



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
QMC5510 - ESTÁGIO SUPERVISIONADO



# Filmes de caseinato de sódio/glicerol como suporte para lipases - Aplicação na síntese do oleato de *n*-pentila

Aluna: Vanessa Dutra Silva  
Orientadora: Maria da Graça Nascimento  
Co-Orientador: Damianni Sebrão

Florianópolis, agosto de 2006

"Toda a nossa ciência,  
comparada com a realidade, é  
primitiva e infantil - e, no entanto, é  
a coisa mais preciosa que temos."  
(Albert Einstein)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que de algum modo me ajudaram em minha vida acadêmica, e minhas desculpas aqueles que por ventura minha memória não puder lembrar.

- ✓ A Deus, que está sempre presente em minha vida.
- ✓ À minha família por todo o amor e compreensão que recebi durante toda a minha vida.
- ✓ À professora Maria da Graça Nascimento pela amizade, paciência e orientação na realização deste trabalho.
- ✓ Ao doutorando Damianni Sebrão em especial pela amizade, paciência e por me ajudar em todos os momentos de dificuldade na realização deste trabalho.
- ✓ Aos colegas e amigos do laboratório 301/306, Aline, Damianni, Marcelo, Patrícia, Thiago, Cristiane, Fernanda, Alexandre, Tiago, Rosana e Isabel.
- ✓ Aos meus amigos do curso (Aline, Silvane, Magda, Eder e Renato) e principalmente ao meu namorado Jeferson, por estar sempre ao meu lado apoiando e colaborando com amor e paciência.
- ✓ Aos professores do Departamento de Química que colaboraram para minha formação acadêmica.
- ✓ Ao professor Miguel e aos funcionários da central de análise pela realização das análises de RMN-<sup>1</sup>H.
- ✓ À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.
- ✓ Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte na realização deste trabalho.
- ✓ À Amano e Novozymes pela doação das lipases.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE TABELAS .....	v
LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS .....	vi
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Enzimas.....	1
1.2 - Classificação das enzimas .....	3
1.3 - Lipases .....	4
1.3.1 - Vantagens do uso de lipases em química orgânica.....	5
1.4 - Imobilização de enzimas .....	9
1.5 - Parâmetros que influenciam na imobilização de enzima .....	12
1.6 - Caseinato de Sódio .....	14
1.6.1 - Micelas de caseína .....	15
1.7 - Coquetel Enzimático.....	16
2. OBJETIVO.....	17
2.1 - Objetivo geral .....	17
2.2 - Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 - Reagentes, enzimas e solventes utilizados .....	18
3.2 - Preparação dos filmes de caseinato de sódio e imobilização das lipases. ....	19
3.3 - Caracterização dos suportes .....	20
3.3.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura .....	20

3.3.2 - Determinação da quantidade de água .....	20
3.4 - Preparação do meio reacional.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 - Caracterização dos suportes .....	23
4.1.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura .....	23
4.1.2 - Determinação do teor de água.....	25
4.2 - Reação estudada .....	26
4.2.1 - Seleção das lipases .....	28
4.2.1 - Estudo da variação da massa de lipase.....	29
4.2.3 - Efeito da imobilização simultânea de duas lipases na conversão em oleato de n-pentila.....	30
4.2.4 - Efeito do solvente.....	31
4.2.5 - Efeito da influência da temperatura.....	32
4.2.6 - Estudo da reutilização do suporte .....	34
4.2.7 - Efeito da temperatura de estocagem do biocatalisador .....	35
5. CONCLUSÃO.....	38
6. PERSPECTIVAS.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
8. ANEXOS.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas</i> sp. ....	1
Figura 2 – Reação de esterificação do ácido caprílico com <i>n</i> -pentanol catalisada pela lipase de <i>Candida rugosa</i> suportada microemulsão de organogel (MBG) .....	6
Figura 3 – Esterificação regioseletiva do estrepol com butirato de vinila catalisada pela lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	6
Figura 4 – Reação de aminólise do 2-amino-etanol com acrilato de etila catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CAL B).....	7
Figura 5 – Reação de acilação do <i>R,S</i> -mandealto de metila catalisada por LPS/PEO. ....	8
Figura 6 – Principais métodos de imobilização de enzima (adaptada da ref. 9). ..	10
Figura 7 – Relação mútua entre os vários componentes envolvidos em uma reação biocatalisada na presença de solventes orgânicos.....	12
Figura 8 – Modelos sugeridos para as micelas de $\alpha$ e $\beta$ - caseína. ....	16
Figura 9 – Preparação dos filmes de caseinato de sódio e imobilização das lipases.....	19
Figura 10 – Titulador automático de Karl Fischer.....	20
Figura 11 – Preparação do meio reacional e análise dos produtos.....	22
Figura 12 – Ampliação da região do espectro de RMN- <sup>1</sup> H correspondente aos sinais dos hidrogênios metilênicos do ácido e do álcool (conv: 59,3%). ....	22
Figura 13 – Fotomicrografias das amostras de filmes de CS com e sem a LPS imobilizada. [ampliações: (a) sem LPS, 1.000x, superfície, (b) com LPS, 250x, superfície; (c) com LPS, 2.000x, superfície; (d) com LPS, 300x, fratura]. ..	24

- Figura 14 – Reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol catalisada por lipases imobilizadas em filmes de CS/G..... 26
- Figura 15 – Placa cromatográfica do *n*-pentanol (padrão 1) e de uma alíquota (2) da reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol catalisada pelo sistema LPS/CS/G. [ácido oleico (5mmol), *n*-pentanol (5mmol), *n*-hexano (25mL), 24h, 35°C, eluente *n*-hexano:acetato de etila (9:1v/v), sílica gel máx. 400mesh ]...... 26
- Figura 16 – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da alíquota da reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol ressaltando a ampliação da região correspondente aos sinais dos hidrogênios metilênicos do éster e do álcool. [200MHz, CDCl<sub>3</sub>]. ..... 27
- Figura 17 – Efeito da variação de massa de LPS imobilizada em CS/G na conversão em oleato de *n*-pentila. [ácido oleico (5mmol), *n*-pentanol (5mmol), *n*-hexano (25mL), 24h, 35°C]. ..... 29
- Figura 18 – Efeito da variação da temperatura na conversão em oleato de *n*-pentila catalisada pelo “coquetel” LPS/LRO livre (●), LPS/LRO/CS/G (■). [ácido oleico (5mmol), *n*-pentanol (5mmol), 25/25mg lipases/1,5g filme, *n*-heptano (25mL), 24h]. ..... 33
- Figura 19 – Efeito da reutilização das lipases na conversão em oleato de *n*-pentila. [ácido oleico (5mmol), *n*-pentanol (5mmol), 50mg lipase/1,5g filme, *n*-hexano (25mL), 24h, 35°C]. ..... 34

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB. ....	4
Tabela 2 – Determinação do teor de água nos filmes de caseinato de sódio. ....	25
Tabela 3 – Conversão em oleato de <i>n</i> -pentila catalisada por lipases livre e imobilizadas em filmes de CS/G. ....	28
Tabela 4 – Efeito da imobilização simultânea das lipases LPS e LRO em CS/G na conversão em oleatos de <i>n</i> -pentila. ....	30
Tabela 5 – Efeito do solvente na conversão em oleato de <i>n</i> -pentila catalisada pela LRO/LPS/CS/G (25/25mg). ....	31
Tabela 6 – Valores de conversão em oleato de <i>n</i> -pentila após estocagem do catalisador –18°C durante 124 dias. ....	36
Tabela 7 – Valores de conversão em oleato de <i>n</i> -pentila após o catalisador permanecer a 50°C por uma hora. ....	36

**LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS**

$\alpha$	= alfa
$\beta$	= beta
$\gamma$	= gama
$\delta$	= deslocamento
k	= capa
Asp	= ácido aspártico
ccd	= cromatografia de camada delgada
$\text{CDCl}_3$	= clorofórmio deuterado
CS/G	= caseinato de sódio/glicerol
CTAB	= brometo de hexadeciltrimetilamonio
Da	= Dalton
E.C.3.1.1.3	= classificação das lipases
E.C.3.1.1.1	= classificação das esterases
EDC	= 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
Glu	= ácido glutâmico
His	= histidina
LMM	= lipase de <i>Mucor miehei</i> (Novozymes)
LMM/CS/G	= lipase de <i>Mucor miehei</i> imobilizada em caseinato de sódio/glicerol
log P	= logaritmo do coeficiente de partição
LPP	= lipase do <i>Pâncreas do Porco</i> (Sigma)
LPP/CS/G	= lipase do <i>Pâncreas do Porco</i> imobilizada em caseinato de sódio/glicerol
LPS	= lipase de <i>Pseudomona</i> sp (Amano)
LPS/CS/G	= lipase de <i>Pseudomonas</i> sp imobilizada em caseinato de sódio/glicerol
LRO	= lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (Amano)
LRO/CS/G	= lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em caseinato de sódio/glicerol
LTL	= lipase de <i>Thermomices lanuginosus</i> (Novozymes)
LTL/CS/G	= lipase de <i>Thermomices lanuginosus</i> imobilizada em caseinato de sódio/glicerol
MEV	= microscopia eletrônica de varredura

MHz	= mega Hertz ( $10^6$ Hertz)
Rf	= índice de retenção
RMN- $^1\text{H}$	= ressonância magnética nuclear de hidrogênio
Ser	= serina
sp	= espécie não determinada
TMS	= tetrametilsilano
UIBBM	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

## RESUMO

Enzimas são biocatalisadores protéicos que em condições ótimas de temperatura e pH aceleram as reações químicas. As enzimas podem ser imobilizadas em vários suportes que estão descritos na literatura e assim serem utilizadas em síntese orgânica.

Lipases de *Pseudomonas* sp (LPS), *Rhizopus oryzae* (LRO), *Thermomices lanuginosus* (LTL), *Pâncreas do Porco* (PPL) e *Mucor miehei* (LMM) foram imobilizadas em filmes de caseinato de sódio/glicerol (CS/G), e estes sistemas utilizados como catalisadores nas reações de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol.

Foram avaliados parâmetros tais como o efeito da imobilização das lipases LPS, LRO, LTL, PPL e LMM, massa de lipase, imobilização simultânea da LPS e LRO, solvente orgânico, temperatura, temperatura de estocagem e reutilização dos sistemas.

Os filmes de CS/G com ou sem enzima foram caracterizados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Neste estudo a lipase utilizada foi a LPS, e aparentemente o aglomerado enzimático está adsorvido na superfície dos filmes de CS/G. Também foi determinado o teor de água nestes filmes através do método de titulação de Karl-Fischer. Os filmes, com ou sem enzima, apresentaram 12-14% de água.

As conversões em oleato de *n*-pentila (calculadas por RMN-<sup>1</sup>H), variaram dependendo do sistema biocatalítico utilizado (livre ou imobilizado). A maior conversão em éster obtida foi com a LPS imobilizada em filme de CS/G (60%), e com a LRO na forma livre não houve formação de produto.

A conversão em oleato de *n*-pentila foi altamente dependente da polaridade do solvente orgânico (54 e 0%, com heptano e acetona, respectivamente), e foi praticamente independente da temperatura (48-56%).

A reutilização dos sistemas lipase/CS/G mostrou ser um processo vantajoso podendo ser utilizado várias vezes sem a perda considerável da atividade catalítica, formando o produto com boas conversões (33-60%).

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os filmes de caseinato de sódio/glicerol são suportes eficientes para lipases. Os filmes são homogêneos, as lipases permaneceram ativas e o oleato de *n*-pentila foi obtido com boas conversões.

