



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

imobilização de lipases em filmes de
poli(álcool vinílico) e carbOximetilcelulose.

GISELLE DE BOIT NUERNBERG

Orientadora: **Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento**

FLORIANÓPOLIS

SANTA CATARINA – BRASIL

FEVEREIRO DE 2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha família: Pai, Mãe, meus Avós, Jéssica e Michele, obrigado por estarem em minha vida, vocês moram no meu coração.

A minha orientadora Dra. Maria da Graça pela orientação, confiança e as oportunidades que me proporcionou, e em especial pela sua valiosa amizade. Obrigada!

Aos meus amigos em especial: Carina, Cristiane, Deise, Evandro, Karol, Renata e Vanessa. Aos grandes amigos do laboratório de biocatálise: Damiani, Marcelo, Patrícia, Roberto, Rogério, Sandra e Thiago, pelas conversas e brincadeiras, tornando muito mais que um simples ambiente de trabalho.

A Amano pela gentileza de ceder-nos as enzimas.

As pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte da minha vida.

A UFSC e ao CNPq pelo suporte e apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS E EQUAÇÕES	iv
ÍNDICE DE FIGURAS E ESQUEMAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	viii
1- INTRODUÇÃO	
1.1-Enzimas	1
1.2- Lipases- Classificação e fontes	4
1.3-Métodos de imobilização	7
1.4- Imobilização por adsorção	8
1.5-Ésteres	10
2-OBJETIVOS	
2.1-Objetivo geral	13
2.2- Objetivos específicos	13
3- PARTE EXPERIMENTAL	
3.1-Materiais e Reagentes	14
3.2-Preparação dos Materiais Poliméricos	15
3.2.1-Imobilização de lipases em filmes de CMC	15
3.2.2- Imobilização de lipases em filmes de PVA	16
3.2.3- Imobilização de lipases em blendas de CMC/PVA	16
3.3-Preparação do meio reacional - Procedimento geral	17

3.4-Determinação da percentagem de conversão e caracterização dos produtos	18
3.5-Determinação da quantidade de Água	18
4-RESULTADOS E DISCUSSÕES	
4.1-Seleção e estabilidade dos polímeros	19
4.2-Esterificação dos ácidos esteárico e láurico com n-pentanol, mediado pelas lipases LRO e LMJ na sua forma livre	20
4.3-Esterificação dos ácidos carboxílicos saturados com n-pentanol.	21
4.4- Esterificação dos ácidos carboxílicos insaturados com n-pentanol.	23
4.5-Esterificação dos álcoois de cadeias lineares com ácido láurico.	24
4.6-Esterificação do ácido láurico com álcoois de cadeias ramificadas.	26
4.7-Influência do solvente na esterificação do ácido láurico com n-pentanol em filmes de CMC utilizando a LRO.	27
5-CONCLUSÕES	29
6-PERSPECTIVAS	30
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

ÍNDICE DE TABELAS E EQUAÇÕES

Tabela 1	Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB	3
Tabela 2	Rendimentos analíticos da esterificação do retinol com succinato de dimetila em diferentes solventes	10
Tabela 3	Enzimas utilizadas	15
Tabela 4	Conversão em éster (%) a partir dos ácidos esteárico e láurico com n-pentanol com diferentes lipases	20
Equação 1		6
Equação 2		6
Equação 3		12
Equação 4		19

ÍNDICE DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura 1	Representação gráfica de um mecanismo de ação enzimática.	3
Figura 2	Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase da <i>Candida rugosa</i> .	4
Figura 3	Mecanismo proposto de hidrólise enzimática de um éster.	5
Figura 4	Métodos de Imobilização de enzimas.	8
Figura 5	Procedimento experimental utilizado na preparação dos filmes e blendas poliméricas.	16
Figura 6	Preparação do meio reacional e análise do produto.	17
Figura 7	Região do espectro de RMN ¹ H salientando os picos dos prótons metilênicos utilizados para o cálculo da percentagem de conversão em éster.	18
Figura 8	Valores de conversão em éster (%) em função dos ácidos carboxílicos e suportes utilizados com a LRO em n-hexano como solvente, à 35°C, por 24h.	21
Figura 9	Valores de conversão em éster (%) em função dos ácidos carboxílicos e suportes utilizados, com a LMJ em n-hexano, à 35°C, por 24h.	22
Figura 10	Valores de conversão em éster (%) em função dos ácidos carboxílicos insaturados e suportes utilizados com a LRO em n-hexano, à 35°C, por 24h.	23
Figura 11	Valores de conversão em éster (%) em função dos ácidos carboxílicos insaturados e suportes utilizados com a LMJ em n-hexano, à 35°C, por 24h.	24
Figura 12	Valores de conversão em éster (%) em função dos álcoois saturados e suportes utilizados com a LRO em n-hexano, à 35°C, por 24h.	25
Figura 13	Valores de conversão em éster (%) em função dos álcoois saturados e suportes utilizados com a LMJ em n-hexano, à 35°C, por 24h.	26

Figura 14	Valores de conversão em laurato de n-pentila (%) em função da polaridade do solvente (log P) com a LRO imobilizada em CMC, à 35°C.	27
Esquema 1	Reação de esterificação do retinol (1) com succinato de dimetila (2) catalisada por lipases	10
Esquema 2	Mecanismo de formação da ligação éster catalisada por ácido	12

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Asp	Aspartato
ccd	Cromatografia de Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CMC	Carbóximetilcelulose
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
Glu	Glutamato
His	Histidina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
LMJ	Lipase de <i>Mucor javanicus</i>
Log P	Logaritmo do Coeficiente de Partição
LPP	Lipase Pancreática do Porco
LRO	Lipase de <i>Rizopus orizae</i>
PM	Peso Molecular
PVA	Poli(álcoolvinílico)
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TGA	Análise Termogravimétrica
Ser	Serina
TMS	Tetrametilsilano
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

RESUMO

As enzimas em sua maioria são catalisadores de natureza protéica. São versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para vários tipos de reações orgânicas. Técnicas de imobilização vem sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade para enzimas em meio orgânico, facilitando sua recuperação e reutilização.

O ponto de partida desse trabalho foi a imobilização das lipases de *Rhizopous oryzae* (LRO, 50mg - 150000u/g) ou de *Mucor javanicus* (LMJ, 50mg - 10000u/g) em filmes de carbóximetilcelulose(CMC,500mg em 25mL de água), poli(álcool vinílico) (PVA, 500mg em 25mL de água) e de PVA/CMC (250 mg de cada polímero em 25mL de água) e a utilização desses sistemas na catálise de reações de esterificação em quantidades equimolares de ácido e álcool, utilizando n-hexano como solvente externo.

Primeiramente foram feitas reações utilizando as LRO e LMJ livres como biocatalisadores na esterificação dos ácidos láurico e esteárico com n-pentanol. Foram efetuados também estudos de esterificação dos ácidos decanóico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico com n-pentanol utilizando a LRO e a LMJ imobilizadas em filmes de CMC, PVA e CMC:PVA(1:1). A maioria dos ésteres formaram-se em rendimentos quantitativos, exceto para os ácidos decanóico e mirístico que apresentaram 51% e 68% respectivamente de conversão em éster quando foi utilizado o sistema LRO/CMC:PVA.

Na sequência foram feitas reações de esterificação dos ácidos insaturados 4-pentenóico, sórbico, 2-octenóico, linoleico e oleico com o n-pentanol. Os resultados obtidos mostraram que de forma geral os ésteres derivados do ácido oleico foram obtidos em maiores conversões (>90%). Também, pode-se destacar o resultado obtido na esterificação do ácido linoleico com o sistema LRO/CMC (72%).

Na continuidade do trabalho, efetuaram-se estudos de esterificação do ácido láurico com etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, octanol, decanol e octadecanol, utilizando as enzimas LRO e LMJ, imobilizadas em filmes de CMC, PVA e CMC:PVA. As melhores conversões em ésteres foram obtidas para álcoois de 2 a 5 átomos de carbono (>99%) em todos os sistemas. Para os álcoois de cadeia maiores as conversões foram de aproximadamente 80% com a LMJ imobilizada. Fêz-se também um estudo de esterificação do ácido láurico com os álcoois ramificados como o isopropanol, terc-butanol e isobutanol utilizando os sistemas descritos anteriormente. Nestas reações de esterificação não foram detectadas a formação de produtos, evidenciando a importância de efeitos estéreis.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a viabilidade do uso de lipases imobilizadas em materiais poliméricos para a obtenção de ésteres alquílicos de cadeias médias e longas com bons rendimentos, e em condições brandas de reação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas

Enzimas são proteínas que catalisam muitas reações biológicas **in vivo**.¹ Elas agem como catalisadores eficientes capazes de aumentar muito a velocidade da reação, sobre as reações não catalisadas. As enzimas são altamente específicas e capazes de diferenciar estereoisômeros de certos compostos, além de serem finamente ajustadas por meio de regular o processo.

