

Neide Queiroz\* e Maria da Graça Nascimento\*\*

Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-900 - Florianópolis - SC

Recebido em 1/4/98; aceito em 12/8/98

**ORGANO-GEL OF HEPTANE: PHASES DIAGRAM AND SYNTHETIC APPLICATIONS. The phase diagram formation of microemulsion-based gels composed of an anionic surfactant aerosol-OT sodium bis (2-ethylhexyl)-sulphosuccinate, water, gelatin and an organic solvent is presented for heptane. The stability of this organo-gel, when an enzyme is immobilized is discussed in terms of its reutilization in various esters synthesis.**

**Keywords: microemulsion-based gels; phase diagram; enzyme immobilization.**

## INTRODUÇÃO

As enzimas são empregadas como catalisadores em muitos processos sintéticos em meio aquoso, mas o uso é restrito pela baixa solubilidade em água de substratos e produtos<sup>1</sup>. Este problema pode ser solucionado imobilizando a enzima em suportes, permitindo assim sua aplicação em meio orgânico. Existem diferentes métodos para realizar conversões enzimáticas em solventes orgânicos<sup>2-3</sup>. Enzimas solubilizadas em microemulsão água em óleo<sup>4-6</sup> ou em organo-gel têm sido amplamente investigadas do ponto de vista quantitativo<sup>7-11</sup>.

As microemulsões água em óleo são fluidas sob condições normais, e consistem de gotas esféricas de água de dimensões nanométricas polidispersas em um meio contendo óleo, estabilizadas por uma monocamada de surfactante na interface água-óleo. São termodinamicamente estáveis e podem ser formadas apenas com a mistura de seus componentes<sup>12</sup>.

O organo-gel ou MBG do inglês, microemulsion based gels, é formado pela solubilização de gelatina em uma microemulsão água em óleo, para a formação de géis transparentes<sup>13-14</sup>. A formação do organo-gel foi primeiramente descrita em 1986,<sup>15-16</sup> e sua caracterização física/estrutural tem sido alvo de vários estudos<sup>17-21</sup>.

As mudanças que ocorrem na estrutura do organo-gel variam de acordo com a quantidade de seus componentes (água, óleo, surfactante e gelatina), permitindo obter diagramas de fases, também conhecidos como "regiões de estabilidade". Estes, por sua vez, possibilitam estudar a relação dos componentes do organo-gel no processo de gelatinização, para se obter organo-géis com rigidez e estabilidade diversas<sup>22</sup>.

Este artigo, mostra o diagrama de fases para um organo-gel de heptano, sua eficiência como suporte para a imobilização de palatase M e sua estabilidade em sucessivas sínteses do laurato de 1-pentila.

## EXPERIMENTAL

### Materiais

A enzima utilizada neste trabalho foi palatase M 1000L (Novo Nordisk A/S), com atividade de 1000 LU/g (*LU é a quantidade de enzima que libera um micromol de ácido butírico por minuto a partir de tributirina, em pH = 7,0, T = 30 °C, 4,8 % (w/v) de tributirina e 0,0095% (w/v) de goma arábica*).

O surfactante di-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (Aerosol-OT, AOT) (D-0885 lote 120H0456) e gelatina em pó (tipo A: Bloom 300) usados na preparação do organo-gel foram obtidos da Sigma. Os solventes e os reagentes (grau analítico) foram obtidos das seguintes fontes: Merck (ácido láurico), Grupo Química (heptano, hexano), Vetec (1-pentanol). A sílica para coluna (28-200 mesh) foi da Sigma e a sílica para cromatografia de camada delgada (5-25  $\mu$ ) da Aldrich.