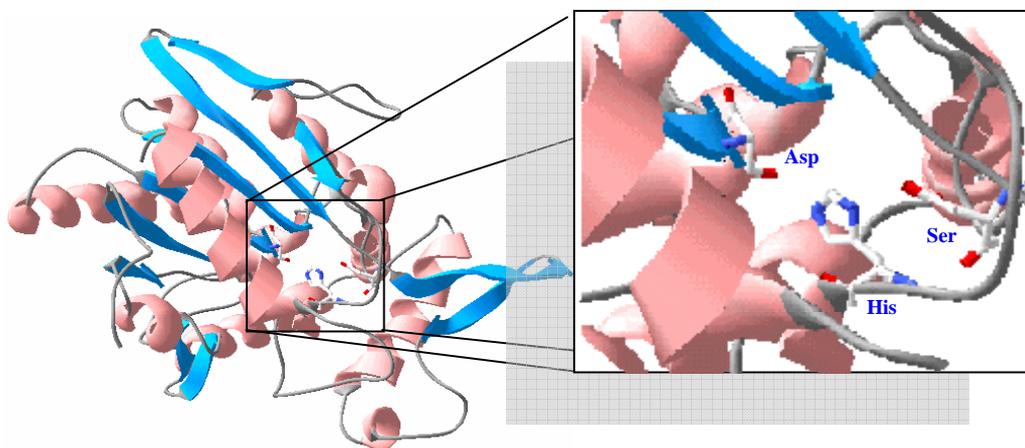
Palavras chaves: *Imobilização, lipases, caseinato de sódio e esterificação.*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - Enzimas

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem<sup>1</sup>.

Toda a enzima possui um sítio ativo, o qual constitui somente uma pequena porção do volume total e que está usualmente próximo ou na superfície, de forma a estar acessível às moléculas de substratos. O sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato. Em certos casos, estudos de difração de raios X têm revelado na enzima uma pequena área ou fissura claramente definida, na qual o substrato, ou mesmo parte dele, pode se fixar<sup>1,2</sup>. A **Figura 1** mostra uma representação esquemática da lipase de *Pseudomonas* sp (LPS) destacando os resíduos do seu sítio ativo.



**Figura 1** – Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas* sp<sup>3</sup>.

Diferentemente de outras proteínas, as enzimas possuem atividade catalítica. Isto significa que simplesmente com a sua presença, e sem serem consumidas durante o processo, elas conseguem acelerar os processos químicos, que de outra maneira ocorreriam muito lentamente ou não totalmente. Ao contrário de catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais e óxidos metálicos as enzimas são muito específicas, por apresentar tais propriedades, elas têm sido amplamente utilizadas em síntese orgânica<sup>4,5,6,7</sup>. As vantagens de se utilizá-las como catalisadores são:

- As velocidades das reações catalisadas por enzimas são maiores por fatores de  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes do que as correspondentes não catalisadas. Para organismos vivos, aumentos de velocidade desta ordem de grandeza são importantes, pois permite a ocorrência de reações a velocidades razoáveis mesmo nas condições normais que existem nas células vivas (isto é, pH aproximadamente neutro e temperatura na ordem de  $35^\circ\text{C}$ )<sup>5</sup>.

- As reações enzimáticas, ao contrário das catalisadas por catalisadores químicos, ocorrem em condições relativamente suaves: pressão atmosférica, temperaturas abaixo de  $100^\circ\text{C}$  e pH neutro<sup>6</sup>.

- As enzimas têm um alto grau de especificidade diante dos respectivos substratos, o que faz com que raramente se formem produtos laterais ou secundários<sup>6</sup>.

- São quirais e podem apresentar alta enantiosseletividade<sup>7,8</sup>.

Porém, estes biocatalisadores apresentam algumas desvantagens, tais como:

- São encontradas na natureza somente com uma forma enantiomérica, a forma L.

- Requerem controle dos parâmetros reacionais, tais como de temperatura e pH.

- Apresentam uma maior atividade catalítica em água;

- São propensas a sofrerem inibição por agentes químicos e físicos.
- Podem causar alergias.

Nos últimos anos tais desvantagens têm sido bastante amenizadas pelo aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para reações biocatalíticas. Quando o processo não for satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem influenciar tanto a estereoquímica quanto a enantiosseletividade.

As modificações mais comuns envolvem o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores, técnicas de imobilização e utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas)<sup>6,9,10</sup>.

## 1.2 - Classificação das enzimas

No Banco de Dados de Proteínas (PDB), encontram-se catalogados 37.658 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucleicos e complexos proteína/ácido nucleico). Várias enzimas têm sua seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-2D<sup>1,2,3</sup>.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as enzimas em seis grandes classes, e cada uma dessas em subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. Entretanto, a aplicação em química orgânica se restringe a cinco grupos, sendo que as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas por não requererem cofatores (**Tabela 1**)<sup>1</sup>.

**Tabela 1** – Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	Hidrogenases, oxidases, peroxidases
2	Transferases	Reações de transferência de grupos	Transaldolases, transcetolases
3	<b>Hidrolases</b>	Reações de hidrólise	Esterases, <b>lipases</b> , peptidases, fosfatases
4	Liasas	Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoacidoliasas, hidroliasas
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, oxirredutases, mutase
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	

### 1.3 - Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC.3.1.1.3) são classificadas como hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases<sup>11</sup>. A diferenciação de uma lipase e uma esterase (EC.3.1.1.1) está no fato que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que as esterases agem em substratos solúveis<sup>10,12</sup>. Entretanto, a diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados,

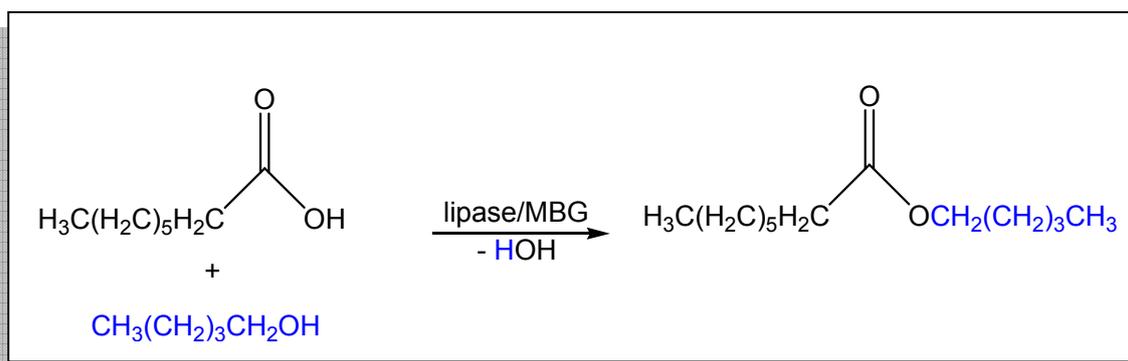
enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água<sup>13</sup>.

As lipases são encontradas em tecido de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microorganismos, tais como os fungos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Destes microorganismos, as lipases *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* e *Candida* sp estão comercialmente disponíveis. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de microorganismos são preferíveis às de fontes animais e plantas devido ao alto custo do seu isolamento<sup>10,14</sup>.

### 1.3.1 - Vantagens do uso de lipases em química orgânica

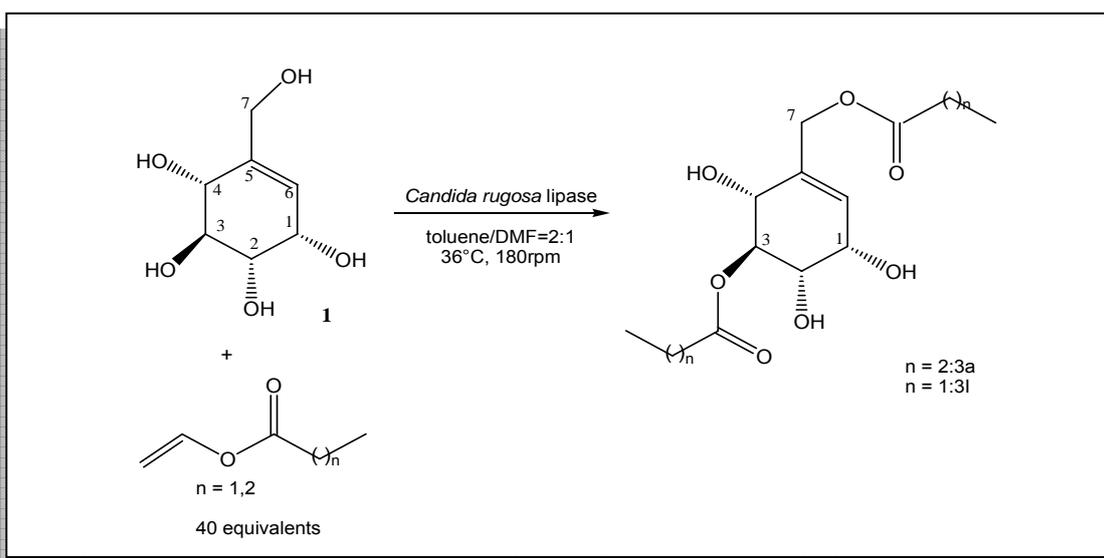
As lipases são muito utilizadas em sínteses orgânicas devido a sua grande disponibilidade, baixo custo, não requerem cofatores, atuarem em faixa de pH relativamente grande (4,0-8,0), serem muito estáveis em meio orgânico, apresentarem especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistemas bifásicos e em solução micelar com alta especificidade. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. As lipases tem sido extremamente investigada com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e mais recentemente para aplicações industriais<sup>10,13,14,15,16,17</sup>.

Lopes e col.<sup>18</sup> imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em microemulsões basedas em organogéis preparados com o surfactante catiônico brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Este sistema foi utilizado como catalisador na reação de esterificação do ácido caprílico com *n*-pentanol. A maior conversão obtida em caprilato de *n*-pentila, foi de 94% em 215h. **(Figura 2)**



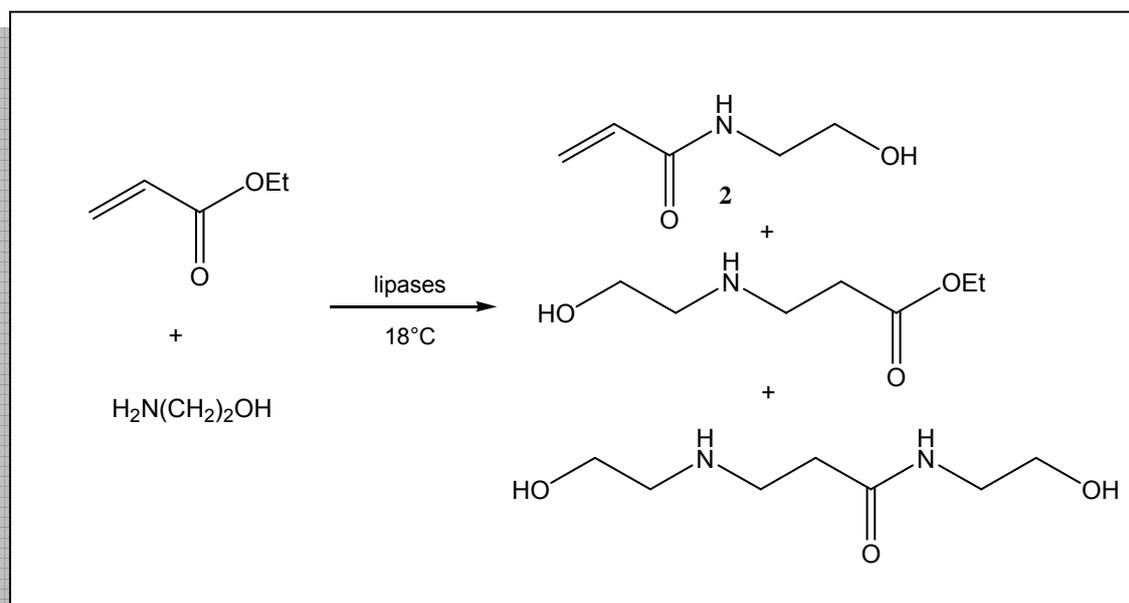
**Figura 2** – Reação de esterificação do ácido caprílico com *n*-pentanol catalisada pela lipase de *Candida rugosa* suportada microemulsão de organogel (MBG)<sup>18</sup>

Kroutil e col.<sup>19</sup> investigaram a influência dos doadores acilas na regioseletividade da lipases de *Candida rugosa* na esterificação do estrepol (**1**). Excelente regioseletividade foi observada na formação do 3,7-dissubstituídos. Com o butirato de vinila e o propionato de vinila obteve-se 100% do 3,7-dissubstituído com 68% e 46% de rendimento, respectivamente. Com o metacrilato de vinila foi obtido uma mistura de 71% do 3,7-dissubstituído e 29% do 1,7- dissubstituído (**Figura 3**).