As características de uma enzima é a sua relativa instabilidade em meio orgânico, alto custo, o que leva a algumas limitações de seu uso na síntese catalítica.²

Por outro lado, enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São versáteis, existindo um processo enzimático equivalente com os vários tipos de reações orgânicas. Diversos processos no metabolismo animal são regidos pelas enzimas. As vantagens de utilizá-las como catalisadores são:³

- ✓ **Alta velocidade de reação:** As velocidades de reações catalisadas, por enzimas, podem ser de 10^6 a 10^{12} vezes mais rápidas que as correspondentes não catalisadas.
- ✓ **Atuam em condições suaves:** As reações, em geral, ocorrem em condições suaves de temperatura, abaixo de 100°C , sob pressão atmosférica e em meio de pH e concentração salina praticamente constante. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização, rearranjos, etc..., que freqüentemente permeiam a metodologia tradicional.
- ✓ **Apresentam diversos tipos de seletividade:** quimiosseletividade, regioseletividade e diastereoseletividade, e também enantioseletividade. Nas reações, raramente formam-se subprodutos.
- ✓ **Capacidade de regular processos:** A atividade catalítica de muitas enzimas varia dependendo da concentração de outras substâncias que não são seus substratos.

✓ **Catalisam um grande número de reações:** Como aceleram a velocidade da reação sem alterar o equilíbrio termodinâmico, elas podem catalisar um grande número de reações.

Porém, estes biocatalisadores apresentam algumas desvantagens, tais como:

- São encontrados na natureza só em uma forma enantiomérica, a forma L.
- Requerem controle dos parâmetros reacionais tais como temperatura e pH.
- Apresentam uma maior atividade catalítica em água;
- São propensos a sofrer inibição por agentes químicos e físicos.
- Podem causar alergias.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBMB) divide as enzimas em seis grandes classes, e cada uma em subclasses de acordo com o tipo de reação que a mesma catalisa. (Tabela 1).⁴

Tabela 1 – Classificação das enzimas de acordo com a UIBMB.(ref)

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

Entretanto, a aplicação em química orgânica se restringe a cinco grupos, e as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas por não requerem cofatores.

A função de um catalisador é diminuir a barreira de energia entre os reagentes e produtos. Esta habilidade é devido à capacidade de aproximar os substratos em uma orientação tal que favoreça a formação do complexo enzima-substrato (ES), para posteriormente formar os produtos (Figura 1).⁴

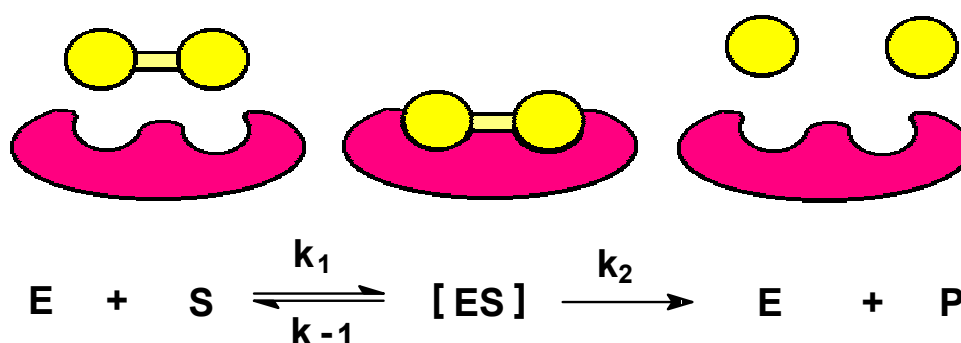


Figura 1 - Representação gráfica de um mecanismo de ação enzimática.

1.2 Lipases - Classificação e Fontes

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. 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.^{5,6}

Estudos de raio-X mostram que as lipases apresentam uma estrutura tridimensional formada por uma tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas.

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disto, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificação, transterificações (acidólise, intereterificação, alcóólise), aminólise e tiotransterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade.

A **Figura 2**, mostra a representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de *Candida rugosa* cujo sitio ativo é composto pela tríade Ser209, His449 e Glu341, e está localizado no topo de uma β -folha próximo ao centro.⁷

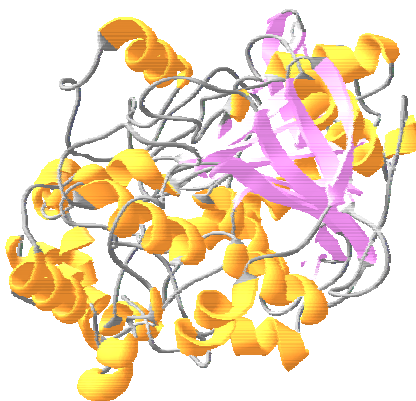


Figura 2 – Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase da *Candida rugosa*.⁷

As α/β hidrolases apresentam um mecanismo catalítico comum para a hidrólise de ésteres, o qual consiste em cinco etapas subseqüentes. A primeira consiste na ligação ao substrato, éster. A segunda a formação do primeiro intermediário tetraédrico através do ataque do resíduo de serina. O oxianion formado é estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio e este é denominado de “cavidade oxianion”. A terceira, o rompimento da ligação éster. Na quarta etapa ocorre a saída da porção álcool. Como última etapa, a hidrólise do complexo acil-enzima é realizada com a liberação dos produtos.⁸ (Figura 3)

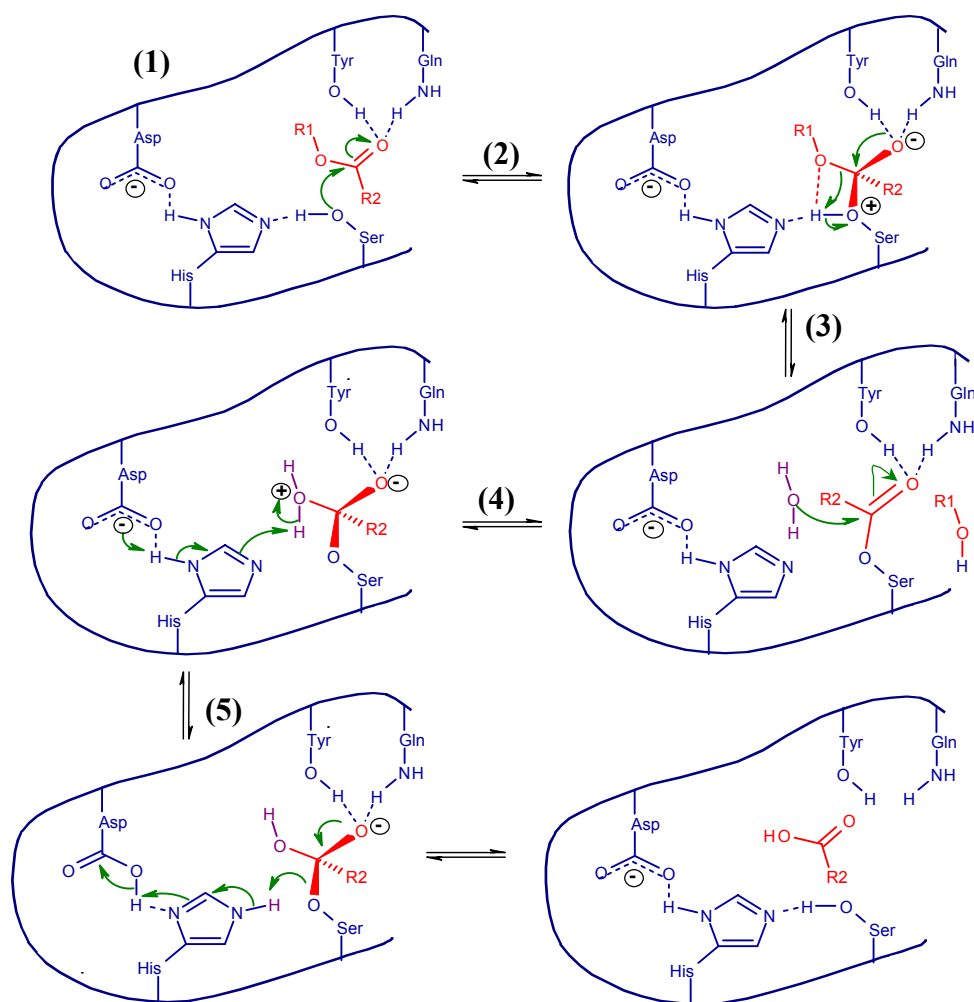
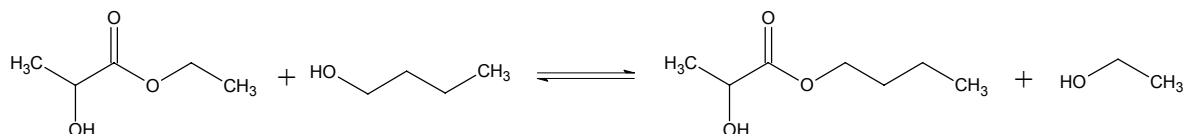


Figura 3 – Mecanismo proposto de hidrólise enzimática de um éster.