### Preparação do organo-gel

O procedimento geral para a preparação do organo-gel consistiu no seguinte: a gelatina foi misturada com água a temperatura ambiente e aquecida à 55 °C para dissolver, até a obtenção de uma solução homogênea. Uma solução de AOT em solvente orgânico (solução micelar) foi preparada e colocada para estabilizar termicamente a 55 °C. Esta solução foi posteriormente adicionada à solução de gelatina e a mistura agitada vigorosamente até a homogeneização, podendo-se obter uma solução micelar ou organo-gel, dependendo da composição do sistema<sup>9</sup>.

### Construção do diagrama de fases

Para a construção do diagrama de fases foram preparados vários sistemas, onde a concentração de AOT foi mantida constante em 0,15 mol/L e variou-se a quantidade de gelatina e de água no sistema. A relação entre o conteúdo de água e a concentração do surfactante ( $W_0$ ) é definido como  $[H_2O]/[AOT]$ <sup>9</sup>. A concentração de AOT 0,15 mol/L foi obtida adicionando-se 3,0 mL de AOT 0,5 mol/L em quantidade necessária para completar o volume final de 10 mL (gelatina, água, AOT e solvente), conforme o valor de  $W_0$  estipulado. Os valores de  $W_0$  estudados foram de 10 a 75 para permitir o cálculo da quantidade de água necessária para cada  $W_0$ .

O aspecto macroscópico dos organo-géis foi analisado visualmente, depois de 24 horas em repouso a temperatura ambiente. Os resultados foram colocados em um gráfico como percentual de gelatina em função do  $W_0$ , a partir do qual as áreas de diferentes fases do organo-gel foram delimitadas.

### Preparação do organo-gel para aplicações sintéticas

Após o estudo com diferentes organo-géis, chegou-se a uma composição adequada para utilizar este sistema em sínteses orgânicas. A composição típica que formou organo-géis firmes e estáveis, utilizada nos experimentos foi a seguinte: 1,4 g de gelatina, 2,0 mL de água, 2,1 mL de heptano, 4,0 mL de AOT

\* e-mail: nqueiroz@hotmail.com

\*\*e-mail: graca@qmc.ufsc.br

0,5 mol/L e a solução de enzima (12 a 60 mg/mL), sendo esta injetada na solução micelar. A preparação destes organo-géis foi idêntica ao procedimento descrito anteriormente. Após estabilização a temperatura ambiente, os organo-géis foram armazenados em "freezer" a -20 °C, até sua posterior utilização nas reações. O organo-gel (10 mL) foi cortado em  $\pm 60$  seções de tamanho regulares. Em seguida, o mesmo foi colocado em um erlenmeyer contendo 30 mL de hexano. Os reagentes (ácido e álcool) foram adicionados na proporção 1:1 (0,005 moles). O sistema foi deixado sob agitação suave (agitador Dubnoff com banho termostatizado), por **4 e 6 horas** para ocorrer a reação. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada, usando como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila (8:2). Ao término da reação, os produtos e substratos remanescentes foram separados do gel, através de decantação, sendo este lavado várias vezes com o hexano para remover os reagentes e os produtos. Os rendimentos dos produtos foram estimados por análise quantitativa através do espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

Uma reação controle foi executada paralelamente, utilizando um gel com as mesmas características em termos de sua composição, apenas sem a enzima.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na delimitação das áreas do diagrama de fases do organo-gel de heptano 250 sistemas foram preparados com quantidades diferentes de gelatina, heptano e água, fixando a concentração de AOT em 0,15 mol/L. A avaliação visual, a temperatura ambiente, de cada organo-gel possibilitou distinguir três regiões diferentes, através do diagrama que foi obtido pelo gráfico, concentração de gelatina no meio (expressada em % de gelatina no volume da solução) versus  $W_0$  (Figura 1).