**Figura 3** – Esterificação regioseletiva do estrepol com butirato de vinila catalisada pela lipase de *Candida rugosa*<sup>19</sup>

Rustoy e col.<sup>20</sup> realizaram a aminólise enzimática do 2-amino-etanol com acrilato de etila. Eles utilizaram cinco lipases comerciais: lipase do *pâncreas de porco* (PPL), Lipozyme (LIP), lipase imobilizada de *Mucor miehei*, lipase imobilizada *Candida antarctica* A e B de (CAL A, CAL B) e de *Candida rugosa* (CRL). Os rendimentos obtidos em N-(2-hidroxietil)-acrilamida (**2**) foram de 26, 37, 44, 93 e 38% respectivamente. Sem lipase não foi detectado a formação de produto (**Figura 4**).

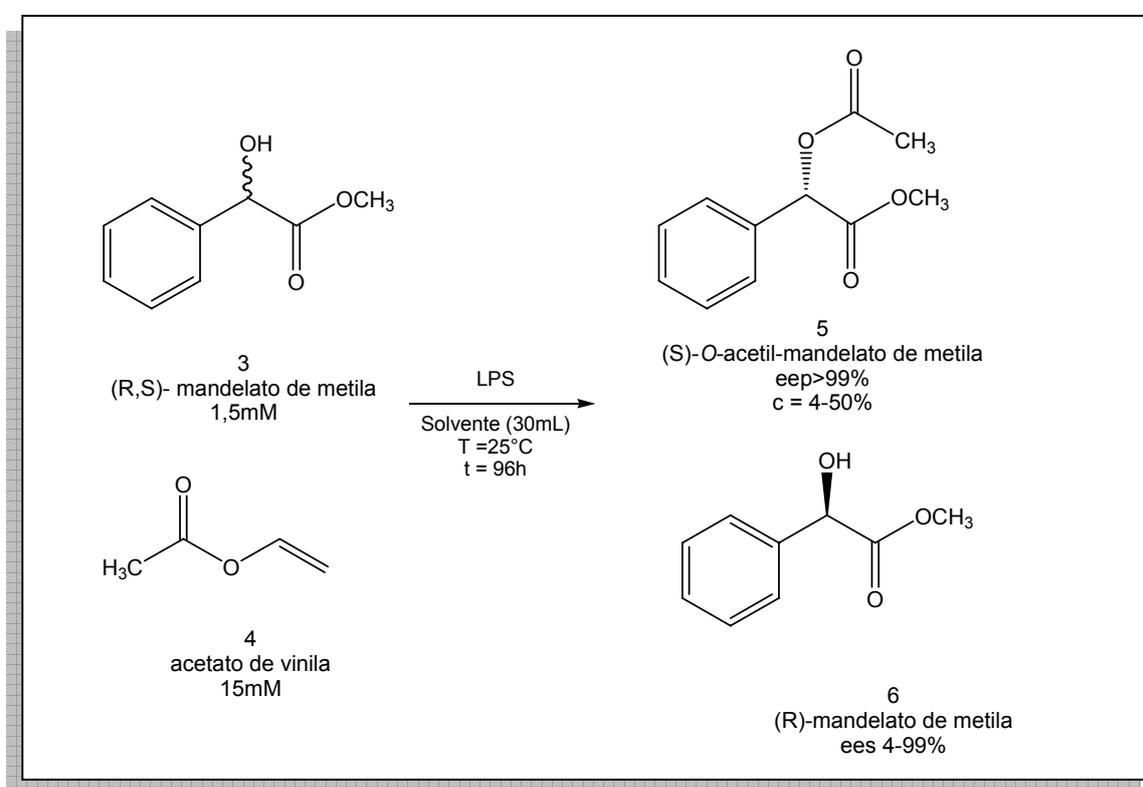


**Figura 4** – Reação de aminólise do 2-amino-etanol com acrilato de etila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* B (CAL B)<sup>20</sup>

As lipases apresentam a capacidade de preservar sua atividade catalítica em solvente orgânico. Devido a esta propriedade, seu potencial para conversão do excesso de gordura e óleos em produtos para os usos industriais está sendo amplamente investigado. Além destes exemplos, elas apresentam inúmeras aplicações na resolução de misturas racêmicas<sup>21</sup>, na síntese de fármacos, novos surfactantes, na bioconversão de gorduras e de óleos e na indústria alimentícia<sup>10,22</sup>.

Entretanto, a baixa estabilidade, atividade ou seletividade encontrada ocasionalmente em algumas destas enzimas, e o alto custo da forma nativa ainda tem dificultado a sua aplicação em larga escala na indústria<sup>17,23</sup>.

Queiroz e Nascimento<sup>21</sup> imobilizaram a lipase de *Pseudomonas* sp (LPS) em dois polímeros, poli(óxido de etileno) (PEO) e em gel de ágar. Estes sistemas foram utilizados na resolução do *R,S*-metil mandelato (**3**) com acetato de vinila (**4**) como agente acilante, em vários solventes orgânicos. O método foi bastante efetivo usando a lipase imobilizada em filmes de PEO. O grau de conversão foi de 4 à 50%, e ambos enantiômeros foram obtidos com pureza óptica de 100% (**Figura 5**).



**Figura 5** – Reação de acilação do *R,S*-mandealto de metila catalisada por LPS/PEO<sup>21</sup>.

Nos últimos anos, com o intuito de aumentar a atividade catalítica de lipases, foram apresentados na literatura vários procedimentos de imobilização ou modificações na estrutura nativa, sendo que estes processos envolvem diferentes

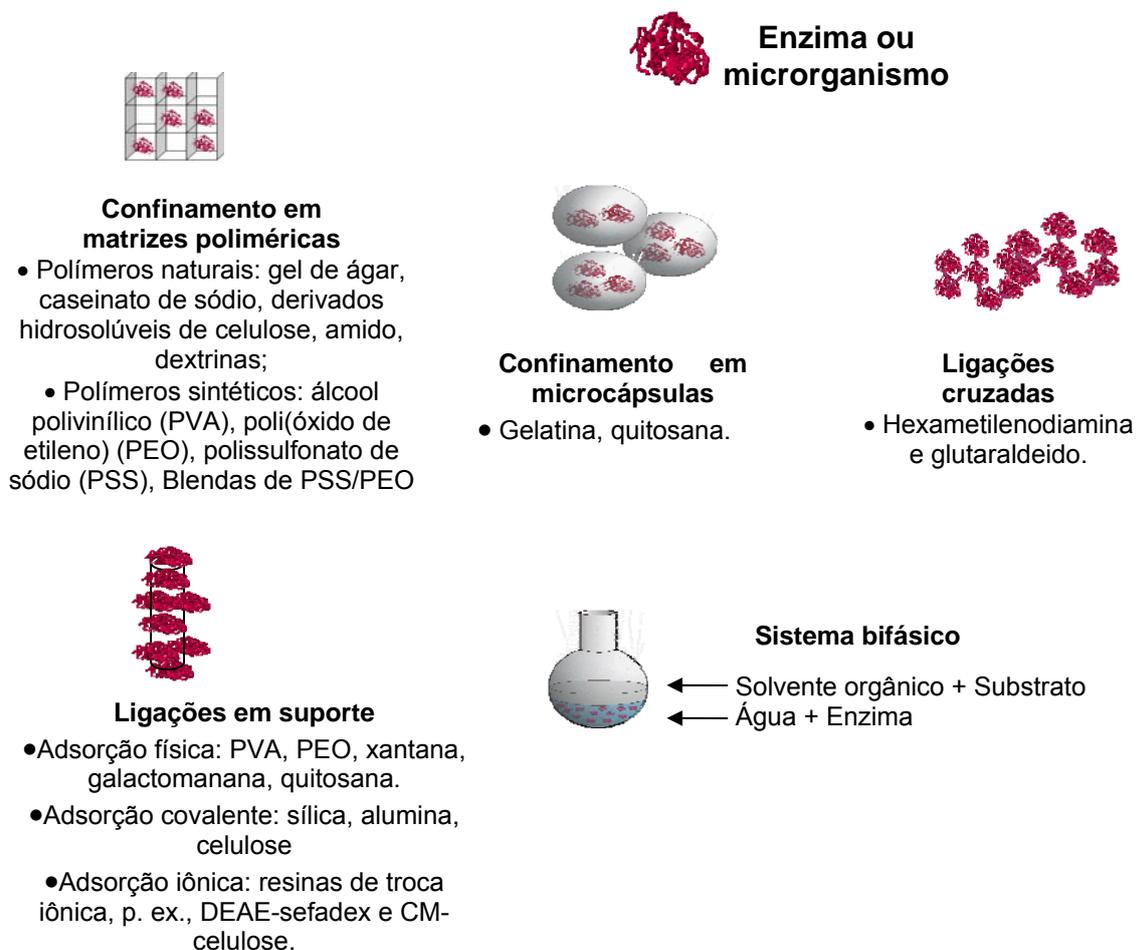
graus de complexidade e eficiência<sup>24,25,26</sup>. Os métodos de imobilização requerem uma interação fraca ou a formação de ligações covalentes entre a lipase e o suporte<sup>9</sup>. A engenharia genética de lipases envolve modificações do gene que codifica para a enzima. Esta tecnologia inclui a habilidade de isolar e expressar os genes de interesse e modificar alguns aminoácidos que ocupem um sítio importante para a atividade catalítica<sup>24,27 28</sup>.

A seleção da estratégia de imobilização ou o procedimento de modificação estão baseados no processo específico, o qual leva em consideração parâmetros como a atividade enzimática, a eficácia do método, a desnaturação da enzima no meio, o custo no procedimento, a toxicidade dos reagentes usados na imobilização e as propriedades finais da lipase imobilizada<sup>26,28</sup>.

#### **1.4 - Imobilização de enzimas**

A imobilização de enzimas é uma das importantes facetas da biotecnologia, e vários métodos vêm sendo desenvolvidos com este fim, tais como a absorção em materiais insolúveis, confinamento em géis poliméricos, encapsulamento em membrana, ligações cruzadas com auxílio de reagentes bi ou multifuncionais, e ligações em suporte insolúvel em água<sup>9,29,30</sup>.

A **Figura 6** ilustra as principais técnicas de imobilização descritas na literatura.

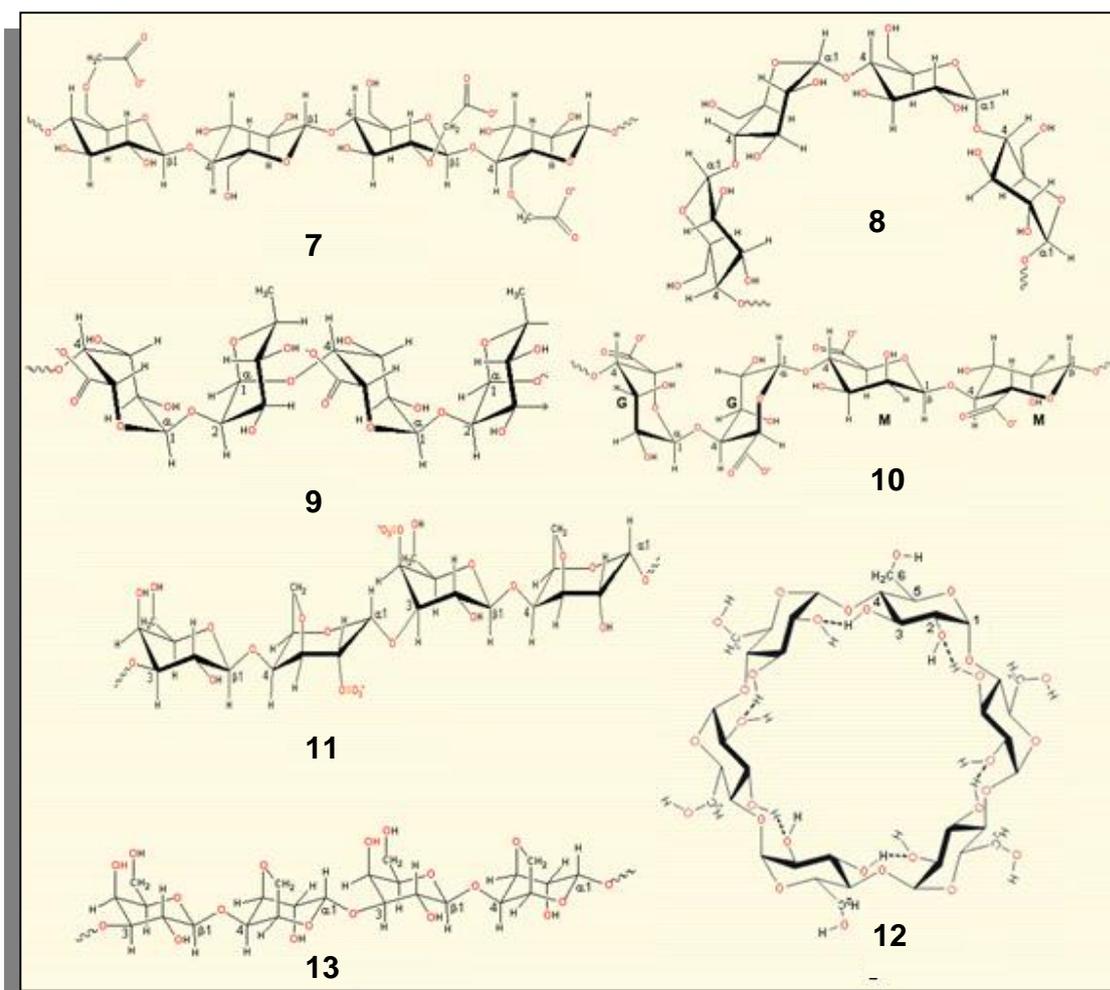


**Figura 6** – Principais métodos de imobilização de enzima (adaptada da ref. 9).

Para muitas enzimas a imobilização confere uma estabilidade adicional frente a várias formas de desnaturação, redução de custos, facilidade de separação, recuperação e reutilização, possibilidade de operações contínuas, aumento na estabilidade e em alguns casos, na atividade enzimática<sup>8,30, 31</sup>.