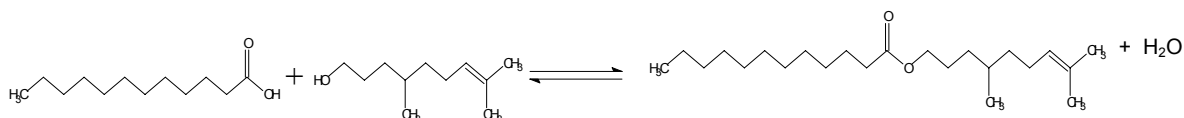
Diversos trabalhos de pesquisa estão sendo realizados, visando a otimização e o desenvolvimento de processos em escala industrial para síntese de diversos ésteres de valor comercial. Recentemente, Pirozzi e Greco investigaram a síntese do lactato de butila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* via transesterificação do lactato de etila.⁹ **Equação 1**



Eq.1

Outro exemplo, é o trabalho realizado por Yadav e Lathi, que fizeram um estudo da síntese do laurato de citronela catalisada pela mesma lipase.¹⁰

Equação 2



Eq.2

Os ésteres de ácidos graxos e de terpenos são empregados na formulação de fármacos, cosméticos e alimentos, devido a suas propriedades higroscópicas, emulsificantes e esfoliantes.

O uso de lipases em processos de interesterificação é no aproveitamento de óleos de baixo custo para produção de análogos de manteiga de cacau. A manteiga de cacau é um tipo de aditivo, que confere ao chocolate as características necessárias de cristalização e fusão. Geralmente, os produtos de chocolate contêm 30% de manteiga de cacau. Esta, tendo um custo bem elevado, levou o setor alimentício a buscar soluções mais econômicas para a sua substituição no processo, tendo os chamados análogos de manteiga de cacau alcançando uma posição de destaque, sob ponto de vista técnico e econômico, para aplicação na produção de chocolates e seus derivados.¹¹

1.3 Métodos de imobilização de enzimas

Muitas enzimas não são suficientemente estáveis, diminuindo sua condição operacional e perdendo a atividade catalítica, sendo adequado para autoxidação, auto-digestão, e/ou desnaturação por meio do solvente. Visto que as enzimas são solúveis em água, seu uso repetitivo é importante para assegurar processos econômicos, porém problemático pelo próprio fato de que dificultam sua recuperação a partir de sistemas aquosos e a separação a partir de substratos e produtos.

Para minimizar estes problemas, foram desenvolvidas técnicas de imobilização. Estas tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade e seletividade em solventes orgânicos.¹²

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais bem como modificações no sítio ativo.

As vantagens da imobilização, é que estas em geral, aumentam a estabilidade das enzimas, são de baixo custo, fáceis de separá-las, recuperá-las e reutilizá-las, o que possibilita operações contínuas. Em alguns casos verifica-se um aumento na atividade enzimática.^{12, 13}

As enzimas quando imobilizadas retêm sua configuração estrutural devido as ligações de hidrogênio que ocorrem na superfície do material. Isto leva a uma certa dificuldade de vibração da enzima, aumentando assim sua estabilidade térmica.¹³

A **Figura 4**, mostra os principais métodos de imobilização de enzimas.³

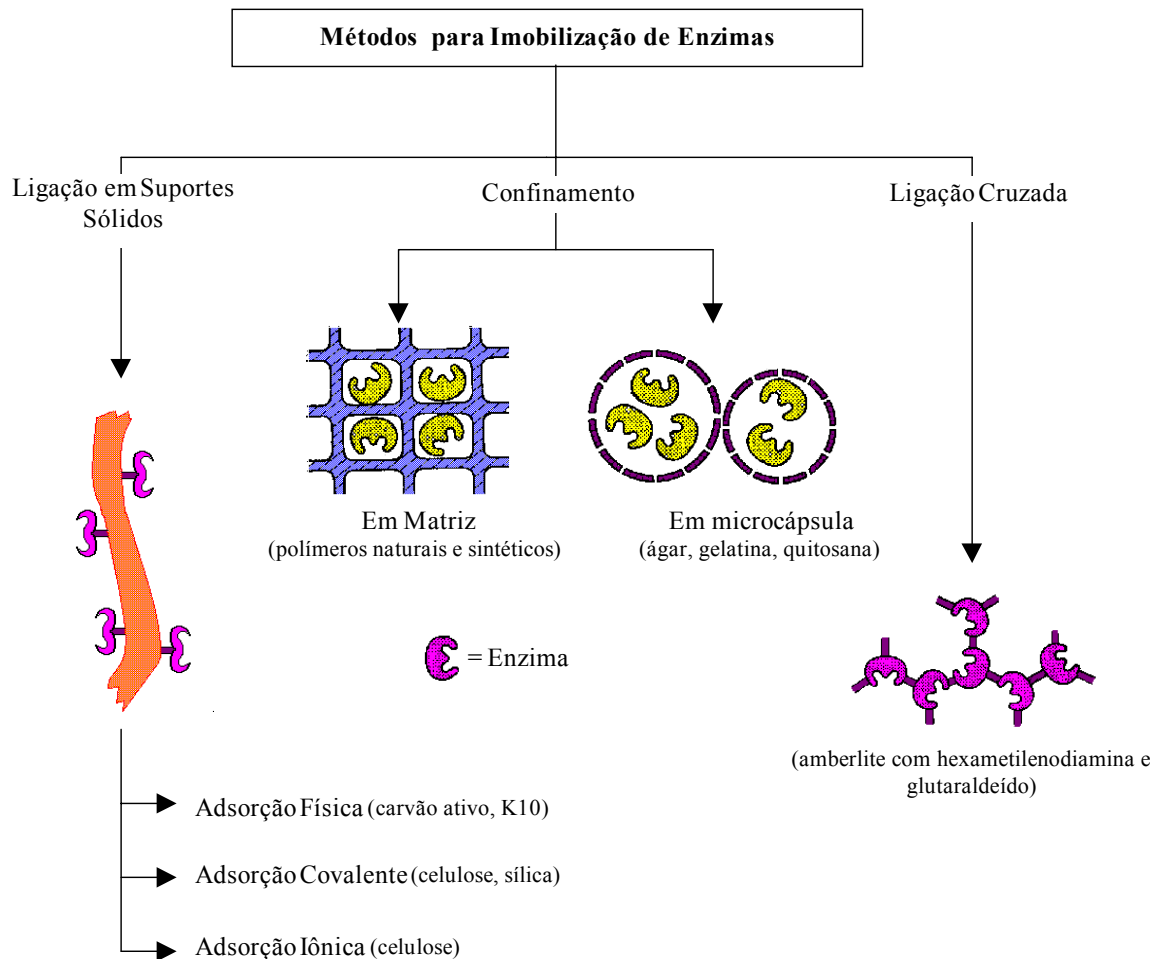


Figura 4 - Métodos de imobilização de enzimas

Neste trabalho, lipases foram imobilizadas em materiais poliméricos através do método de adsorção, e a seguir será feita uma breve descrição deste método.

1.4 Imobilização por adsorção

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. A escolha de um deles depende de suas propriedades como força

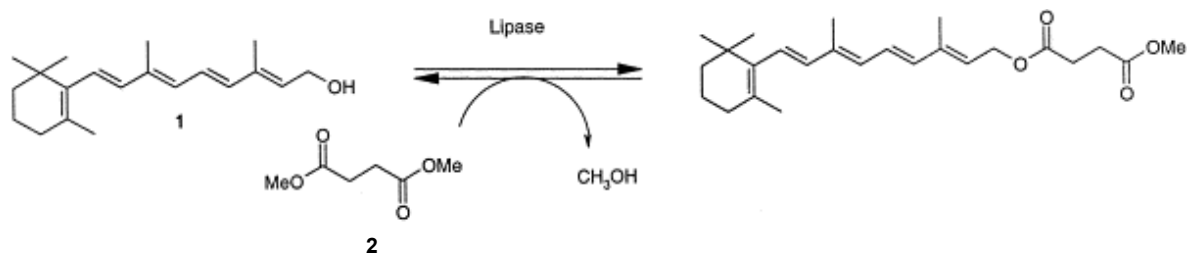
mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo.¹³

A eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte depende de vários parâmetros tais como, tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente, e principalmente da porosidade e tamanho do poros em que a enzima é adsorvida no interior deste. Depende também da concentração da enzima por massa do suporte. Em geral, este processo, é realizado em temperatura constante.¹⁴

Na literatura existe um grande número de publicações com aplicações de lipases imobilizadas por adsorção física.