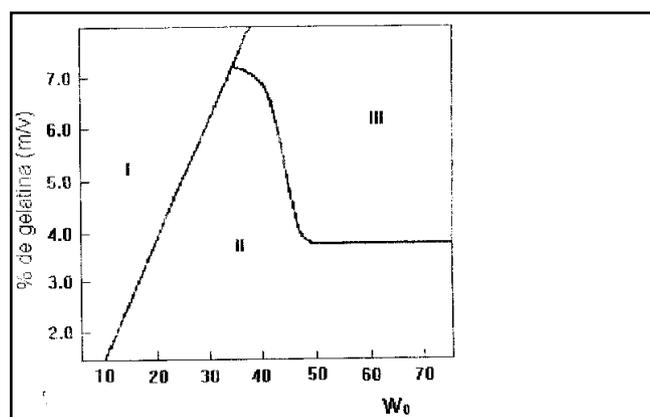


Figura 1. Diagrama de fases para o organo-gel de heptano.

A construção do diagrama de fases foi realizada com bases nos resultados que foram obtidos visualmente. Portanto, erros podem ocorrer já que cada observador pode definir um critério para separar as diferentes regiões. Neste trabalho considerou-se como solução micelar todo sistema que fluía, tomando a forma do tubo de ensaio e organo-gel o que não fluía, após um período de 24 horas.

As diferentes regiões distinguidas macroscopicamente consistem em:

- região de separação de fases: onde toda ou parte da gelatina em forma de pó não pode ser solubilizada (I).
- região líquida: solução líquida opticamente clara ou solução micelar (II).
- região sólida: organo-gel (III).

Na região I toda ou parte da gelatina não pode ser solubilizada

pela água e pela solução de AOT + heptano, formando um sistema com duas fases. A concentração de AOT foi mantida constante, portanto o aumento de  $W_0$  está relacionado diretamente com o aumento de água no sistema. Para as diferentes concentrações usadas de gelatina, não é possível formar organo-gel com um valor de  $W_0$  menor do que 35, para  $[\text{AOT}] = 0,15$  mol/L. A linha que separa a região I das demais, possui uma inclinação que mostra a relação entre o aumento da quantidade de gelatina e o aumento da quantidade de água. A medida que aumenta a concentração de gelatina, mais água é necessária para solubilizar o agente gelificante. Assim, tem-se um resultado diferente para cada valor de  $W_0$ . Por exemplo, fixando  $W_0$  em 20 pode-se observar que com 2,0 a ~3,5 % de gelatina ocorre a formação de uma solução micelar, enquanto que acima destas concentrações, ocorre a separação de fases. A região I mostra que para 8,0 % de gelatina é necessário trabalhar com  $W_0$  maior do que 40 para ocorrer mudança de fase e formar o organo-gel.

Na região II tem-se a formação de uma solução líquida opticamente clara, denominada de solução micelar. Aqui as concentrações dos componentes são suficientes para formar um sistema de uma única fase, com quantidades de gelatina que variam de 1,5 a 6,8 % (m/V), numa faixa de  $W_0$  de 10 a 75. A observação desta região possibilitou mostrar que a concentração de gelatina não influencia totalmente no processo de gelatinização e sim o conjunto de seus componentes. Por exemplo, fixando a gelatina em 6,0 %, observa-se que em  $W_0 = 40$  tem-se uma solução micelar e com  $W_0 = 50$  a formação do organo-gel. Este fato demonstra que a quantidade de água e solvente orgânico do sistema, também são fatores importantes no processo de gelatinização.

Na região III ocorre a formação do organo-gel transparente, onde os componentes estão em equilíbrio, formando um sistema de uma fase contínua e sólida. A formação do organo-gel ocorre numa quantidade de gelatina acima de 3,8 % e  $W_0$  acima de 35. Abaixo destes valores têm-se a formação das outras regiões.

Dos diagramas de fases encontrados na literatura,<sup>13,23</sup> somente o diagrama de fases com iso-octano foi realizado com uma concentração de AOT próxima a desenvolvida neste trabalho, concentração de AOT = 0,14 mol/L. Neste diagrama,<sup>13</sup> Luisi e colaboradores mostraram a existência de quatro regiões distintas nos seus experimentos,  $[\text{AOT}] = 0,1$  e 0,14 mol/L. A distribuição das diversas regiões do organo-gel de iso-octano são diferentes das regiões do diagrama de fase do organo-gel de heptano. Através dos diagramas de fase do organo-gel de iso-octano pode-se comparar o efeito da concentração do surfactante, AOT. Observa-se que aumentando a concentração de AOT, ocorre um aumento na área que forma o gel<sup>13</sup>.