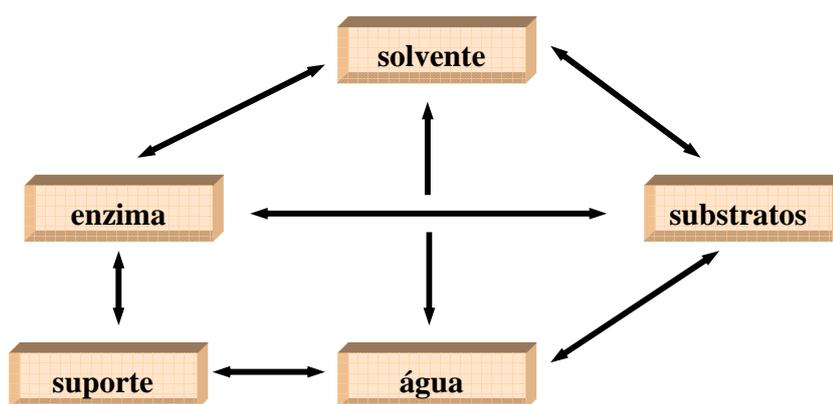
A utilização de filmes produzidos a partir de proteínas ou polissacarídeos tem contribuído para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalisador, criando um micro-ambiente favorável, e beneficiando desta forma a atividade enzimática<sup>32</sup>. Dentre as vantagens de utilizar estes biofilmes como suporte para biocatalisadores em síntese orgânica, destacam-se suas boas propriedades mecânicas, resistência a solvente de baixa polaridade, hidrofiliçidade, atoxicidade, e o fato de serem biodegradáveis e de baixo custo. A

escolha do suporte é baseada em função das propriedades desejadas e do biopolímero selecionado. Podem ser produzidos a partir de proteínas tais como glúten de trigo, zeína do milho, proteína de soja, colágeno, ovalbumina, proteínas do soro do leite, caseína e caseinatos. Estes materiais também podem ser obtidos de proteínas miofibrilares de peixe ou carne, ou ainda de polissacarídeos tais como os derivados hidrossolúveis de celulose (ex. carboximetilcelulose de cálcio) (7), amilose (8), pectina (9), alginatos (10), carragena (11), dextrinas (12), ágar (13) e outras gomas<sup>33,34,35,36,37</sup>. Além disso, por serem biodegradáveis e solúveis em água, estes suportes tornam os processos econômica e ambientalmente favoráveis, preenchendo desta forma os requisitos necessários para o desenvolvimento de uma “química limpa”.



### 1.5 - Parâmetros que influenciam na imobilização de enzima

A heterogeneidade do sistema biocatalítico, em meio orgânico, implica em uma relação mútua entre os diferentes componentes do sistema (**Figura 7**)<sup>30,38</sup>.



**Figura 7** – Relação mútua entre os vários componentes envolvidos em uma reação biocatalisada na presença de solventes orgânicos.

Quando um biocatalisador ou um preparado enzimático é selecionado para uma determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliados e otimizados<sup>38</sup>.

A água é talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. Está bem documentado na literatura que uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Normalmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento da camada de hidratação da enzima, o que é devido à ação lubrificante da água, que aumenta a flexibilidade interna da enzima. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a síntese<sup>38,39</sup>.

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para manter sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando ligadas covalentemente em um suporte<sup>40,41,42,43</sup>. A água contribui ainda para a integridade estrutural, para a polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, e ela pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima<sup>44</sup>.

Halling<sup>45</sup>, sugeriu o uso da atividade termodinâmica da água ( $a_w$ ) para definir a relação entre a água e os outros componentes do sistema reacional. O teor de água no catalisador é mais importante para manter a atividade catalítica do que a quantidade total contida no sistema. A atividade catalítica da lipase de *R. miehei* em diferentes solventes orgânicos foi muito pequena para valores fixos de  $a_w$ <sup>44</sup>.

O efeito da atividade da água em reações biocatalisadas por lipases tem sido mostrados em vários trabalhos<sup>46,47</sup>.

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos tais como, a mudança na rigidez causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína<sup>48,49</sup>. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como da variação da energia livre total, associadas com diferentes energias de solvatação do solvente, são as possíveis causas do efeito de solvente<sup>50,51</sup>.

Do ponto de vista físico-químico, os aspectos mais importantes são a capacidade de extração (coeficiente de partição) e solubilização de substratos e/ou produtos pelo solvente orgânico. Estas propriedades vão determinar a facilidade de separação das fases e a transferência de massa. O solvente orgânico deve ser química e termicamente estável; não deve formar emulsão em meio aquoso para facilitar a separação de fases; a sua viscosidade deve ser reduzida, de forma a facilitar a transferência de massa; e não deve ser degradado pelo biocatalisador. O critério biológico, que relaciona à toxicidade do solvente para o biocatalisador é, de todos estes o mais restrito<sup>52</sup>.

Na literatura não existe um consenso claro com referência à escolha do parâmetro para descrever quantitativamente o efeito do solvente, em reações

biocatalíticas por enzimas. Porém, o parâmetro mais freqüentemente utilizado para verificar este efeito é o logaritmo do coeficiente de partição do solvente num sistema padrão *n*-octano/água ( $\log P_{\text{oct}}$ ), conhecido como parâmetro de Hansch, o qual é um indicador do grau de hidrofobicidade do solvente que está sendo utilizado<sup>53</sup>.

Segundo Laane e col.<sup>53</sup>, solventes com  $\log P_{\text{oct}} < 2$  são hidrofílicos e não são adequados para a biocatálise, porque eles perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes com  $\log P_{\text{oct}}$  entre 2 e 4 são menos hidrofílicos e perturbam fracamente a interação água-biocatalisador e afetam a sua estrutura de maneira imprevisível. Os solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}} \geq 4$  são hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, deixando o biocatalisador no seu estado ativo.

Recentemente, Vecchia e col.<sup>54</sup> avaliaram a influência do solvente na reação de esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol utilizando como catalisador a lipase *Rhizopus oryzae*, na sua forma livre e imobilizada em filmes de carboximetilcelulose (CMC) e álcool polivinílico (PVA). As melhores conversões em laurato de *n*-pentila foram obtidas com os solventes mais apolares com  $\log P \geq 2,5$  (78-99%).

Pilissão e Nascimento<sup>55</sup> investigaram o efeito do solvente orgânico e de líquidos iônicos na resolução enzimática do (*R,S*)-metil-mandelato. As correspondentes amidas foram obtidas com alto excesso enantiomérico (ee<sub>p</sub>>99%) utilizando uma mistura de clorofórmio ou *tert*-butanol/líquido iônico (10:1v/v). O solvente orgânico foi o determinante da configuração do produto.

## 1.6 - Caseinato de Sódio

O caseinato de sódio é um sal derivado da caseína, que é a principal proteína do leite de vaca, cuja constituição é de aproximadamente 3,5% de proteína, das quais 2,9% são caseínas e 0,6% são proteínas do soro. O leite é uma solução aquosa de proteínas, lactose, minerais e algumas vitaminas. A

caseína é definida como a proteína que precipita quando o leite desnatado é acidificado a pH 4,6 e temperatura 20°C<sup>56,57</sup>.

Estudos baseados na mobilidade molecular, tais como cromatografia eletroforese, filtração e centrifugação, demonstram a existência de quatro tipos de caseína: a caseína  $\alpha_{s1}$  (50% do total de caseínas), a caseína  $\beta$  (33%), a caseína  $k$  (15%) e a caseína  $\gamma$  em quantidades variáveis. O “s” da caseína  $\alpha$  refere-se à sensibilidade de precipitação frente aos íons cálcio<sup>56,57,58</sup>.

Embora os prefixos  $\alpha_s$ ,  $\beta$ , etc., definam as espécies específicas de proteínas, atualmente reconhece-se que existe uma variedade de caseínas (variantes genéticas) que possuem pelo menos um resíduo de aminoácido diferente na cadeia polipeptídica. Por exemplo, a caseína  $\alpha_{s1}C$  difere da caseína  $\alpha_{s1}B$ , a variante mais comum apenas porque na posição 192 da cadeia polipeptídica tem-se o resíduo da glicina no lugar do ácido glutâmico. Atualmente, pode-se identificar espécies de vacas através da análise detalhada da uma amostra de leite, verificando as proporções desta variável<sup>56</sup>.

### 1.6.1 - Micelas de caseína

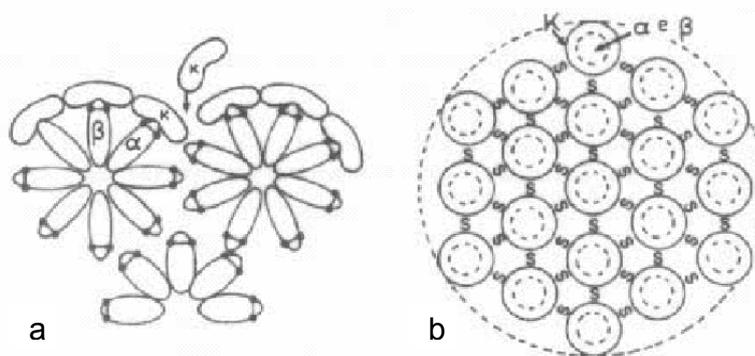
Cerca de 80-90% de toda a caseína do leite está na forma de partículas coloidais aproximadamente esféricas denominadas de micelas, medindo de 50-200nm de diâmetro, com massa molar de  $10^7$ - $10^9$ Da<sup>57</sup>.

O conhecimento das micelas de caseína é de grande importância, visto que muitos tratamentos em tecnologia do leite influenciam de alguma forma na estabilidade de suas micelas<sup>58</sup>.

Os modelos apresentados para as micelas são puramente hipotéticos, pois ainda não se conhece bem as suas estruturas. Supõe-se que essas micelas têm a forma mais ou menos esférica, formada por um grande número de sub-unidades unidas entre elas. Estas sub-unidades medem de 10-20nm de diâmetro e contêm de 25-30 moléculas de caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $k$ <sup>56,57,58</sup>.

Uma primeira teoria sugere que as sub-unidades de caseína  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$  formariam núcleos termodinamicamente estáveis em roseta cobertos por camadas

periféricas de caseína k (**Figura 8.a**). A segunda apresenta uma estrutura aberta composta de sub-unidades de tamanho uniforme contendo as caseínas  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$  no centro, e a caseína k na periferia (**Figura 8.b**)<sup>57</sup>.



**Figura 8** – Modelos sugeridos para as micelas de  $\alpha$  e  $\beta$  - caseína<sup>57</sup>.

### 1.7 - Coquetel Enzimático

O termo “coquetel enzimático” vem sendo aplicado quando dois ou mais biocatalisadores são usados simultaneamente imobilizados ou não no mesmo suporte polimérico<sup>59, 60</sup>.

