers of mio-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, p. 1374-1377.

LAWSON, D. M., BRZOZWSKI, A. M., RETY, S., VERMA, C. e DODSON, G. G. 1994. Probing the nature of substrate binding in Humicola lanuginosa lipase through X-ray crystallography and intuitive modeling. *Protein Eng*. v.7, p.543-550.

LEAL, M.C.C.R., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.M.G. e SANT’ANNA Jr., G.L. 2002. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. Brazilian *J. Chemical Eng*., v. 19 (2).

LEAL, M. C. M. R., FREIRE, D. M. G., CAMMAROTA, M. C. e SANT'ANNA Jr., G. L. 2006. *Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater*. Process Biochemistry, v. 41, p.1173-1178.

LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. e SCHMIDELL, W. 2001. "Biotecnologia Industrial", v. 1, 1ª ed.

LING, L., WATANABE, Y., AKIYAMA, T. e OZAKI, S. 1992. A new efficient method for resolution of myo-inositol derivatives by enzyme catalyzed regio- and enantio-selective esterification in organic solvent. *Tetrahedron Lett*. 33, 1911-1914.

LIU, B.K., QIAN, X.Q., WU, Q. e LIN, X.F. 2008. Two lipase-catalyzed sequential synthesis of drug derivatives in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, v. 43 p. 375–380.

LIU, Y.; WANG, F. e 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).

LIU Y, WANG F, TAN T. 2009. Cyclic resolution of racemic ibuprofen via coupled efficient lipase and acid-base catalysis. Chirality 21 (3):349–353.

LOTTI, M., JAEGER, K.E., PULS, M. e EGGERT, T. 2006. 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.

MACHADO, T.M., ROY, M. e JESUS, P.C. 2009. Avaliação do Efeito do Solvente na Transesterificação do Acetato de Vinila com 1-Feniletanol Catalisada por Diferentes Lipases. XVII Encontro de Química da Região Sul (17SBQSul), FURG.

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

MARTINS, M.P. 2008. Biotransformação de epóxidos com fungos de origem marinha. Dissertação, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Paulo. 75p.

MILED, N., CANAAN, S., DUPUIS, L., ROUSSEL, A., RIVIÈRE, M., CARRIÈRE**,** F., DE CARO, A., CAMBILLAU, C. e VERGER, R. 2000. Digestive lipases: From three-imensional structure to physiology. Review article. *Biochimie***.**, v. 82, p. 973-986.

MILLS S.J. e POTTER B.V.L. 1996. Synthesis of D- and L-*myo*-Inositol 1,4,6-Trisphosphate, Regioisomers of a Ubiquitous Second Messenger. *J. Org. Chem*. v. 61, n 25, 8980-8987.

MILLS, S. J., LIU, C. e POTTER, B. V. L. 2002. Synthesis of D- and L-*myo*-inositol 2,4,5-triphosphate and triphosphorothioate: structural analogues of D-*myo*-inositol 1,4,5-triphosphate. *Carbohydr. Res*. v. 337, 1795-1801.

MONTGOMERY, D.C. e RUNGER, G.C. 2003. Estatística Aplicada e probabilidade para engenheiros.Segunda edição. LTC editora. S.A. 463p.

MONTGOMERY, D.C. 2001. Design and Analysis of Experiments. 5aedição. John Wiley & Sons, I.N.C. New York Chechester Weinheim Brisbane Toronto Singapura. 680p.

MUKHERJEE, K. D. 1994. Plant lipases and their application in lipid biotransformations. *Prog. Lipid Res. 33* (1-2), 165-174.

MUKHERJEE, M. 2003. Human digestive and metabolic lipases—a brief review J. *Mol. Catalysis B: Enzymatic*., v.22, p. 369–376.

MUKHERJEE, M. 2003. Human digestive and metabolic lipases—a brief review *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*., v.22, p. 369–376.

MUTTER, M. 1985. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* v**.** *24*, p.639.

NAKAMURA, K., TAKEBE, Y., KITAYAMA, T. e OHNO. 1991. A. Effect of solvent structure on enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterfication. Tetrahedron, 32, 4941-4944.

NINI, L., SARDA, L., LOUIS-CLAUDE, C., BOITARD, E., JEAN-PAUL, DD. e CHAHINIAN. 2001. H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta*., 1534, 34-44.

OLIVEIRA, M.M. e EINICKER-LAMAS, M., 2000. Inositol metabolism in Trypanosoma cruzi: potential target for chemotherapy against Chagas' disease. Annals of the Brazilian Academy of Science 72, 413–419.

OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S.M., HAREL, M., REMINGTON, S.J., SILMAN, I., SCHRAG, J., SUSSMAN, J.L., VERSCHUEREN, K.H.G. e GOLDMAN, A. 1992. The α/β hidrolase fold. *Protein Eng*., v. 5, p. 197-211.

OSÓRIO, N.M., FERREIRA-DIAS, S., GUSMÃO, J.H. e FONSECA, M.M.R. 2001. "Response surface modelling of the production of v-3 polyunsaturated fatty acidsenriched fats by a commercial immobilized lipase", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.11, p. 677–686.

OESTREICHER, E.G., PINTO, G.F. e ANTUNES, O.A.C. 2001. Cadernos didáticos de pós graduação. Catálise Assimétrica. Editor Angelo C. Pinto. Setor Científico Cultural Intituto de Química-UFRJ. Vol 2., 1-114p.

OTTOLINA, G., CARREA, G., COLONNA, S. e RÜCKEMANN. 1996. A predictive active site model for cyclohexanone monooxygenase catalyzed Baeyer-Villiger oxidations Tetrahedron Asym. v.7 (4), 1123-1133.

PAIVA, A. L., BALCÃO, V. M. e MALCATA, F. X. 2000. "Kinetics and mechanics of reactions catalyzed by immobilized lipases", Enzyme and Microbial Technology, v. 27, p. 187-204.

PALOCCI, C., FIORILLO, F. e MONACHE, D. 2003. Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia latex*. *Plant Sci*., v. 165, p. 577– 582.

PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., KRIEGER, N., SOCCOL, V. T. 1999. “The realm of microbial lipases in biotechnology”, Applied Biotechnology Biochemistry, v. 29, p. 119-131.

PENCREACH, G. e BARATTI, J. C. 1997. 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.

PLEISS, J., FISCHER, M. e SCHMID, R.D. 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding Site. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93 p. 67–80.

POTTER, B. V. L. e LAMPE, D. 1995. Chemistry of Inositol Lipid Mediated Cellular Signaling. Angew. Chem., Int. Ed. v. 34 (18), p. 1933–1972.

POUDEROYEN, G.V., THORSTEN, E., JAEGER, K.E. e DIJKSTRA, B.W. 2001. “The Crystal Structure of Bacillus subtilis Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme”, J. Mol. Biol., v. 309, p. 215-226.

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

RATHI, P., BRADOO, S., SAXENA, R.K. e GUPTA, R. 2000. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. Biotechnol. Letters., v. 22, p. 495-498.

RATHI, P., SAXENA, R.K. e GUPTA, R. 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. Process Biochem., v. 37, p. 187-192.

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

REETZ, M. T. e JAEGER, K. E. 1998. Overexpression, immobilization and biotechnological application of Pseudomonas lipases. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93 (1-2), p. 3-14.

RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. 2005. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Editora Casa do Pão, Campinas. 325p.

ROMERO, M.D., CALVO, L., ALBA, C., HABULIN, M., PRIMOZIC, M. e KENS, Z. 2005. Enzymatic synthesis 115 of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. J.Supercritical Fluids., v. 33, p. 77-84.

ROUSSEL, A., MILED, N., BERTI-DUPUIS, L., RIVIERE, M., SPINELLI, S., BERNA, P., GRUBER, V., VERGER, R. e CAMBILLAU, C. 2002. "Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor", *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 2266–2274.

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

SAKURAI, T., MARGOLIN, A. L., RUSSEL, A. J. e KLIBANOV, A. M. 1988. Control of enzyme enatioselectivity by the reaction medium. *J. Am. Chem. Soc*., 110, 7236-7237.

SALIS, A. 2003. Characterisation of Accurel MP 1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. *J. Mol. Catalalysis B: Enzymatic*., v. 24-25, p. 75-82.

SALIS, A., PINA, M., MONDUZZI, M. e SOLINAS, V. 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J. Biotechnol*., v. 119, p. 291-299.

SANTANIELLO, E., FERRABOSACHI, P., GRISENTI, P. e MANZOCCHI, A. 1992. The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. *Chem. Rev*., ***92***, 1071-1140.

SARDA, L. e DESNUELE, P. 1958. "Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion", Biochimica et Biophysica Acta, v. 58, p. 513-521.

SAXENA, R. K., GHOSH, P. K. e GUPTA, R. 1999. “Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry”, Current Science, v. 77, p. 101-115.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. Ser-His-Glul triad form the catalytic site of the lipase from the catalytic site of the lipase from Geotrichum candidum. Nature, 351, 761-764, 1991

SCHRAG, J. D., Li Y., CYGLER, M., LANG, D., BURGDORF, T., HECHT H.J., SCHMID, R., SCHOMBURG, D., RYDEL, T.J., OLIVER, J.D., STRICKLAND, L.C., DUNAWAY, C.M., LARSON, S.B., DAY, J., MCPHERSON, A. 1997. The open conformation of a Pseudomonas lipase. Structure, v. 5: 2, p. 187–202.