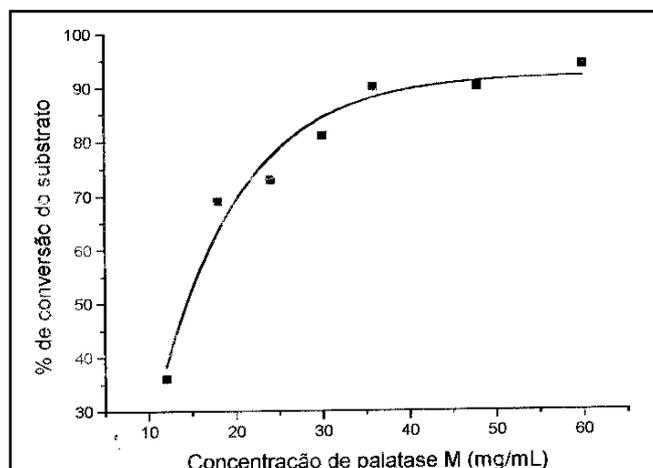
Para o diagrama de fases do organo-gel de iso-octano com AOT 0,14 mol/L, a formação do gel ocorre com um valor mínimo de  $W_0 = 25$  e 8,0 % de gelatina, enquanto que no diagrama de fases do organo-gel de heptano é necessário no mínimo  $W_0 = 35$  e 7,2% de gelatina.

Comparando os diagramas de fases de organo-géis, a saber os de hexano,<sup>23</sup> ciclo-hexano,<sup>23</sup> iso-octano<sup>13</sup> e heptano, independente do solvente orgânico a sua formação depende do ajustamento das quantidades de seus componentes (água, AOT, solvente orgânico e gelatina). As condições de equilíbrio entre esses componentes variam de um solvente para o outro. Levando-se em conta que os diagramas foram construídos com uma concentração diferente de AOT, a análise comparativa limitou-se em observar o número de regiões formadas para cada solvente. No diagrama de fases para o organo-gel de heptano, não foi observado nas condições experimentais utilizadas, a formação da região onde o gel separa-se da solução micelar, região esta observada com os outros solventes. Com relação ao diagrama de fases de iso-octano um fator que pode ser ressaltado, é que esta região somente se forma acima de 8,0 % de gelatina, sendo que este diagrama foi construído até 15 % do

agente gelificante e o diagrama de heptano construído até 8,0 %. Estes dados indicam que aumentando a quantidade de gelatina, provavelmente seria observada a formação da região de separação de fases, onde o organo-gel separa-se da solução micelar para o diagrama de fases do organo-gel de heptano.

### Aplicações Sintéticas: palatase M imobilizada em MBG de heptano

A enzima usada neste trabalho foi palatase **M**, uma lipase fúngica, produzida mediante a fermentação de uma cepa selecionada do fungo de *Mucor miehei*. Primeiramente, verificou-se o efeito da concentração de palatase **M**, imobilizada em organo-gel de heptano, através da síntese do laurato de 1-pentila, analisando qual concentração que forma o éster com maior rendimento. Após 4 horas, a 25 °C, observou-se um aumento do rendimento em éster a medida que aumenta a concentração de enzima (12 a 60 mg/mL). Porém acima de 36 mg/mL verifica-se que o rendimento é aproximadamente o mesmo (90-94%), Figura 2. A partir da análise destes resultados, verifica-se que a melhor quantidade de enzima para ser usada como catalisador em reações deste tipo é acima de 36 mg/mL. Por razões de ordem prática, utilizou-se 60 mg/mL de enzima no estudo da reutilização do organo-gel de heptano contendo palatase **M**.