Abbas e Comeau verificaram a habilidade catalítica da lipase da *Mucor sp* imobilizada em Amberlite IRC50 na síntese de ésteres aromáticos em ciclohexano a 30°C. Os ácidos propiônico, butírico e capríco, e os álcoois metanol, etanol, alílico, butanol, isoamílico, geraniol, citronelol e farnesol foram utilizados em quantidades equimolares. Os rendimentos foram diferenciados dependendo da afinidade da lipase em relação a cadeia do ácido e/ou do álcool. Conversões rápidas e com altos rendimentos, 92 e 98% foram observadas para o caprato de metila e caprato de etila, respectivamente após 4h de reação. Rendimentos de 95, 100 e 93% foram obtidos para o butirato de butila, caprato de butila e caprato de alila, respectivamente após 24h de reação.¹⁵

Maugard e Legov, estudaram a esterificação do retinol (Vitamina A) com succinato de metila utilizando as lipases de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica, a de *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina aniônica Duolite 568N, e as Pancreática de Porco (LPP), *Candida rugosa* e de *Rhizopus arrizus* na forma livre. Esta reação é dependente do solvente, e é o primeiro processo descrito para a síntese de um derivado do retinol. O produto obtido é um carreador de ácido láctico.¹⁶ (Esquema 1)



Esquema 1 - Reação de esterificação do retinol (1) com succinato de dimetila (2) catalisada por lipases.

Tabela 2 - Rendimentos analíticos da esterificação do retinol com succinato de dimetila em diferentes solventes.

Solvente	Rend.(%) ^a LCA	Rend.(%) LRM	Tempo(h)
n-hexano	75	77	50
4-metil-2-pentanona	26	20	50
álcool terc-amílico	24	17	50
dioxano	8	2	50
2- butanona	0	0	50
cicloexanona	0	0	50

(a) O grau de conversão foi determinado por HPLC através do consumo dos substratos. Não foi observada formação de produto na ausência de enzima.

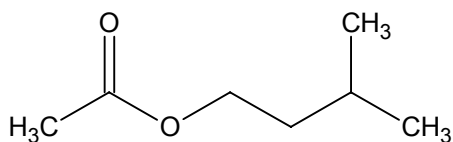
A análise da **Tabela 2** mostra que a esterificação do retinol foi dependente da natureza do solvente utilizado. Os autores salientam que este é o primeiro processo enzimático descrito, na síntese de éster derivado do retinol, com excelentes rendimentos.

1.5 Ésteres

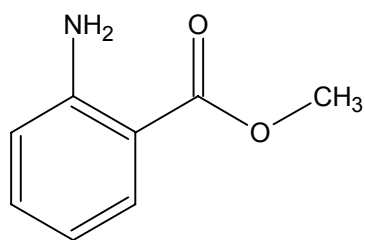
Os ésteres (RCOOR') são compostos orgânicos que apresentam-se bem distribuídos na natureza. Muitos deles são ésteres de glicerina, chamados glicerídeos e são os constituintes principais dos óleos e das gorduras. Encontram-se também em diversas essências de frutas e nestes casos são constituídos de

ácidos monocarboxílicos de baixo peso molecular e álcoois de cadeia alquílicas longas . Os ésteres de cadeia curta, têm odor característico de frutas e flores, tendo, portanto, grande aplicação industrial como flavorizantes e aromatizantes além de estarem presentes em bebidas fermentadas, como no caso de vinhos, onde pode-se identificar muitos acetatos, propionatos, hexanoatos e outros.¹⁷

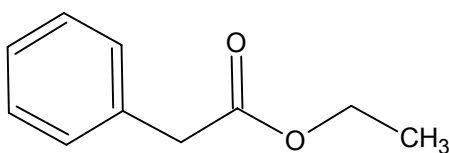
Por exemplo:



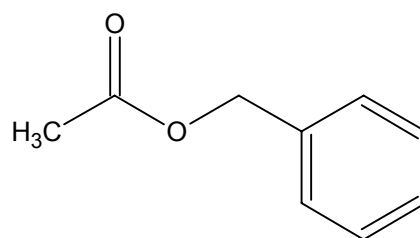
Acetato de Isoamila (banana)



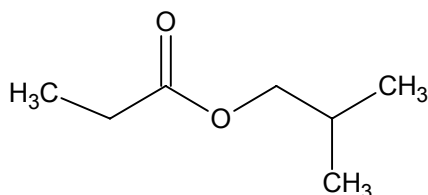
Antranilato e Metila (uva)



Fenilacetato de Etila (mel)



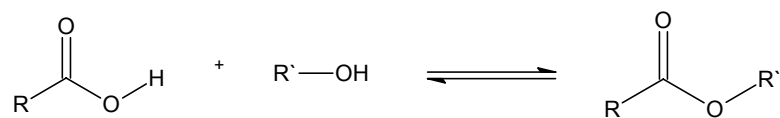
Acetato de Benzila (pêssego)



Propionato de Iso-butila (rum)

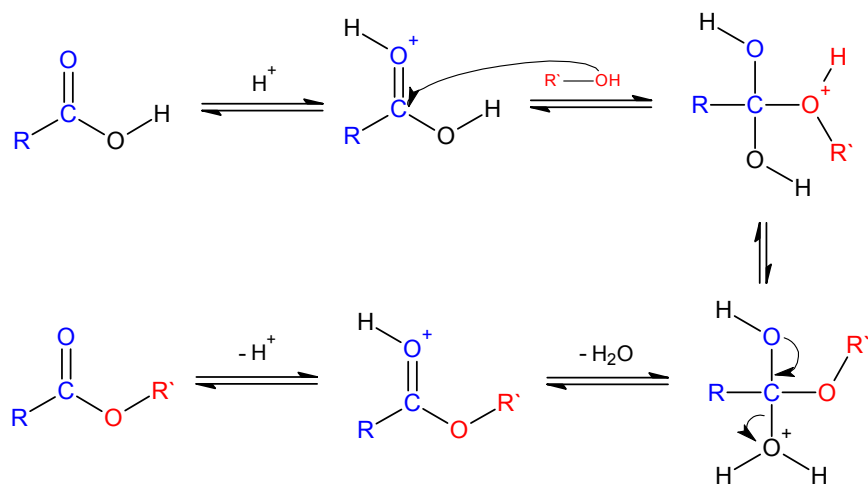
Além deste uso, muitos ésteres e diésteres têm aplicações na síntese de medicamentos. Como exemplo, na rota sintética do fenobarbital há a presença de dois diésteres, o oxalato de dietila e o fenilmalonato de dietila.¹⁸

Os ácidos carboxílicos reagem com álcoois para formar ésteres através de da reação de condensação conhecida como esterificação, **Equação 3**;



Eq.3

As reações de esterificação podem ser catalisadas por ácidos ou bases. O rendimento desta pode ser incrementado pela remoção de água da mistura reacional assim que é formada.¹⁹ **Esquema 2**



Esquema 2 - Mecanismo de formação da ligação éster catalisada por ácido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Utilizar os materiais poliméricos carbóximetilcelulose (CMC) e poli(álcool vinílico) (PVA) puros ou em blendas, para a imobilização das lipases de *Rizopus orizae* (LRO) e *Mucor javanicus* (LMJ) e utilização na síntese de ésteres alifáticos em solvente orgânico.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar filmes e blendas poliméricas com os diferentes polímeros (CMC e PVA);
- ✓ Determinar a quantidade de água (Método de Karl-Fisher);
- ✓ Avaliar macroscopicamente a estabilidade dos filmes em diversos solventes orgânicos
- ✓ Imobilizar as lipases LRO e LMJ nos filmes de CMC, PVA e blendas de CMC:PVA (1:1)
- ✓ Avaliar a influência do tamanho da cadeia alquílica do ácido carboxílico e do álcool, utilizando as lipases LRO e LMJ imobilizadas nos materiais poliméricos descritos acima;
- ✓ Reutilizar estes sistemas e comparar com as lipases na forma livre (não imobilizadas).

3. EXPERIMENTAL

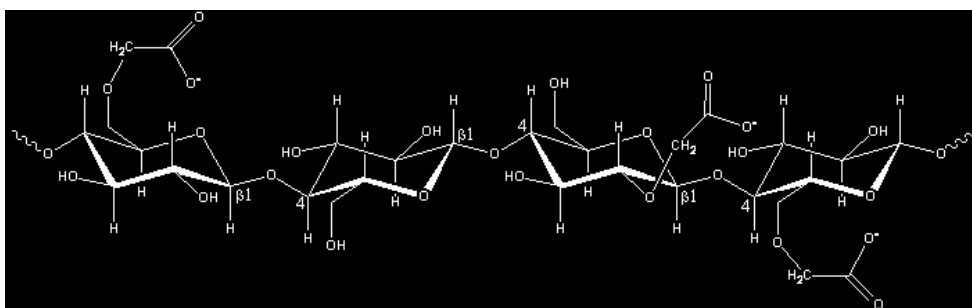
3.1 Materiais e Reagentes

Neste trabalho, os polímeros foram utilizados sem purificação prévia. As estruturas dos monômeros estão relacionadas abaixo e o valor do peso molecular (PM) foi fornecida pelo fabricante.