SCHRAG, J. e CYGLER, M. 1997. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases Methods Enzymol. v. 284, p.3-27.

SCHEDLER D.J.A e BAKER D.C. 2004. Fluorinated cyclitols as useful biological probes of phosphatidyeinositol metabolism. *Carbohyd. Res. 339*: 1585-1595.

SECUNDO, F., CARREA, G., TARABIONO, C., GATTI-LAFRANCONI, P., BROCCA, S., SECUNDO, F., RIVA, S. e CARREA, G. 1992. Effect of medium and reaction conditions on the enatioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales. Tetrahedron Asymmetry, 3, 267-280.

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

SHARMA, R., CHISTI, Y. e BANERJEE, U.C. 2001. “Production, purification, characterization and applications of lipases”, Biotechnology Advanced, v. 19, p. 627– 662.

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

SHIMADA, Y., WATANABE, H., SUGIHARA, A. e TOMINAGA, Y., 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catal. B: Enzym*. v. 17, p. 133–142.

SIH, C.J. e CHEN, C.S. 1989. Aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., v. 28, p. 695-707.

SIH, C.J., GIRDAUKAS, G., FUJIMOTO, Y. e CHEN, C.S. 1982. Quantitative analyses of biochemical Kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc*. v. 104, p. 7294.

SIH, C.J. e WU, S.H. 1989. Resolution of enatiomers via biocatalysis. Topics Sterochem., v. 19, p. 63-125.

SILVA, M.A.M., MEDEIROS, V.C., LANGONE, PEREIRA, M.A. e FREIRE, D.M.G. 2003. Synthesis of Monocaprin Catalyzed by Lipase. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.105, p.757 - 767.

SILVA., MITIDIERI, S., SCHRANK, A. e VAINSTEIN, M.H. 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Process Biochem., v. 40, p. 321- 326.

SIMAS, A.B.C., DA SILVA, A.A.T., CUNHA, A.G., ASSUMPÇÃO, R., HOELZ, L., NEVES, B., GALVÃO, T.C., ALMEIDA, R.V., ALBUQUERQUE, M.G., FREIRE, D.M.G. e DE ALENCASTRO, R.B. 2011. Kinetic Resolution of (±)-1,2-O-isopropylidene-3,6-di-O-benzyl-*myo*-inositol by Lipases: An Experimental and Theoretical Study on the Reaction of a Key Precursor of Chiral Inositols. *Journal of Molecular Catalysis B*, v. 21 (24), p. 2899-2903.

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

SOUSA, J., CAVALCANTI, E.D.C., ARANDA, D.A.G. e FREIRE, D.M.G. 2010. Application of lipase from the physic nut (Jatropha curcas L.) to a new hybrid

(enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production.. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic v. 65, p. 133–137.

SQUIRE, T.L.; LOWE, M.E.; BAUER, V.W. e ANDREWS, M.T. Pancreatic triacylglycerol lipase in a hibernating mamal. II Cold adapted function and differential expression. *Physiological Genomics.*, v.16, p. 131-140, 2003.

STECHER, H. e FABER, K. 1997. Biocatalytic Deracemization Techniques: Dynamic Resolutions and Stereoinversions. *Synthesis*, 1-16.

STEINER, J.M. e WILLIAMS, D.A. 2002. Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochimie*., v. 84, p. 1245-1253.

STEINER, J.M., WILSON, B.G. e WILLIAMS, D.A. 2003. Purification and partial characterization of feline classical pancreatic lipase. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*., v.134, p. 151-159.

STOKES, T.M. e OEHLSCHLAGER, A.C., 1987. Enzyme reactions in apolar solvents: the resolution of (9)-sulcatol with porcine pancreatic lipase. *Tetrahedron Lett*. v. 28, p.2091–2094.

SURESHAN, K. M., SHASHIDHAR, M. S. e PRAVEEN, T., Das, T. 2003. Regioselective Protection and Deprotection of Inositol Hydroxyl Groups. *Chem. Rev*. v. 103, p. 4477-4503.

SVENSSON, I., WEHTJE, E., ADLERCREUTZ , P. e MATTIASSON, B. 2004. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44 (5), p. 549-556.

TAWAKI, S. e KLIBANOV, A. M. 1992. Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent. J. Am. Chem. Soc., v. 114, p. 1882-1884.