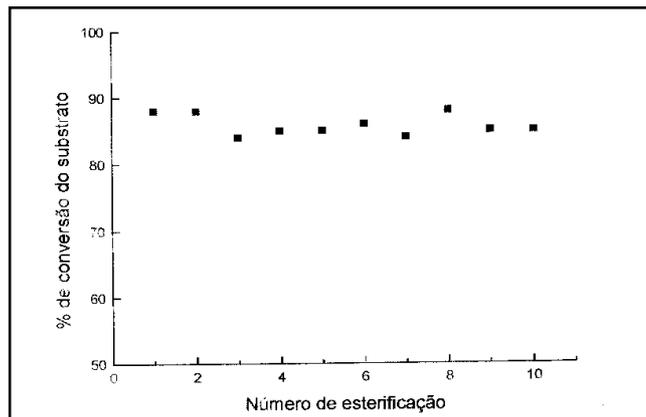
**Figura 2.** Efeito da concentração de palatase **M** imobilizada em organo-gel de heptano, na síntese do laurato de 1-pentila. [palatase **M**] = 12 a 60 mg/mL no organo-gel, tempo = 4 horas e temperatura = 25 °C. Composição do organo-gel: [AOT] = 0,15 mol/L, [água] = 11,11 mol/L ( $W_0 = 74,07$ ), [gelatina] = 14% om/v.

A estabilidade e estocagem do biocatalisador imobilizado são parâmetros importantes os quais podem determinar a viabilidade econômica de um processo biosintético<sup>24</sup>. A estabilidade do organo-gel de heptano como suporte para palatase **M** foi verificada através de sucessivas sínteses do laurato de 1-pentila. A Figura 3 mostra que o rendimento da reação manteve-se na faixa de 84 a 88%. A enzima manteve-se ativa nas 10 conversões, com um rendimento médio em éster de 85%. Durante o período do experimento (70 dias), a atividade catalítica de palatase **M** e a integridade física do organo-gel de heptano foi mantida, comprovando que é possível a sua reutilização.

Outros estudos visando a reutilização do organo-gel feitos por Rees,<sup>7</sup> Jenta<sup>9</sup> e col., mostraram a estabilidade da lipase **CV** imobilizada em organo-gel de heptano, em repetidas sínteses do oleato de 1-octila e decanoato de 1-octila, respectivamente. Os resultados mostraram que o **MBG** permaneceu inalterado visualmente e que o biocatalisador exibiu boa estabilidade sem perda significativa da atividade catalítica, durante o período do experimento.

A reutilização do sistema é um fator importante, não somente

peelo fato que a enzima pode ser utilizada, mas porque no final de cada síntese, qualquer substrato residual e produtos podem ser retirados do organo-gel usando solventes orgânicos. Com esta operação, o **MBG** contendo a enzima pode ser novamente usado para catalisar uma reação completamente diferente<sup>7</sup>.



**Figura 3.** Reutilização de Palatase **M** imobilizada em organo-gel de n-heptano na esterificação do ácido láurico com n-pentanol. [palatase **M**] = 60 mg/mL no organo-gel, tempo = 6 horas e temperatura = 25 °C. Composição do organo-gel: [AOT] = 0,15 mol/L, [água] = 11,11 mol/L ( $W_0 = 74,07$ ), [gelatina] = 14% (m/v).

A análise dos resultados comprova a eficiência catalítica de palatase **M** na síntese do laurato de 1-pentila e a estabilidade do organo-gel para a imobilização de enzimas. Este método tem considerável aplicação em síntese orgânica, especialmente por ser realizado sob condições suaves (temperatura ambiente) e formar os produtos com bons rendimentos.