PVA: [poli(álcool vinílico). PM= 7200, Vetec, lote 970745



CMC: carbóximetilcelulose, PM médio de 250.000, Synth, lote 36755



Os solventes e reagentes de grau PA, são das seguintes procedências:

- **Aldrich:** ácido palmítico, ácido trans- 2-octenóico.
- **Merck:** ácido oléico, 2- butanol, tolueno, cicloexano.
- **Sigma-Aldrich:** 1-hexanol, 1-octadecanol.
- **CAQ:** álcool propílico normal, clorofórmio, diclorometano.
- **Sigma:** ácido esteárico, ácido mirístico, ácido linoleico, ácido 4- pentenóico.
- **Vetec:** ácido láurico, ácido sórbico, n-butanol, n-pentanol, acetona, heptano.
- **Grupo Química:** i-propanol, etanol.
- **BDH:** 1-octanol.
- **Dinâmica:** éter etílico.
- **Quimibrás:** acetato de etila, álcool butílico.
- **F. Maia:** hexano.

As enzimas utilizadas neste trabalho estão apresentadas na **Tabela3**.

Tabela 3 – Enzimas utilizadas.

Fonte de lipase	Sigla	Atividade	Fornecedor/Lote
<i>Rhizopus oryzae</i>	ROL	150,000 U g ⁻¹ (a)	Amano/LFY1050362
<i>Mucor javanicus</i>	MJL	10,000 U mg ⁻¹ (a)	Amano/LMV01528

(a)1 unidade de lipase (u) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido graxo por minuto, utilizando-se óleo de oliva como substrato, a pH 7,0 e 37°C.²⁰

3.2 Preparação dos materiais poliméricos

3.2.1 Imobilização de lipases em filmes de CMC

Em um béquer dissolveram-se 500 mg de CMC em 25 mL de água com agitação manual até total dissolução do polímero. Após este período, 50mg de lipases dissolvida em 1 mL de água foi adicionada, e o sistema é agitado por mais 3 min. A solução resultante foi depositada em uma placa de poli(etileno) e evaporou-se o solvente à temperatura ambiente. Desta forma obteve-se o filme de CMC após evaporação da água. O filme de CMC contendo a enzima é retirado, cortado em pequenas secções e guardado em solvente orgânico para uso posterior nas reações de esterificação.

A **Figura 5**, mostra o procedimento experimental utilizado para a preparação dos filmes de CMC,PVA e CMC:PVA(1:1).

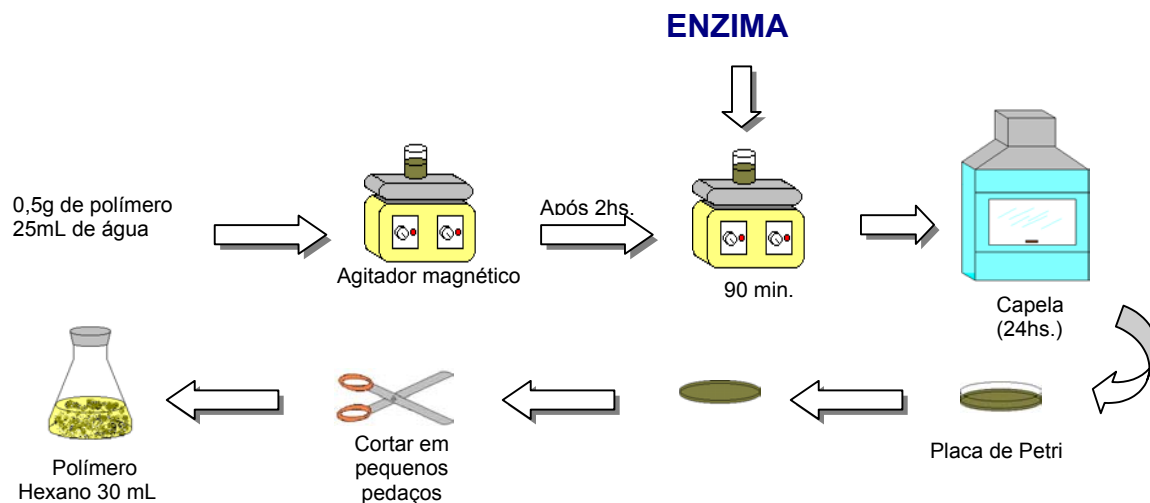


Figura 5 - Procedimento experimental utilizado na preparação dos filmes e blendas poliméricas.

3.2.2 Imobilização de lipases em filmes de PVA

Em um béquer dissolveram-se 500 mg de PVA em 25 mL de água com agitação constante por 3 horas a 40°C até total dissolução do polímero. Após este período, 50mg de lipases dissolvida em 1 mL de água foi adicionada, e o sistema é agitado por mais 3 min. Para a formação e obtenção do filme, seguiu-se o mesmo procedimento citado anteriormente para o de CMC. (**Figura 5**)

3.2.3 Imobilização de lipases em blendas de CMC/PVA.

Em um béquer dissolveram-se 250 mg de PVA em 12.5 mL de água com agitação constante por 3 horas a 40°C. Separadamente dissolveram-se 250 mg de CMC em 12.5 mL de água com agitação manual até total dissolução do polímero. Após dissolução, as soluções foram misturadas e agitou-se por 5 min. Após este período, 50mg de lipase dissolvida em 1 mL de água foi adicionada, e o sistema agitado por mais 3 min. Para a obtenção da blenda, seguiu-se o mesmo procedimento citado anteriormente para o de CMC. (**Figura 5**)

3.3 Preparação do meio reacional – Procedimento geral

Os filmes e blendas obtidas foram cortados em secções de volumes iguais de aproximadamente 3-4 mm³. Em seguida, estes foram colocados em um erlenmeyer contendo 25 mL de solvente orgânico. Os reagentes envolvidos na reação de esterificação foram adicionados na proporção 1:1, à 35°C.

O sistema permaneceu sob agitação suave em um banho-maria termostaticado (tipo Dubnoff) de acordo com o tempo de cada reação. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada utilizando como eluente hexano:acetato de etila (1:1). Ao término da reação, os produtos e substratos remanescentes foram separados do filme e/ou blenda, através de decantação, sendo este lavado várias vezes com solvente orgânico para remover os reagentes remanescentes e produtos. O solvente orgânico foi evaporado em um rotaevaporador, e os produtos obtidos analisados e caracterizados por ressonância magnética de hidrogênio (RMN-¹H). Para fins comparativos, foram feitos testes com as lipases não imobilizadas (forma livre).

Foram efetuadas também reações controle, isto é sob as mesmas condições experimentais descritas acima, mas sem a presença de enzima.

A **Figura 6**, mostra o procedimento experimental descrito acima.

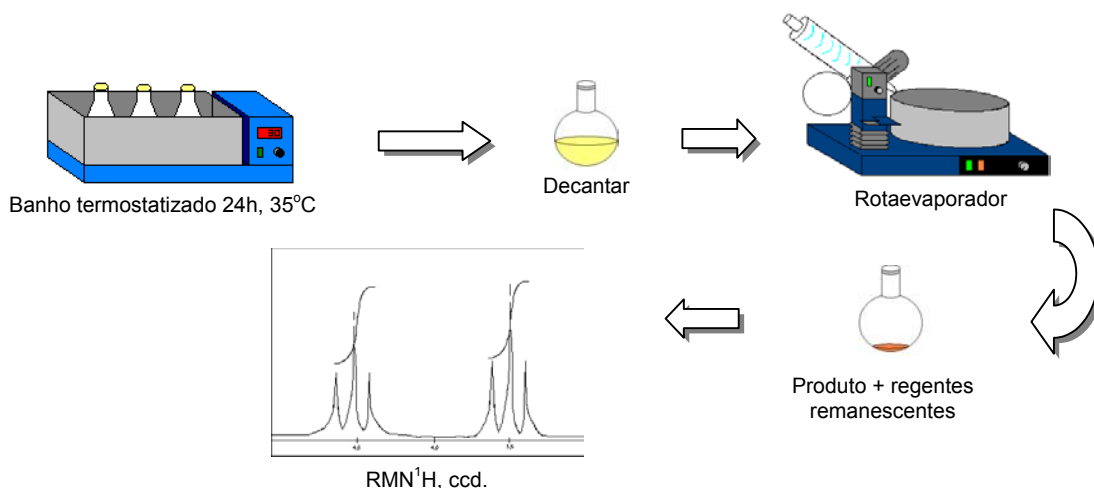


Figura 6 - Preparação do meio reacional e análise do produto.

3.4 Determinação da conversão (%) e caracterização dos produtos

A pureza dos produtos foi determinada por cromatografia de camada delgada (ccd), na qual utilizou-se sílica gel como fase estacionária e uma mistura de n-hexano: acetato de etila (9:1) como eluente. Os valores de Rf para os ésteres variaram de 0,60 - 0,80.