THEIL, F. 1995. Lipase-Supported Synthesis of Biologically Active Compounds. Chem. Rev., v. 95, p. 2203-2227.

TRUBIANO, G. D., BORIO, e FERREIRA, M.L. 2004. Ethyl Oleate Synthesis Using *Candida rugosa* Lipase in a Solvent-Free System. Role of Hydrophobic Interactions Biomacromolecules, v. 5, p. 1832-1840.

UNDURRAGA, D., MARKOVITS, A. e ERAZO, S. 2001. Cocoa butter equivalent through enzymatic esterification of palm oil midfraction. *Process Biochem*., v. 36, p. 933-939.

UPPENBERGER, J., HANSEN, M.T., PATKAR, S. e JONES, T.A. 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase-B from *Candida antarctica*. *Structure*., v. 2, p. 453-454.

VAGANAY, S., JOLIFF, G., BERTAUX, O., TOSELLI, E., DEVIGNES, M.D. e BÉNICOURT, C. 1998. The complete cDNA sequence encoding dog gastric lipase. v. 8 (4), p.257-262.

VALIVETY, R. H., HALLING, P. J. e MACRAE, A. R. 1992a. Reaction rate with lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents, Biochim. Biophys. Acta 1118, p. 218–222.

VALIVETY, R. H., HALLING, P. J., PEILOW, A. D. e MACRAE, A. R. 1992b. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity, Biochim. Biophys. Acta 1122, p. 143–146.

VALIVETY, R. H., HALLING, P. J. e MACRAE, A. R. 1992c. *Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0. 0001, FEBS Lett. 301, p. 258–260.

VALLIKIVI, I., LILLE U., LOOKENE, A., METSALA, A., SIKK, P., TÕUGUB, V., VIJA, H., VILLO, L. e PARVE, O. 2003. Lipase action on some non-triglyceride substrates. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 22, 279–298.

VAN DYCK, S.M.O., LEMIERE, G.L.F., JONCKERS, T.H.M., DOMMISSE, R., PIETERS, L. e BUSS, V. 2001. Kinetic resolution of a dihydrobenzofuran-type neoligan by lipasecatalysed acetylation. *Tetrahedrom: Asymmetry*., v. 12, p. 785-789.

VERGER, R. 1997. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trens Biotechnol.*, v. 15, 32-38.

VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J.M., GRAILLE, J. e HAAS, M.J. 2000. "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approches", *Journal of Molecular Catalysis B:* Enzymatic, v. 9, p. 113-148.

VOLPATO, G., RODRIGUES, R. C., HECK, J. X. e AYUB, M. A. Z. 2008. Production of organic solvent tolerant lípase by *Staphylococcus caseolyticus* EX 17 using raw glycerol as substrate. J Chem Technol Biotechnol 83: 821-828.

WAKABAYASHI, H., WAKABAYASHI, M., EISENREICH,W. e ENGEL, K.H. 2003. Stereoselectivity of the Generation of 3-Mercaptohexanal and 3-Mercaptohexanol by Lipase-Catalyzed Hydrolysis of 3-Acetylthioesters *J. Agric. Food Chem.*, v. 51 (15), p 4349–4355.

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

WILKINSON B. e BACHMANN, B.O. 2006. Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration. *Curr Opin Chem Biol* v. 10, p. 169-176.

YANG e RUSSEL. 1996. "Fundamentals of non-aqueous enzymology" Enzymatic reactions in organic media, Eds: Koskinen e Klibanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain.

YAO, C. e KOËLLER, W. 1994. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Cloning and sequence analysis of a cutinase gene from Alternaria brassicicola. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. v. 44, p. 81-92.

YAQBOOB, M., NABI, A. e MASSOM-YASINZAI, M. 1999. Bovine pancreatic lipase: Purification and applications in immobilized form for transesterification reactions. *J. Chem. Society of Pakistan.***,** v.21, p. 114-119.

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

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

ZHANG, J., HOU, Z., YAO, C. e YU, Y. 2002. Purification and properties of a lipase from a Bacillus strain for catalytic resolution of (R)-Naproxen. J. Mol. Catalalysis B: Enzymatic., v. 18, p. 205-214.

ZHOU R. e XU J.H. 2005. Enantioselective synthesis of (*S*)-α-cyano-3-phenoxybenzyl alcohol by lipase-catalysed alcoholysis of racemic ester in organic medium.*Biochemical Engeneering*, v. 23, p. 11-15.

ZIMMERMANN, A. 2005. Aplicação de resolução enzimática na síntese estereosseletiva de feromônios de agregação de insetos-praga de palmáceas. Dissertação, Universidade Federal do Paraná. p. 1-118.