Através da construção do diagrama de fase para o organo-gel de heptano, é possível determinar a quantidade mínima de gelatina necessária para gelificar o sistema e avaliar a influência do solvente na sua formação. As regiões transparentes, podem ser utilizadas para estudos espectroscópicos, por exemplo fotoquímicos e fotofísicos ajudando a compreender melhor o processo "sol-gel"<sup>25</sup>.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FINEP, CNPq e UFSC pelo apoio financeiro e a Novo Nordisk pela doação de enzimas.

### REFERÊNCIAS

- Pouson, P. B.; *Enzyme Microbiol. Technol.* **1981**, *3*, 271
- Koskinen, A. M. P.; Klivanov, A. M.; *Enzymatic Reactions in Organic Media*; Blackie A & P; London 1996, 9-37.
- Faber, K.; *Enzymes in organic solvents*; Springer, Berlin 1997, 300-344.
- Fletcher, P. D. I.; Freedman, R. B.; Rees, G. D.; Robinson, B. H.; *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *832*, 204.
- Rees, G. G.; Robinson, B. H.; Stephenson, G. R.; *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1257*, 239.
- Samama, J. P.; Lee, K. M.; Biellmann, J. F.; *Eur. J. Biochem.* **1987**, *163*, 609.
- Rees, G. D.; Nascimento, M. G.; Tuah, R. J.; et al.; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1073*, 493.
- Jesus, P. C.; Rezende, M. C.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron* **1995**, *6*, 63.
- Jenta, T. R. J.; Batts, G.; Rees, G. D.; Robinson, B. H.; *Biotech. Bioeng.* **1997**, *53*, 121.
- Nascimento, M. G.; Rezende, M. C.; Vecchia, R. D.; Jesus, P. C.; Aguiar, L. M.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5891.

11. Rees, G. G.; Jenta, T. R. J.; Nascimento, M. G.; Catauro, M.; Robinson, B. H.; Stepheson, G. R.; Olphert, R. D. G.; *Indian J. Chem.* **1993**, 32 B, 30.
12. Atkinson, P. J.; Robinson, B. H.; Howe, A. M.; Pitt, A. R.; *Colloids and Surfaces A.* **1995**, 231.
13. Luisi, P. L.; Scartazzini, R.; Haering, G.; Schurtenberger, P.; *Colloid Polym. Sci.* **1990**, 268, 356.
14. Rees, G. D.; Robinson, B. H.; *Advanced Material* **1993**, 5, 609.
15. Haering, G.; Luisi, P. L.; *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 5892.
16. Quellet, C.; Eicke, H. F.; *Chimia* **1986**, 40, 233.
17. Atkinson, P. J.; Grimson, M. J.; Heenan, R. K.; Howe, A. M.; Mackie A. R.; Robinson, B. H.; *Chem. Phys. Lett.* **1988**, 151, 494.
18. Atkinson, P. J.; Grimson, M. J., Heenan, R. K.; Howe, A. M.; Mackie A. R.; Robinson, B. H.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun* **1989**, 23, 1807.
19. Capitani, D.; Segre, A. L.; Haering, G.; Luisi, P. L.; *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 3500.
20. Howe, A. M.; Katsikides, A.; Robinson, B. H.; Chadwick, A. V.; Al-Mudaris, A.; *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1988**, 211.
21. Quellet, C.; Eicke, H. F.; Sager, W.; *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 5642.
22. Petit, C.; Zemb, T.; Pileni, M. P.; et al.; *A.I.P. Conf. Proc.* **1991**, 226, 509.
23. Nascimento, M. G.; Aguiar, L. Z.; Prudencio G. E.; et al. *Quím. Nova* **1990**, 16, 414.
24. Buchholz, K.; Klein, J.; Characterization of immobilized biocatalysts. In: K. Mosbach (ed). *Methods in enzymology: Immobilized enzymes and cells*. Academic Press, London, 1987, 3-30.
25. Souza, D.; Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; Soldi, V. FQ-058, Livro de Resumos da 19<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Minas Gerais, 1996.