As percentagens de conversão em produtos foram quantificadas por RMN¹H (BRUCKER AC 200MHz), utilizando CDCl₃ como solvente e tetrametilsilano(TMS) como referência interna. Estas foram calculadas comparando a integração do triplete metilênico do álcool correspondente (HO-CH₂-R') em ~ 3,2 ppm , com o triplete metilênico do éster (-OCH₂-CH₂R') em ~ 4,1 ppm.

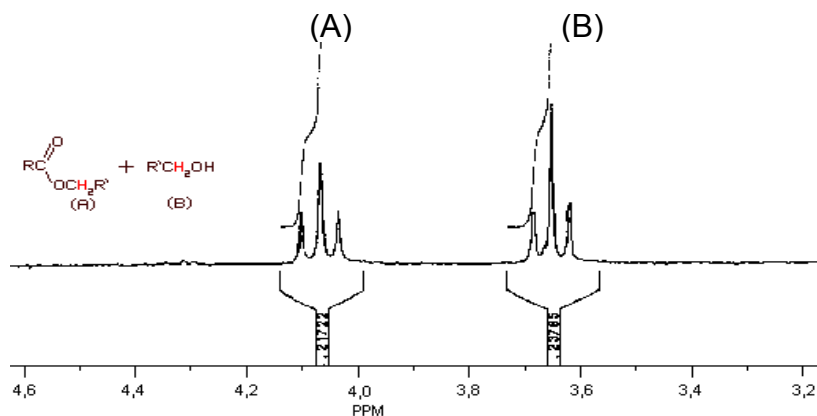


Figura 7 - Região do espectro de RMN¹H salientando os picos dos prótons metilênicos utilizados para o cálculo da percentagem de conversão em éster.

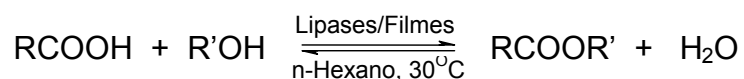
3.5 Determinação da quantidade de água (%) nos filmes poliméricos

A quantidade de água presente nos filmes após evaporação e a temperatura ambiente (item 4.2.1), foi determinada por titulação pelo método de Karl Fischer (633 Automático Karl Fischer titrator, Metrohm AG CH-9100 Herisau). A massa dos filmes utilizada foi de 500 mg. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como média destes valores. Ítem 4.1

4. Resultados e Discussões

Neste trabalho foi avaliado o uso de CMC, PVA e blenda CMC:PVA(1:1) como suportes para imobilização das lipases LRO e LMJ. Estes sistemas foram utilizados como biocatalisadores em reações de esterificação. **(Equação 4)**

Foi verificada a estabilidade em diversos solventes orgânicos e determinou-se a quantidade de água nos filmes, bem como efetuaram-se testes de reutilização.



R = C₁₇H₃₅, C₁₅H₃₁, C₁₃H₂₇, C₁₁H₂₃, C₁₇H₃₁, C₁₇H₃₃, C₅H₇, C₄H₇, C₇H₁₃

R' = C₂H₅, C₃H₇, C₄H₉, C₅H₁₁, C₆H₁₃, C₈H₁₇, C₁₈H₃₇

Eq.4

4.1 Seleção e estabilidade dos polímeros

Após a preparação dos filmes, estes foram submetidos a uma análise do teor de água (Karl Fischer) e a testes de estabilidade macroscópica em diferentes solventes. No primeiro experimento os resultados demonstraram que após 24h e à temperatura ambiente o filme de PVA apresentou aproximadamente 8%, o filme de CMC 21% e a blenda polimérica 7% de sua massa em água.

Esta quantidade de água é necessária e fundamental para a manutenção da estrutura terciária das proteínas e de sua atividade.

Na seqüência os filmes foram cortados e transferidos para recipientes herméticamente fechados e colocados em contato com diferentes solventes dentre eles: acetona, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio, acetonitrila, cicloexano, heptano, tolueno a temperatura ambiente por 24 h. Após este período não foi observada qualquer alteração macroscópica nos filmes decorrentes da ação dos diferentes solventes, exceto em tolueno, no qual o filme de CMC apresentou sinais de deterioração.

Após estes testes, os filmes foram utilizados para imobilização de lipases de diferentes fontes e os sistemas empregados em reações de esterificação.

4.2 Esterificação dos ácidos esteárico e láurico com n-pentanol mediado pelas lipases LRO e LMJ na sua forma livre

Primeiramente, foram feitas reações utilizando as LRO e LMJ livres como biocatalisadores na esterificação dos ácidos láurico e esteárico com n-pentanol utilizando n-hexano como solvente externo. Fêz-se também a reutilização destas lipases e as reações controle, isto é sem adição de enzima. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Conversão em éster (%) a partir dos ácidos esteárico e láurico com n-pentanol com diferentes lipases.

Ácidos	LRO livre	LMJ livre	Reut.LRO	Reut.LMJ	S/enzima
Esteárico	96	81	n. d.	89	n. d.
Láurico	37	79	n. d.	60	n. d.

Hexano 35°C, 24h. (a) determinado por RMN¹H, n. d. = não detectado.

Os resultados mostram que as maiores conversões em éster foram obtidas nas reações com a LRO e a LMJ, nas suas formas livres com o ácido esteárico. Com o ácido láurico os melhores resultados foram obtidos com a utilização da LMJ.

Quando as lipases foram reutilizadas, somente as reações com a LMJ apresentam rendimentos em éster, demonstrando que esta foi mais resistente ao meio hidrofóbico que a LRO. Este comportamento pode também ser devido à uma maior afinidade desta enzima com o substrato e/ou produto formado.

Deve-se ressaltar que na ausência de lipases e nas mesmas condições experimentais, não houve a formação do éster, o que demonstra a importância do biocatalisador nesta reação.

Outro resultado interessante deste experimento, é que a LRO perde completamente sua atividade após a primeira reutilização, dificultando e tornando mais caros os processos biocatalíticos contínuos.

4.3 Esterificação de ácidos carboxílicos saturados com n-pentanol

Foram efetuados estudos da esterificação dos ácidos decanóico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico com n-pentanol utilizando a LRO e a LMJ immobilizadas em filmes de CMC, PVA e CMC:PVA(1:1). Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 8 e 9**.

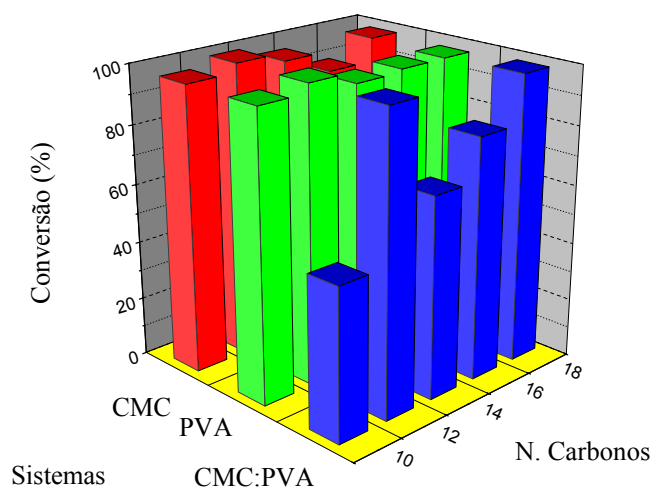


Figura 8 - Valores de conversão em éster (%) em função dos ácidos carboxílicos e suportes utilizados com a LRO em n-hexano como solvente, à 35°C, por 24h.

Através dos resultados apresentados na **Figura 8**, observa-se que a maioria dos ésteres formados apresentaram rendimentos quantitativos, exceto para os ésteres dos ácidos decanóico e mirístico que formaram-se com 51% e 68%, respectivamente quando foi utilizado o sistema LRO/CMC:PVA.

De forma geral, os resultados obtidos demonstraram grande afinidade do sistema com os substratos utilizados.

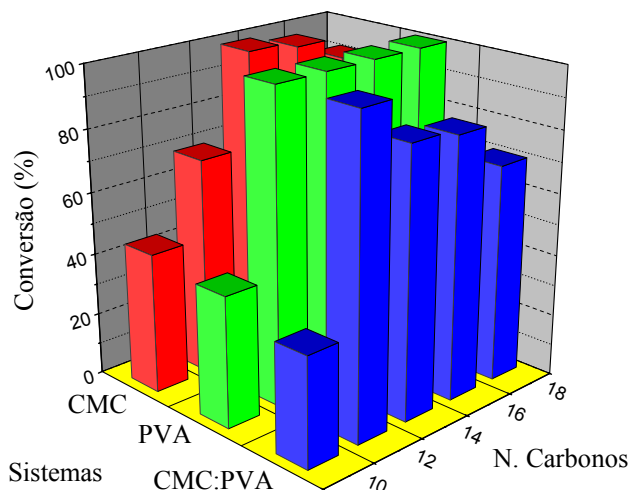


Figura 9 - Valores de conversão em éster (%) em função dos ácidos carboxílicos e suportes utilizados, com a LMJ em n-hexano, à 35°C, por 24h.