Kheadr et al<sup>60</sup> encapsularam em liposoma de poliposome VPF 012 três tipos de enzima (proteases, peptidases e lipases), e utilizaram esses sistemas para acelerar a maturação de vários tipos de queijo. Os resultados, para alguns sistemas, demonstraram que foram obtidos queijos com sabor agradável (não amargo), sem mofo ou defeitos na textura em um tempo de maturação curto.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 - Objetivo geral

Imobilizar diversas lipases em filmes de CS/G, e utilizar este sistema como biocatalisador nas reações de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol.

### 2.2 - Objetivos específicos

- Caracterizar os filmes de CS/G com e sem lipases imobilizadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), e determinar a quantidade de água deste sistema pelo método de titulação de Karl-Fischer.

- Utilizar as lipases LPS, LRO, LTL, LPP e LMM na forma livre e imobilizadas em filmes de CS/G, como catalisador na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol.

- Avaliar a influência da variação da massa de lipase nos filmes de CS/G na reação estudada.

- Imobilizar simultaneamente duas lipases de procedências diferentes no mesmo suporte. Este método é chamado de “coquetel enzimático”.

- Analisar a influência do solvente orgânico e da variação da temperatura (25 - 45°C) na síntese do oleato de *n*-pentila catalisada pelas lipases LRO e LPS imobilizadas simultaneamente em filmes de CS/G.

- Avaliar o efeito da temperatura de estocagem e reutilização das lipases LPS e LRO na síntese do oleato de *n*-pentila.

- Comparar os resultados obtidos com os descritos na literatura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Reagentes, enzimas e solventes utilizados

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A.

✓ Álcool:

- *n*-pentanol (Vetec)

✓ Ácido:

- Ácido Oléico (Vetec)

✓ Solventes ( Vetec):

- Heptano
- Hexano
- Ciclohexano
- Clorofórmio
- Diclorometano
- Acetona
- Dioxano

✓ Glicerol (Reagem).

✓ Caseinato de Sódio (Tatua CO-OP Dairy Ltda).

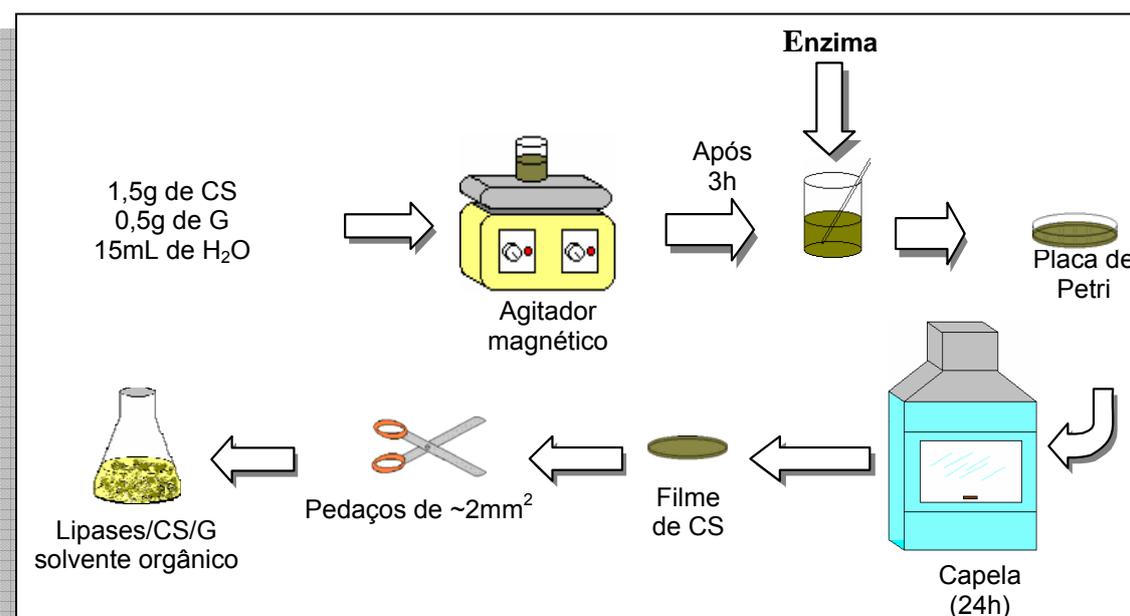
✓ Enzimas:

- Lipase de *Pseudomonas* sp - LPS (Amano, 30.000U/g)
- Lipase de *Rhizopus oryzae* - LRO (Amano, 150.000U/g)
- Lipase de *Mucor miehei* - LMM (Lipozyme - Novozymes, 5-6BAUN/g)
- Lipase de *Thermomices lanuginosus* – LTL (Lipolase - Novozymes, 100.000Ug<sup>-1</sup>)
- Lipase do *Pâncreas do Porco* - LPP (Sigma,135U/mg)

✓ Sílica gel DGF Riedl-deHaën máx. 400mesh

### 3.2 - Preparação dos filmes de caseinato de sódio e imobilização das lipases

Os filmes de caseinato de sódio foram preparados pesando 1,5g deste sal e 0,5g de glicerol, em um béquer de 50mL. A quantidade de glicerol usada foi baseada em trabalhos anteriores.<sup>61</sup> Adicionou-se 15mL de água destilada e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 3 horas. A seguir adicionaram-se quantidades variadas de lipases (0-100mg). O sistema foi agitado por mais 10min, a mistura transferida para uma placa de Petri e o solvente evaporado na capela, obtendo-se assim os filmes com a enzima imobilizada. Estes então foram cortados em pedaços aproximadamente do mesmo tamanho e transferidos para um erlenmeyer com solvente orgânico (**Figura 9**).



**Figura 9** – Preparação dos filmes de caseinato de sódio e imobilização das lipases.

### 3.3 - Caracterização dos suportes

#### 3.3.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia interna dos filmes de CS/G foi obtida em um microscópio eletrônico de varredura modelo PHILIPS XL30, do laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. Os filmes com ou sem enzima, foram fraturados em nitrogênio líquido e as análises foram realizadas na superfície e fratura (interior) do material. As amostras foram metalizadas, com uma fina camada de ouro, em um metalizador modelo P-2 DIODE SPUTTERING SYSTEM.

#### 3.3.2 - Determinação da quantidade de água

A quantidade de água presente nos filmes, após a evaporação à temperatura ambiente, foi determinada por titulação pelo método de Karl Fischer que se baseia na determinação quantitativa da água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo<sup>62</sup> (Titulador 633 Automatic Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau) (**Figura 10**).

A massa utilizada dos filmes previamente triturados variou, de 84-95mg. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso como média aritmética dos valores.



**Figura 10** – Titulador automático de Karl Fischer.

### 3.4 - Preparação do meio reacional

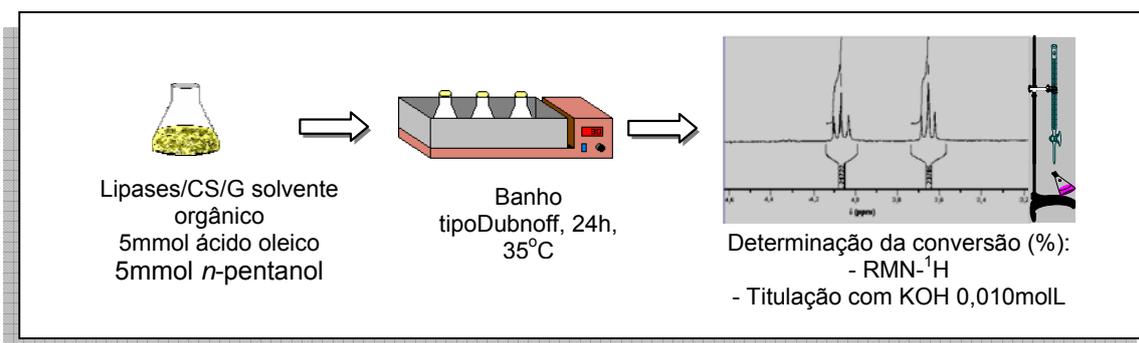
Os substratos (5mmol do ácido e do álcool) foram adicionados aos erlenmeyers contendo as enzimas imobilizadas e 25ml de solvente. Deixou-se então a mistura reacional, nas temperaturas de 25 a 45°C, agitando por 24h em banho termostatizado tipo Dubnoff (**Figura 11**).

A formação dos ésteres foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd) utilizando como eluente *n*-hexano: acetato de etila (9:1v/v).

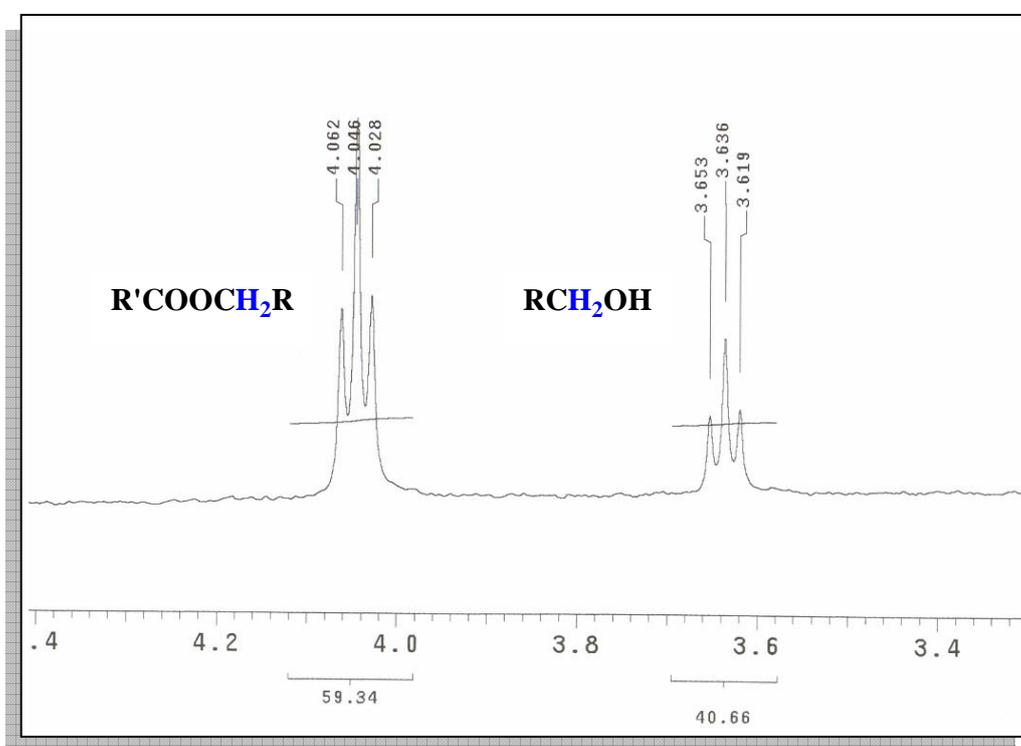
Após o tempo estipulado para cada reação, a mistura reacional foi decantada, e o filme lavado com 25mL de *n*-hexano por 24h, quantas vezes fossem necessárias, até que todos reagentes e produtos fossem retirados do filme. Cessadas as lavagens, o grau de conversão em produto foi obtido por análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H).

Para os estudos de estocagem, os filmes foram mantidos a -18°C por 4, 46, 77 e 124 dias, e a 50°C durante 1h em *n*-hexano. Após permanecer por este tempo e temperatura o filme foi estabilizado à temperatura ambiente, e quantidades equimolares dos substratos (5mmol) foram novamente adicionadas. Os sistemas foram colocados em banho termostatizado por mais 24h, sob agitação a temperatura constante.

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H foram realizados nos espectrômetros BRUKER AC 200MHz e/ou VARIAN 400MHz, usando tetrametilsilano (TMS) como referência interna e CDCl<sub>3</sub> como solvente. A conversão em oleato de *n*-pentila foi determinada mediante comparação da área dos picos referentes ao hidrogênios metilênicos ligados ao carbono da hidroxila do álcool (centrado em 3,6ppm) com a dos hidrogênios metilênicos do carbono ligado ao oxigênio da carbonila do éster (centrado em 4,2ppm para os ésteres alifáticos). Em alguns estudos as conversões foram determinadas por titulação com solução de KOH 0,010mol/L, usando fenolfetaleína como indicador (**Figura 12**).