Pôde-se verificar através dos resultados apresentados na **Figura 9** que a maioria dos ésteres formados pelas reações catalisadas pela LMJ imobilizada em filmes de CMC, PVA e CMC:PVA apresentaram rendimentos de aproximadamente 90%, também indicando grande afinidade do sistema (suporte/enzima) com estes substratos. Para o ácido decanóico os valores de conversão foram de ~50% em éster, evidenciando assim prováveis efeitos estéreos e/ou hidrofóbias.

A comparação dos resultados apresentados nas duas figuras, demonstrou que com a LRO imobilizada em filmes de CMC, PVA, CMC:PVA, obtem-se ésteres alquílicos de cadeias longas (>10 átomos de carbono) com bons rendimentos sendo portanto uma alternativa viável para a obtenção dos mesmos.

Ésteres derivados do ácido oleico são encontrados no óleo de baleia e possui importantes aplicações em indústrias de cosméticos, lubrificantes, alimentos e fármacos.¹¹

4.4 Esterificação dos ácidos carboxílicos insaturados com n-pentanol

Na sequência foram feitas reações de esterificação dos ácidos insaturados 4-pentenóico, sórbico, trans-2-octenóico, linoleico e oleico com o n- pentanol. Os resultados estão demonstrados nas **Figuras 10 e 11**.

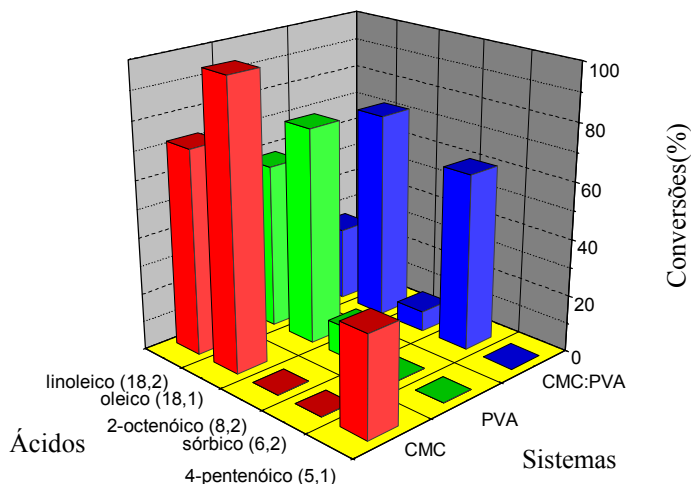


Figura 10 - Valores de conversão em éster (%) em função dos ácidos carboxílicos insaturados e suportes utilizados com a LRO em n-hexano, à 35°C, por 24h.

Os resultados, obtidos e apresentados na **Figura 10**, mostram que em geral as reações de esterificação do ácido oleico apresentaram as maiores conversões em éster, independente do suporte utilizado. Pode-se também destacar o resultado obtido na esterificação do ácido linoleico com o sistema LRO/CMC (72%).

As baixas conversões com os substratos podem ser devido a uma menor afinidade da enzima com estes reagentes que apresentam insaturações próximas ao centro reacional. Deve-se mencionar também a possível dificuldade de difusão dos mesmos pelo filme polimérico.

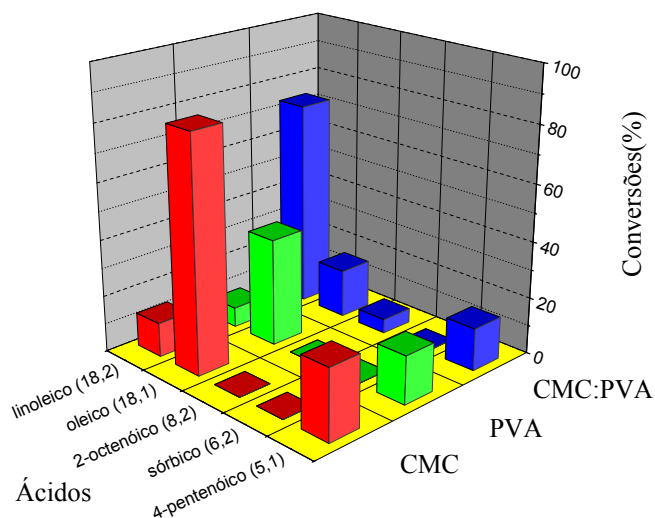


Figura 11 - Valores de conversão em éster (%) em função dos ácidos carboxílicos insaturados e suportes utilizados com a LMJ em n-hexano, à 35°C, por 24h.

Na **Figura 11** pode-se observar que as melhores conversões em éster foram obtidas para o ácido oleico no sistema LMJ/CMC (83%) e para o ácido linoleico no sistema LMJ/CMC:PVA (73%). Para os outros ácidos estudados as conversões foram menores que 50%, provavelmente devido aos mesmos efeitos citados no experimento anterior.

4.5 Esterificação dos álcoois de cadeias lineares com o ácido láurico

Na continuidade do trabalho, efetuaram-se estudos de esterificação do ácido láurico com etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, octanol, decanol e octadecanol, utilizando as enzimas LRO e LMJ, imobilizadas em filmes de CMC, PVA e CMC:PVA. (**Figuras 12 e 13**)

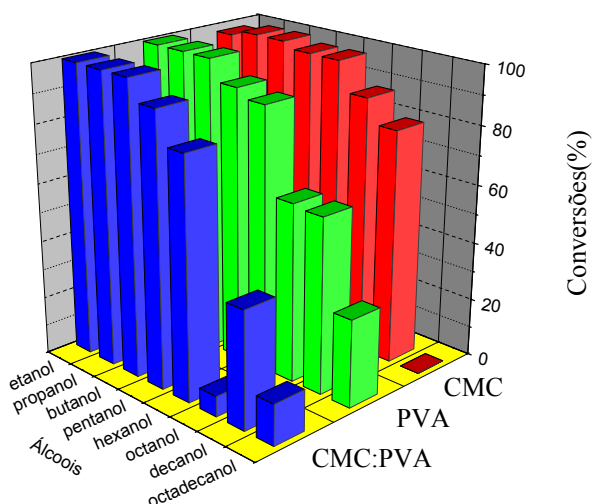


Figura 12 - Valores de conversão em éster (%) em função dos álcoois saturados e suportes utilizados com a LRO em n-hexano, à 35°C, por 24h.

A **Figura 12** mostra que as melhores conversões em ésteres foram obtidas para álcoois de 2 a 5 átomos de carbono (>99%), para os álcoois de cadeia maiores as conversões foram de aproximadamente 80%, devido a grande afinidade do sistema (suporte/enzima) com os substratos. Para o octadecanol a conversão em éster foi menor que 50% utilizando LRO imobilizada com os três sistemas. Estes resultados refletem a importância dos efeitos estéreos em reações biocatalisadas, e que substratos maiores não se encaixam adequadamente no sítio ativo desta lipase.

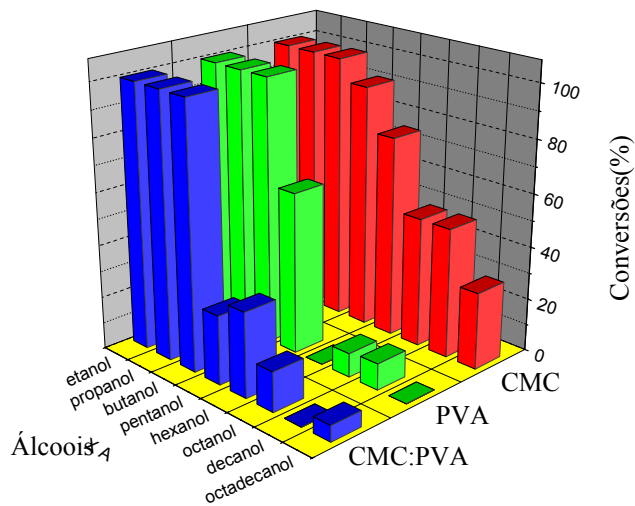


Figura 13 - Valores de conversão em éster (%) em função dos álcoois saturados e suportes utilizados com a LMJ em n-hexano, à 35°C, por 24h.

Os resultados apresentados na **Figura 13** demonstram que novamente os ésteres formados com álcoois de cadeias de 2 a 5 átomos de carbono apresentaram as melhores conversões (>99%). Para os álcoois de cadeias maiores as conversões obtidas foram menores que 50%, e provavelmente é devido a efeitos estéreos, conforme discutido anteriormente.