**Figura 11** – Preparação do meio reacional e análise dos produtos.



**Figura 12** – Ampliação da região do espectro de RMN-<sup>1</sup>H correspondente aos sinais dos hidrogênios metilênicos do ácido e do álcool (conv: 59,3%).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

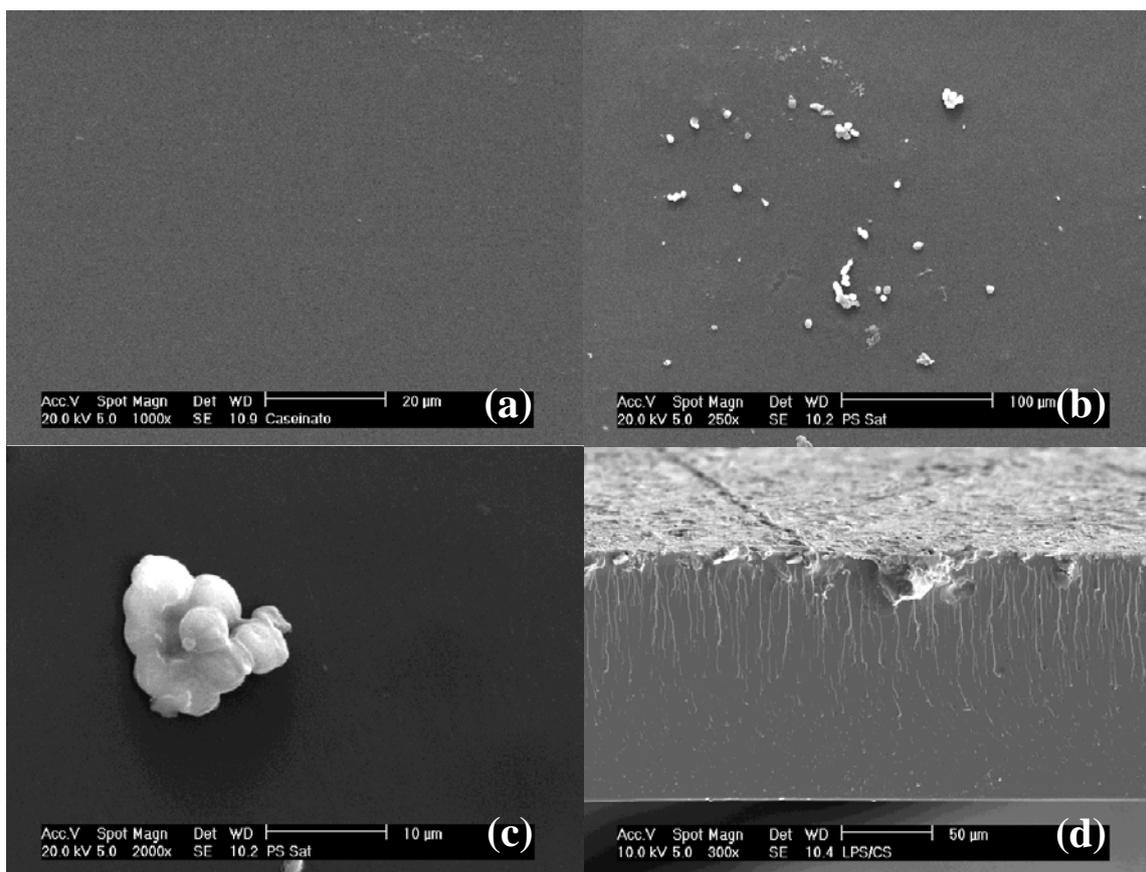
Neste trabalho realizou-se a síntese do oleato de *n*-pentila catalisada por lipases de diferentes fontes e atividades imobilizadas ou não em filmes de caseinato de sódio/glicerol.

Primeiramente foi realizada a caracterização dos filmes de CS/G com ou sem lipases, e a seguir foram avaliados diversos parâmetros na reação de esterificação do ácido oléico com *n*-pentanol. Os resultados estão apresentados abaixo.

### 4.1 - Caracterização dos suportes

#### 4.1.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura

A LPS foi imobilizada em filmes de CS/G, e este sistema foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As fotomicrografias obtidas estão apresentadas na **Figura 13**.



**Figura 13** – Fotomicrografias das amostras de filmes de CS com e sem a LPS imobilizada. [ampliações: (a) sem LPS, 1.000x, superfície, (b) com LPS, 250x, superfície; (c) com LPS, 2.000x, superfície; (d) com LPS, 300x, fratura].

As análises de MEV mostraram a homogeneidade dos filmes bem como a presença do preparado enzimático de LPS no suporte. As fotomicrografias (**Figuras 13a-d**) mostram que o filme é homogêneo (**Figura 13a**), e que a LPS está adsorvida principalmente na superfície, formando aglomerados em determinadas regiões deste filme (**Figuras 13b-c**). Na **Figura 13d**, MEV da fratura, observa-se novamente que o biocatalisador está localizado preferencialmente na superfície do filme. Estes resultados sugerem que a imobilização ocorreu por adsorção. Resultados similares foram observados por

Crespo e colaboradores na imobilização de diversas lipases em filmes de poli(óxido de etileno) (PEO)<sup>63</sup>.

#### 4.1.2 - Determinação do teor de água

O teor de água nos filmes foi determinado pelo método de titulação de Karl-Fischer. Os filmes com ou sem enzima apresentaram 12-14% de água em massa. Estes valores estão mostrados na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Determinação do teor de água nos filmes de caseinato de sódio<sup>(a)</sup>.

Sistemas	Teor de água (% m/m)
LRO/CS/G	14
LPS/CS/G	13
CS/G	12

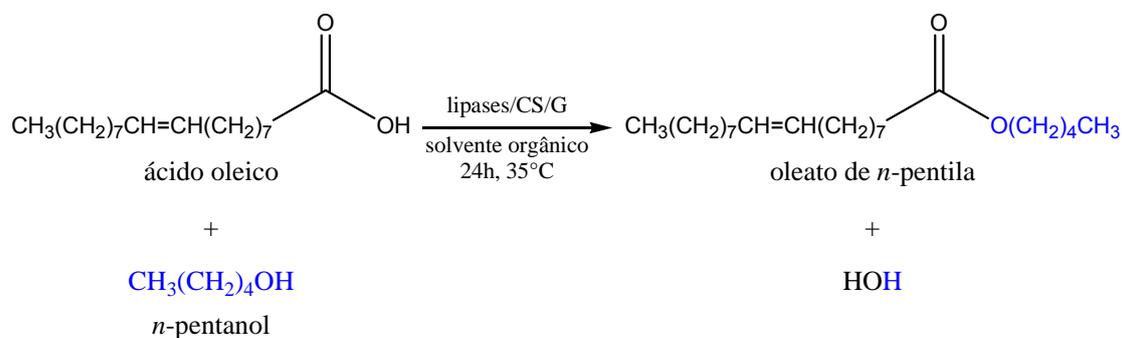
(a) Média de 3 determinações.

Esses resultados apresentados na **Tabela 2** estão de acordo com os da literatura, pois tem sido reportado que os biocatalisadores, em geral, são circundados por uma microcamada aquosa, sendo esta uma das condições necessárias para a manutenção da conformação nativa, e conseqüentemente da atividade enzimática na presença de solventes orgânicos<sup>9,36,49,64</sup>.

Sebrão e col.<sup>65</sup> determinaram a estabilidade dos filmes de CS/G em vários solventes orgânicos. Não foram observadas mudanças macroscópicas na maleabilidade e resistência destes filmes, permitindo a sua utilização como suporte para as diversas lipases.

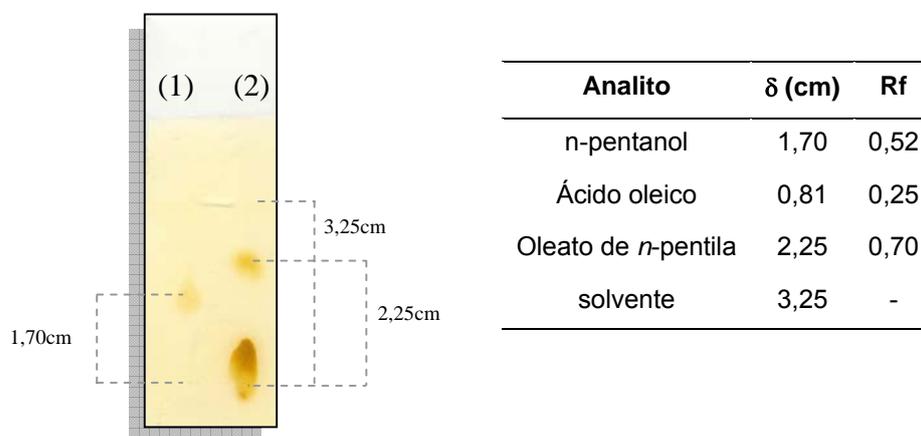
## 4.2 - Reação estudada

Neste trabalho, foi efetuada reação de esterificação do ácido oléico com *n*-pentanol, catalisada por lipases imobilizadas em filmes de CS/G (**Equação 1**).



**Figura 14** – Reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol catalisada por lipases imobilizadas em filmes de CS/G

Durante a realização da reação, a formação do oleato de *n*-pentila foi acompanhada por cromatografia de camada delgada utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (9:1v/v).



**Figura 15** – Placa cromatográfica do *n*-pentanol (padrão 1) e de uma alíquota (2) da reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol catalisada pelo sistema LPS/CS/G. [ácido oleico (5mmol), *n*-pentanol (5mmol), *n*-hexano (25mL), 24h, 35°C, eluente *n*-hexano:acetato de etila (9:1v/v), sílica gel máx. 400mesh].



#### 4.2.1 - Seleção das lipases

Lipases de diferentes fontes, procedências e atividades foram imobilizadas em filmes de CS/G e utilizadas como catalisador na esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol em *n*-hexano. Para fins comparativos, a mesma reação foi realizada com as lipases na sua forma livre. As conversões em ésteres estão apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Conversão em oleato de *n*-pentila catalisada por lipases livre e imobilizadas em filmes de CS/G<sup>(a)</sup>.

Lipases	Conversão <sup>(b)</sup> (%)	
	Imobilizada	Livre
LPS	60	33
LRO	47	nd <sup>(c)</sup>
LTL	22	26
LMM	33	36
LPP	20	25

(a) *n*-hexano (25mL), 35°C, 24h, 5mmol ácido oléico, 5mmol *n*-pentanol, 50mg lipase; (b) determinada por RMN-<sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub>; (c) nd = não detectada.

As maiores conversões em oleato de *n*-pentila foram obtidas quando a LPS e a LRO encontravam-se imobilizadas em filmes de CS/G, sendo de 60 e 47% respectivamente. Utilizando estas lipases livres, as conversões foram bem inferiores, sendo de 33% com a LPS e não foi detectado a formação de produto utilizando a LRO. Estes resultados salientam o efeito positivo da imobilização.

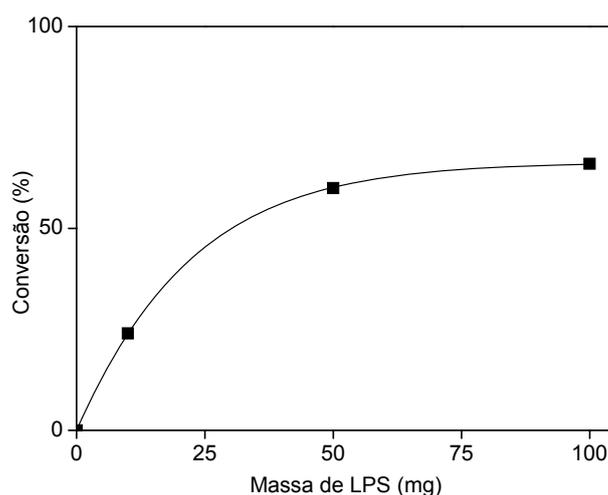
Utilizando as lipases LTL, LMM e LPP livre, as conversões foram de 26, 36 e 25%, respectivamente. É interessante observar que estas conversões são superiores as obtidas com as lipases imobilizadas. Esta diminuição na conversão pode estar relacionada com interações desfavoráveis entre os resíduos laterais de aminoácidos destas lipases com o filme de CS/G, alterando a estrutura tridimensional, ou ainda devido a dificuldade de acesso ao sítio catalítico das

mesmas. Por outro lado, deve-se considerar também a presença de outras proteínas nestes preparados enzimáticos<sup>16,66</sup>.

A partir destes resultados a LPS foi selecionada para realizar o estudo da variação da massa de lipases na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol.

#### 4.2.1 - Estudo da variação da massa de lipase

Para verificar se a quantidade do biocatalisador influencia na conversão em oleato de *n*-pentila foram preparados filmes de CS/G contendo de 0 a 100mg da LPS. Os resultados obtidos estão mostrados na **Figura 16**.



**Figura 17** – Efeito da variação de massa de LPS imobilizada em CS/G na conversão em oleato de *n*-pentila. [ácido oleico (5mmol), *n*-pentanol (5mmol), *n*-hexano (25mL), 24h, 35°C].

Os resultados mostraram que de 0-50mg de LPS houve um aumento na conversão em éster (0 a 50%), e após esta massa a conversão em éster não variou muito, permanecendo praticamente constante (60%). Este resultado indicou que com 50mg da LPS obtém-se o produto com boas conversões, e que o número de sítios disponíveis é suficiente para esta quantidade de substrato utilizado.

A partir destes dados, e em todos os estudos subseqüentes foram utilizados 50mg de lipase.

#### 4.2.3 - Efeito da imobilização simultânea de duas lipases na conversão em oleato de *n*-pentila

As lipases LPS e LRO foram imobilizadas simultaneamente em um mesmo filme de CS/G, e este sistema utilizado como catalisador na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol.

Cada sistema foi preparado mantendo-se constante a massa total das lipases (50mg) em diferentes proporções. Os resultados de conversão em éster estão mostrados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Efeito da imobilização simultânea das lipases LPS e LRO em CS/G na conversão em oleatos de *n*-pentila<sup>(a)</sup>.

Massa de lipase (mg)		Conversão <sup>(b)</sup> (%)
LRO	LPS	
0	50	60
10	40	53
20	30	55
25	25	52
30	20	49
40	10	49
50	0	47

(a) *n*-hexano (25mL), 35°C, 24h, 5mmol ácido oleico, 5mmol *n*-pentanol; (b) determinada por RMN-<sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub>;

Utilizando o “coquetel” das lipases LPS e LRO pode-se observar que as conversões foram de 49-55%, e que com a imobilização simultaneamente destas lipases não houve variação significativa na formação do produto. Estes resultados, porém, não excluem que a imobilização simultânea de lipases de outras procedências possa conduzir a resultados mais promissores em termos de maior conversão a produtos.

#### 4.2.4 - Efeito do solvente

Para verificar os efeitos causados por diferentes solventes na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol as lipases LRO(25mg) e LPS(25mg) foram imobilizadas simultaneamente em filmes de CS/G e este sistema utilizado como catalisador. Os resultados de conversão em oleato de *n*-pentila em função dos solventes com os vários valores de log P, estão mostrados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Efeito do solvente na conversão em oleato de *n*-pentila catalisada pela LRO/LPS/CS/G (25/25mg) <sup>(a)</sup>.

Solvente	log P <sup>(e)</sup>	Conversão (%)	
		RMN- <sup>1</sup> H <sup>(b)</sup>	Titulação <sup>(c)</sup>
heptano	4,0	54	53
hexano	3,5	52	47
cicloexano	3,2	43	78
clorofórmio	2,0	4	60
diclorometano	1,5	nd <sup>(d)</sup>	36
acetona	-0,23	nd	47
dioxano	-1,1	2	27

(a) solventes (25mL), 24h, 35°C, 5mmol ácido oleico, 5mmol *n*-pentanol; (b) determinada por RMN-<sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub>; (c) titulação com [KOH] 0,010mol/L, (média de 2 valores), (d) nd = não detectada, (e) Ref 53.

Os resultados obtidos estão de acordo com os de Laane<sup>53</sup>, mostrando que a percentagem de conversão da reação estudada foi dependente do solvente orgânico. Os solventes com log P acima de 3,2, ou seja os menos polares foram os mais eficientes, formando os oleatos de *n*-pentila com maiores conversões (43-54%). Usando solventes com log P menores que 3,2, ou seja os mais polares, os produtos foram obtidos em conversões menores (0-2%).

O efeito do solvente foi também avaliado na reação de esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol com a lipase de *Rhizopus oryzae* em diferentes suportes<sup>54</sup>, e na resolução do (*R,S*)-mandelato de metila com *n*-butilamina<sup>55</sup>. Neste trabalho foi observada a mesma tendência, ou seja, os solventes mais apolares são os mais adequados para uso em reações biocatalisadas.

A baixa conversão em éster, em solventes mais polares, se deve provavelmente ao fato destes retirar a camada de água essencial ao redor da lipase, causando distorção na conformação nativa e, portanto alterando a atividade catalítica do biocatalisador<sup>9,30,53,54</sup>.

Pode-se observar que os valores das conversões em oleato de *n*-pentila pelo método de análise por titulação, não estão de acordo com os valores de conversão por RMN-<sup>1</sup>H. Estes resultados estão sendo mais explorados e otimizados, a fim de obter uma concordância nos métodos de análise.

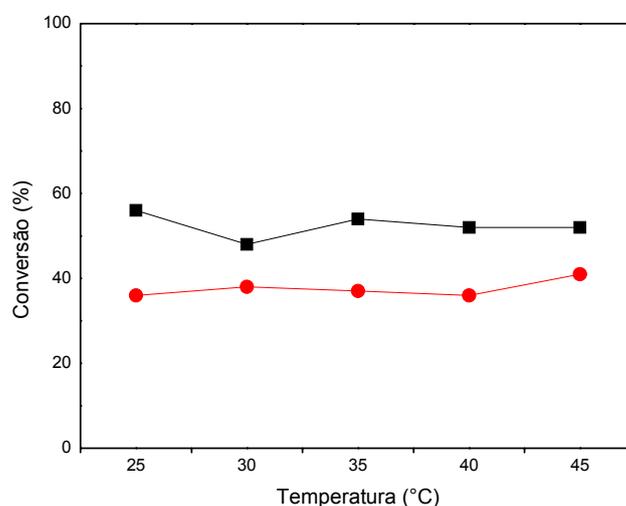
A partir deste estudo optou-se em utilizar o solvente *n*-heptano, para realizar o estudo da influência da temperatura na síntese do oleato de *n*-pentila, e o *n*-hexano nas reações subseqüentes.

#### 4.2.5 - Efeito da influência da temperatura

Tem sido descrito na literatura que a imobilização pode alterar a temperatura de atividade máxima de biocatalisadores. Dave e Madamwar<sup>33</sup> utilizaram a lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada em polímero de PVA-ácido bórico e avaliaram a atividade relativa na esterificação do ácido hexanóico com etanol, em função do aumento da temperatura. Os autores verificaram que a lipase na forma livre apresentou atividade relativa máxima à 20-30°C enquanto

que na forma imobilizada foi na faixa de 20-50°C mostrando assim que a imobilização provocou uma mudança no perfil de temperatura, e aumento na estabilidade.

Neste trabalho para avaliar o efeito da temperatura, as lipases LRO (25mg) e LPS (25mg) foram imobilizadas simultaneamente em filmes de CS/G, e este sistema utilizado como catalisador na síntese do oleato de *n*-pentila em *n*-heptano. Para fins comparativos as lipases de *Rhizopus oryzae* e *Pseudomonas* sp foram também utilizadas na forma livre. Os resultados estão mostrados na **Figura 18**.



**Figura 18** – Efeito da variação da temperatura na conversão em oleato de *n*-pentila catalisada pelo “coquetel” LPS/LRO livre (●), LPS/LRO/CS/G (■). [ácido oleico (5mmol), *n*-pentanol (5mmol), 25/25mg lipases/1,5g filme, *n*-heptano (25mL), 24h].

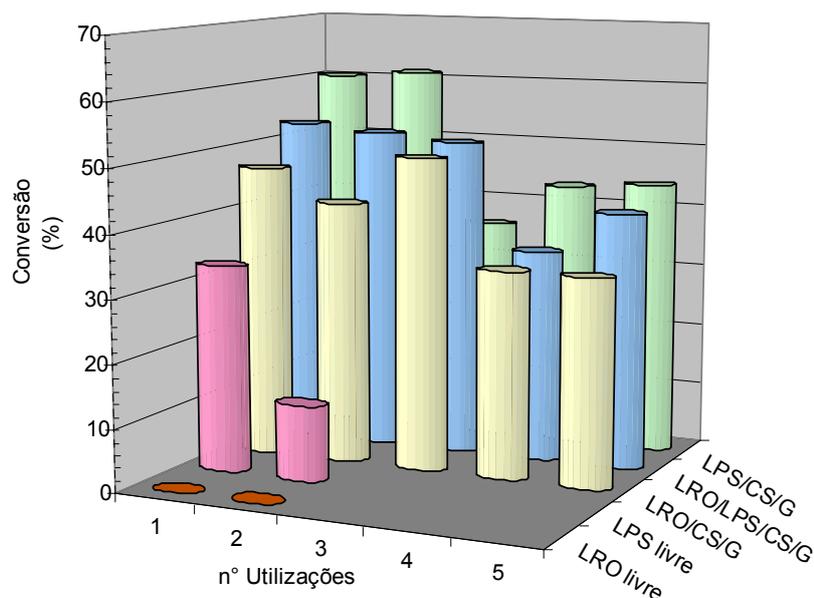
De acordo com as especificações dos fornecedores, as temperaturas nas quais se obtém a atividade máxima das lipases LRO e LPS são de 37-40°C e 50°C, respectivamente.<sup>67</sup>

Na faixa de temperatura estudada (25-45°C), as conversões em oleato de *n*-pentila catalisada pelo “coquetel” das lipases LRO/LPS (25/25mg) imobilizadas em CS/G foram de 48-56%, e para o “coquetel” livre foi de 36-41%.

Estes resultados mostraram que a conversão em éster utilizando o “coquetel” das lipases livre ou imobilizadas foi praticamente independente da temperatura, podendo a reação ser realizada em qualquer uma das temperaturas estudadas sem sofrer grandes alterações na conversão. Foi verificado também que a imobilização conferiu uma maior estabilidade às lipases.

#### 4.2.6 - Estudo da reutilização do suporte

Para avaliar o efeito da reutilização, as lipases LRO e LPS livres ou imobilizadas em filmes de CS/G foram utilizadas por cinco ciclos consecutivos na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol. Os valores de conversão em éster estão mostrados na **Figura 19**.



**Figura 19** – Efeito da reutilização das lipases na conversão em oleato de *n*-pentila. [ácido oleico (5mmol), *n*-pentanol (5mmol), 50mg lipase/1,5g filme, *n*-hexano (25mL), 24h, 35°C].

Os resultados mostraram que utilizando os sistemas LPS/CS/G, LRO/CS/G e LPS/LRO/CS/G as conversões em oleato de *n*-pentila foram de 36-61%, 33-50% e 34-53%, respectivamente. Com a LPS livre obteve-se o oleato de *n*-pentila com 33% de conversão, e após a primeira reutilização apenas 12%. Com a LRO livre não foi detectada a formação de produto, mesmo na primeira utilização.

Estes dados são interessantes, pois pode-se observar que os filmes de CS/G conferiram uma maior estabilidade para as lipases LPS e LRO em meio orgânico, e após cinco ciclos não houve uma grande redução na conversão em éster. As lipases LPS e LRO não foram eficientes quando usadas na forma livre, provavelmente devido à perda de massa durante a filtração e/ou inativação causada pela exposição direta no solvente orgânico.

Ye e col.<sup>68</sup> realizaram o estudo da reutilização da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em membranas de nanofibras de quitosana modificada e em membranas de nanofibras de gelatina modificada. A atividade residual da lipase imobilizada em membranas de nanofibras de quitosana modificada foi de 55% e da lipase imobilizada em membranas de nanofibras de gelatina modificada 60% após 10 ciclos consecutivos.

#### **4.2.7 - Efeito da temperatura de estocagem do biocatalisador**

Para avaliar a influência da temperatura de estocagem, as lipases LPS e LRO foram imobilizadas em filmes de CS/G e armazenadas durante 124 dias em um freezer a -18°C, sendo periodicamente retirados e utilizados para catalisar a reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol a 35°C. Os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Valores de conversão em oleato de *n*-pentila após estocagem do catalisador –18°C durante 124 dias<sup>(a)</sup>.