4.6 Esterificação do ácido láurico com álcoois de cadeias ramificadas

Em seguida foram feitas reações de esterificação do ácido láurico com os álcoois ramificados como o isopropanol, terc-butanol e isobutanol, utilizando as enzimas LRO e LMJ imobilizadas em filmes de CMC, PVA e CMC:PVA, em n-hexano, à 35°C, por 24h.

Nestas reações de esterificação não foram detectadas conversões em éster com os sistemas utilizados. Estes resultados demonstram que não há afinidade do sistema (suporte/enzima) com estes substratos, sugerindo que não se ligam efetivamente ao sítio catalítico das enzimas devido a impedimentos estéreos

causados pelas ramificações nas cadeias laterais dos álcoois próximas ao centro nucleofílico, conseqüentemente não favorecendo a formação do produto.²¹

4.7 Influência do solvente na esterificação do ácido láurico com n-pentanol utilizando o sistema CMC/LRO

Outro estudo realizado foi o da utilização dos filmes de CMC/LRO em diversos solventes orgânicos para a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol. Os resultados obtidos em termos de conversão de laurato de n-pentila em função dos valores de log de P dos diversos solventes estão apresentados na **Figura 14**.

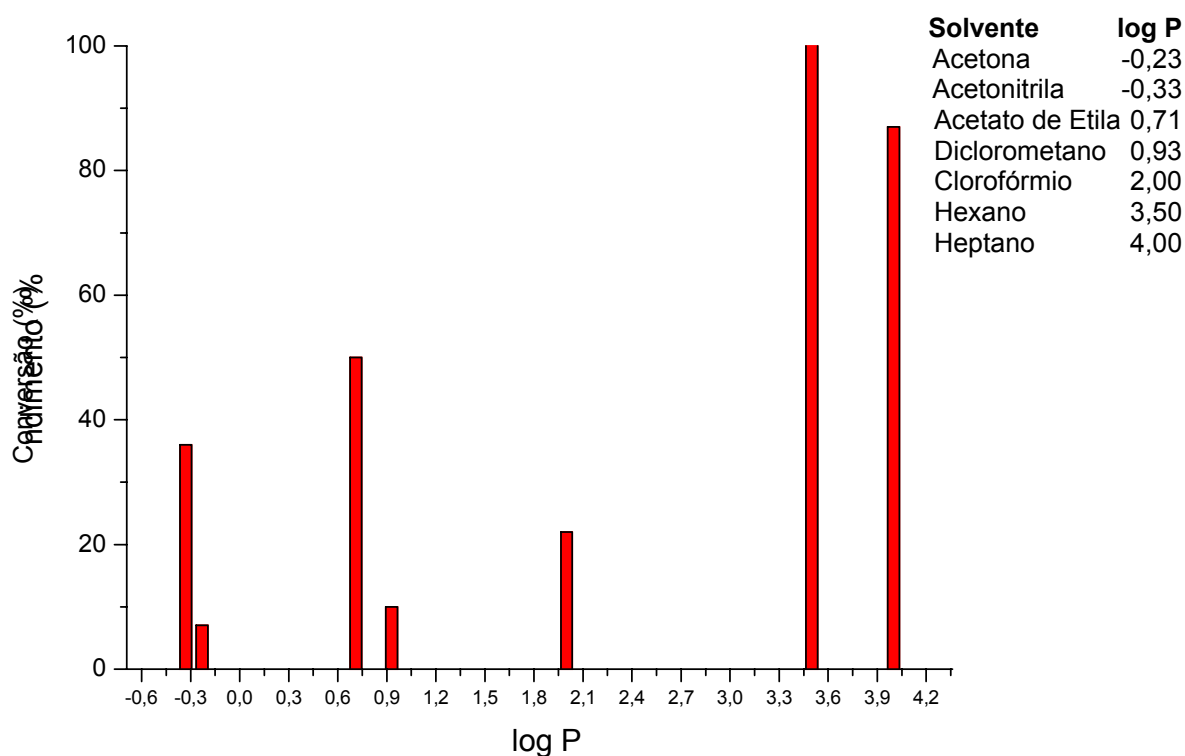


Figura 14 - Valores de conversão em laurato de n-pentila (%) em função da polaridade do solvente (log P) com a LRO imobilizada em CMC, à 35°C.

As conversões obtidas neste experimento apresentaram concordância com o trabalho de Laane e col., no qual solventes com log P entre 2 e 4 são mais indicados para o uso em biocatálise do que os com log P < 2. Esta correlação entre polaridade e atividade está diretamente ligada à habilidade do solvente orgânico em afetar (por exemplo, através de ligações de hidrogênio) a micro camada aquosa que estabiliza as enzimas hidrolíticas.²²

5 - CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, as principais conclusões são:

- ✓ Os filmes de CMC e PVA são estáveis em diversos solventes orgânicos.
- ✓ Nas reações controle (sem adição de enzimas) do ácido láurico e esteárico com n-pentanol, não houve formação de produtos, evidenciando a importância do biocatalisador nestas reações.
- ✓ Nas reações de esterificação do ácido láurico e esteárico com n-pentanol, utilizando a LRO e LMJ livres as maiores de conversões foram obtidas nas reações com o ácido esteárico. Para o ácido láurico os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se a LMJ, demonstrando grande afinidade do sistema (suporte/enzima) com estes substratos.
- ✓ Na reutilização destas lipases, somente as reações com a LMJ apresentaram boas conversões em éster, mostrando que esta foi mais resistente ao meio hidrófobico que a LRO.
- ✓ De uma forma geral, utilizando os filmes de CMC, PVA e CMC:PVA(1:1) como suportes para a imobilização das lipases LRO e LMJ foram obtidos ésteres derivados de ácidos e álcoois saturados em altas conversões (~99%), indicando que estas lipases mantêm a atividade catalítica.
- ✓ Para os ácidos insaturados e álcoois de cadeias ramificadas os valores de conversão foram menores que 50% tanto com LRO e LMJ, indicando uma menor afinidade do sistema.
- ✓ Para os álcoois de cadeia ramificada não houve a formação de éster, evidenciando a importância dos efeitos estéreo em reações biocatalisadas.
- ✓ Os resultados obtidos mostram a viabilidade do uso de materiais poliméricos como suportes para imobilização de enzimas.

6 - PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar estudos sobre a influência do solvente com as LRO e LMJ em filmes de PVA e CMC:PVA(1:1), nas reações de esterificação realizadas neste trabalho.
- ✓ Testar a estabilidade de outras lipases imobilizadas nestes suportes.
- ✓ Realizar estudos das interações filme/enzima através de medidas de DSC, TGA e microscopia óptica.
- ✓ Realizar testes variando o tempo e temperatura da reação.

REFERÊNCIAS

1. Wong, C.; Whitesides, M.; **Enzymes in Synthetic Organic Chemistry**, Pergamon, v. 12, cap. 1, p. 01
2. Roberts, S. M.; **"Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis"**, John Wiley & Sons Ltd., England, 1999.
3. Faber, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1997, cap. 1, p. 1- 26.
4. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 3rd Ed. USA, Saunders Publishing College, 2000.
5. Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.
6. Alvarez-Macarie, E.; Augier-Magro; Guzzo, J.; Baratti, J.; **Biotechnol. Lett.** v. 21, p.313-319, 1999.
7. Cygler, M.; SCHRAG, J. D.; **Bioch. Biophysica Acta.** v. 1441, p. 205-214, 1999.
8. Schmid, R. D.; Verger, R.; **Angew.Chem. Int. Ed.** v. 37, p. 1608-1633, 1998.
9. Pirozzi, D.; Greco, G.; **Enzyme Microb. Technol.**; 34,2,94-100, 2004
10. Yadav, G. D.; Lathy, P. S.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 27, 2-3, 113-119, 2004.
11. Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L.; **Quim. Nova**, 27, 1, 146-156, 2004.
12. Dalla-Vecchia, R.; Soldi, V.; Nascimento, M. G., **Quim. Nova**, aceito para publicação, 2004.
13. Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M. ; Graille, J.; Hoss, M. J.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 9, 113, 2000.
14. Soares, C. M.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 77, 745, 1999.
15. Abbas, H.; Comeau, L.; **Enzyme Microb. Technol.**, 1, 6267, 2003.
16. Maugard, T.; Legov, M. D., **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 8, 275, 2000.
17. Pavia, D. L.; Lampamann, G. M.; Kriz, G. S., **"Introd. to Organic Lab. Techniques"**, 3rd. ed., Saunders Golden Sunberst Series, 86, 1988.

-
18. Korolkovas, A.; Burkhalter, J. H., “**Química Farmacêutica**”, Guanabara Dois, 1982.
 19. Solomons, T. W.; **Organic Chemistry**, 6th Ed., 812-813, 1996.
 20. **Novozymes Product Sheet** – Novozyme 435, 2001
 21. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D.; **Chem. and Phys. of Lipids**, 93, 67-80, 1998.
 22. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; **Biotech. Bioeng.**, 30, 81-87, 1987.