Lipases	Conversão (%) <sup>(b)</sup>			
	Tempo (dias)			
	4	46	77	124
LPS/CS/G	48	48	49	46
LRO/CS/G	45	47	29	30

(a) *n*-hexano (25mL), 35°C, 24h, 5mmol ácido oleico, 5mmol *n*-pentanol; (b) determinada por RMN-<sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub>.

Os valores de conversão em oleato de *n*-pentila catalisado pelo sistema LPS/CS/G permaneceram praticamente constantes, mesmo após 124 dias de estocagem, sendo de 46-49%. Ao utilizar o sistema LRO/CS/G, as conversões diminuíram de 47 a 29%, após 77 dias de armazenamento no freezer.

Em um outro estudo visando avaliar a influência da temperatura os sistemas LPS/CS/G e LRO/CS/G foram mantidos durante 1h a 50°C, e após a estabilização à temperatura ambiente foram utilizados como catalisadores na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol. Os valores de conversão estão mostrados na **Tabela 7**.

**Tabela 7** – Valores de conversão em oleato de *n*-pentila após o catalisador permanecer a 50°C por uma hora<sup>(a)</sup>.

lipases	Conversão (%) <sup>(b)</sup>		
	1ª utilização	2ª utilização	3ª utilização
LPS/CS/G	50	47	37
LRO/CS/G	46	40	22

(a) *n*-hexano (25mL), 35°C, 24h, 5mmol ácido oleico, 5mmol *n*-pentanol; (b) determinada por RMN-<sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub>.

Os dados apresentados na **Tabela 7** mostraram que as conversões em oleato de *n*-pentila foram de 37-50% quando utilizado o sistema LPS/CS/G e de 22-46% com o sistema LRO/CS/G.

Estes resultados são bastante importantes e mostraram que mesmo após o armazenamento dos filmes a baixas ou altas temperaturas, as lipases permaneceram ativas, não perderam a eficiência catalítica e ainda podem ser reutilizadas por várias vezes.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os filmes de CS/G são materiais eficientes e promissores para a imobilização de enzimas.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram obter-se as seguintes conclusões:

✓ As lipases estão localizadas na superfície dos filmes de CS/G, e sugere-se que o processo de imobilização ocorreu por adsorção.

✓ Os filmes de CS/G contêm cerca de 12% de água, antes e depois da imobilização, conferindo uma maior estabilidade às lipases imobilizadas.

✓ Os sistemas LPS/CS/G e LRO/CS/G mostraram-se os mais eficientes na síntese do oleato de *n*-pentila com conversões de 60 e 47%, respectivamente.

✓ 50mg de LPS imobilizada em CS/G foi suficiente para obter o produto com boas conversões (60%).

✓ A imobilização simultânea das lipases LPS e LRO, não influenciou significativamente nos graus de conversão em oleato de *n*-pentila.

✓ A reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol foi dependente do solvente orgânico, e as maiores porcentagens (~50%) foram obtidas utilizando solventes com log P 3,2 - 4,0.

✓ O estudo da influência da temperatura na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol em *n*-heptano catalisada pelo “coquetel” das lipases LPS e LRO, mostrou que na faixa de 25-45°C as conversões em éster mantiveram-se praticamente constantes (48-56%) para o “coquetel” imobilizado e de (36-41%) para o “coquetel” livre.

✓ Os sistemas LPS/CS/G, LRO/CS/G e LPS/LRO/CS/G, puderam ser utilizados cinco vezes sem grandes perdas da atividade catalítica e das propriedades macroscópicas (conversão 61-36%).

✓ Após o armazenamento dos sistemas LPS/CS/G e LRO/CS/G a altas ou baixas temperaturas, as lipases permaneceram ativas e o oleato de *n*-pentila foi obtido com conversões de 50-22%.

## 6. PERSPECTIVAS

✓ Avaliar as possíveis interações entre os filmes de CS/G e as lipases através de espectroscopia de IV e análises térmicas (DSC, TGA).

✓ Preparar blendas de CS com outros materiais poliméricos e testar a sua utilização na imobilização de enzimas.

✓ Investigar a estabilidade das lipases LPS e LRO imobilizadas ou não em filmes de CS/G, em reações de esterificação de aminoácidos (D,L-alanina, L-cisteína e L-histidina) com álcoois alifáticos.

✓ Realizar a otimização das condições experimentais da reação do ácido oleico com *n*-pentanol através da metodologia de superfície de resposta<sup>22</sup>.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 1- Nelson D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., Worth Publishers: New York, **2000**.
- 2- Cygler, M.; Schrag, J. D.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1441, 205.
- 3- <http://www.rcsb.org/pdb>, acessada em 13/07/2006.
- 4- Campbell, M. K.; "*Biochemistry*", 2<sup>rd</sup> ed., Saunders College Publication, **1995**.
- 5- Solomons, T. W. G.; *Química orgânica*, LTC, RJ, **1996**.
- 6- Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, 2<sup>rd</sup> ed., John Wiley & Sons inc., New York, **1994**.
- 7- a- De Conti, R.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *Quim.Nova*, **2001**, 24(5), 672; b- Wong, C.; Whitesides, M.; *Enzymes in synthetic organic chemistry*, Pergamon, **1994**.
- 8- Thorleif A.; Elisabeth E. J.; et al.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2003**, 2, 55.
- 9- Faber, K.; *Biotransformation in organic chemistry.*, Springer-Verlag: Berlin, **1997**.
- 10 Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C.; *Biotechnol. Adv.*, **2001**,19, 627.
- 11- Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; *Annu. Rev. Microbiol.*, **1999**, 53, 315.
- 12- Alvarez-macarie, E.; Augir-magro; Guzzo, J.; Baratti, J.; *Biotechnol. Lett.*, **1999**, 21, 313.
- 13- Sarda, L. E.; Desnuelle, P.; *Biochim. Biophys. Acta.*, **1958**, 30, 513.
- 14- Castro, H. F.; Anderson, W. A.; *Quim. Nova*, **1995**, 18(5-6), 544.

- 
- 15- Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R. et al.; *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1999**, 29, 119.
- 16- [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com) , acessada em Junho 2006
- 17- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.*, 39, **2006**, 235.
- 18- Lopez, F.; Venditti, F.; Cinelli, G.; Ceglie, A.; *Process Biochem.*, **2006**, 41, 114.
- 19- Kroutil, W.; Hagmann, L.; Schuez, T. C.; Jungmann, V.; Pachlatko, J. P.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2005**, 32, 247.
- 20- Rustoy, E. M.; Baldessari, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 39, 50.
- 21- Queiroz, N.; Nascimento, M. G; *Tetrahedron Lett.*, 43, **2002**, 5225.
- 22- Rodriguez-Nogales, J. M.; Roura, E.; Contreras, E.; *Process Biochem.*, **2005**, 40, 63.
- 23- Gandhi, N. N.; *J. Am. Org. Chem. Soc.*, **2004**, 25, 197.
- 24- Winkler, F. K.; Gubernator, K.; *Structure and mechanism of human pancreatic lipase. In: Lipases, their structure, biochemistry and application*, Cambridge University Press, Cambridge, **1994**.
- 25- Chiou, S. H.; Wu, W.T.; *Biomaterials*, **2004**, 25, 197.
- 26- Petkar, M.; Lali, A.; Caimi, P.; Daminati, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 39, 83.
- 27- Fickers, P.; Fudalej, F.; Nicaud, J. M.; Destain, J.; Thonart, P.; *J. Biotechnol.*, **2005**, 115, 379.
- 28- Villeneuve. P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J. Et al.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2000**, 9(4), 113.
- 29- Munjal, N.; Sawheney, S. K.; *Microb. Technol.*, **2002**, 30, 619.

- 
- 30- Vecchia, R. D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quim. Nova*, **2004**, 27(4), 623.
- 31- Arica, M. Y.; *J. Food Eng.*, **2002**, 52, 367.
- 32- Ye, P.; Xu, Z. K.; Che, A. F.; Wu, J.; Seta, P.; *Biomaterials*, **2005**, 26(32), 6394.
- 33- Dave, R.; Madamwar, D.; *Process Biochem.*, **2006**, 41(4), 951.
- 34- Sangeetha, K.; Abraham.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 38, 171.
- 35- Gaur, R.; Pant, H.; Jain, R.; Khare, S.K.; *Food Chem.*, **2006**, 97, 426.
- 36- Hilal, N.; Kochkodan, V.; Nigmatullin, R.; Goncharuk, V.; Al-Khatib, L.; *J. Memb. Sci.*; **2006**, 198.
- 37- Konsoula, Z.; Liaskopoulou-Kyriakides, M.; *Process Biochem.*, **2006**, 41, 343.
- 38- Rocha, J. M. S.; Gil, M. H.; Gracia, F. A. P.; *J Biotechnol. Bioeng*, **1995**, 45, 187.
- 39- Lortie, R.; *Biotechnol. Ad.*, **1997**, 15(1), 1.
- 40- Zacks, A.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 3194.
- 41- Klibanov, A. M.; *Nature*, **2001**, 409(11), 241.
- 42- Bashheer, S.; Mogi, K.; Nakajima, M.; *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 45, 187.
- 43- Carta, G.; Gainer, J. L.; Benton, A. H.; *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, 37, 1004.
- 44- Triantafyllou, A. O.; Wehtje, E.; Adlercreuta, P. et al.; *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 45, 406.
- 45- Halling, P. J.; *Tibtechol.*, **1989**, 7, 50.
- 46- Dudal, Y.; Lortie, R.; *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 45, 129.
- 47- Gulati, R.; Arya, P.; Malhotha, B.; Prasad, A. K.; Saxena, R. K.; Kumar, J.; Watterson, A. C.; Parmar, V. S.; *Arkivoc*, **2003**, 3, 159.

- 
- 48- Affleck, R.; Haynes, C. A.; Clark, D. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, 89, 5167.
- 49- Affleck, R.; Xu, Z. F.; Suzawa, V. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, 89, 1100.
- 50- Lang, D.; Hofmann, B.; Haalck, L. et al.; *J. Mol. Biol.*, **1996**, 259, 704.
- 51- Gupta, M. N.; *Eur. J. Bio. Chem.*, **1992**, 203, 25.
- 52- Aires-Barros, M. R.; *Boletim de Biotecnologia*, **2002**, 72, 2.
- 53- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K. et al.; *Biotechnol. Bioeng.*, **1987**, 30, 81.
- 54-Vecchia, R. D.; Sebrão, D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V., *Process Biochem*, **2005**, 40, 2677.
- 55- Pilissão, C.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**,17, 428.
- 56- Coultate, T. P.; *Royal Society of Chemistry Paperbacks*, **1988**, 81.
- 57- Sgarbieri, V. C.; *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*, Livraria Varela Ltda, São Paulo, **1996**.
- 58- Amiot, J.; *Ciência y tecnologia de la Leche*, Ed. Acribia S.A..
- 59- Braun, P., Sutherland, J.P., *Int. J. Food Microb.*, **2004**, 95, 169.
- 60- Kheadr, E. E.; Vuillemand, J. C.; El-Deeb, S. A.; *Food Res. Int.*, **2002**, 36, 241.
- 61- Koti, R. M.; *Imobilização de Lipases em Filmes de Caseinato de Sódio* Trabalho de Conclusão- Departamento de Química – UFSC, **2002**.
- 62- Morita, T.; Assumpção, R.M.V.; *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*, Ed. Edgard Blucher, 2ª Ed., **1972**, 316.
- 63- Crespo, J.S.; Queiroz, N.; Nascimento, M.G.; Soldi, V.; *Process Biochem*. **2005**, 40(8), 401.

- 
- 64- Chen, Z. G.; Zong, M. H.; Li, G. J.; *Process Biochem.* **2006**, 41, 1514.
- 65- Sebrão, D.; Silva, V. D.; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A. *Quím. Nova* (Submetido-2006).
- 66- <http://www.amano-enzyme.co.jp>, acessada em Junho 2006.
- 67- Ficha técnica da lipase de *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas* sp, fornecida pelo Amano S/A.
- 68- Ye, P.; Xu, Z. K.; Wu, J.; Innocent, C.; Seta, P.; *Biomaterials*, **2006**, 27, 4169.