



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

QMC5510 – ESTÁGIO SUPERVISIONADO

Síntese de Ésteres Catalisada por Lipases Imobilizadas em Filmes de PVA

Aluna: Aline Pimentel
Orientadora: Maria da Graça Nascimento
Co-Orientador: Damianni Sebrão

FLORIANOPOLIS, JULHO DE 2006

Perguntaram ao Dalai Lama:

“O que mais te surpreende na humanidade?”

E ele respondeu:

“Os homens... Porque perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde”.

E por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de tal forma que acabam por não viver nem o presente nem o futuro.

E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido...”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo milagre da vida, por eu ser tão feliz, pela satisfação que sinto em ter passado por mais essa importante etapa, pelos momentos maravilhosos de alegria, de estudo e de festa. Por eu ter conhecido pessoas incríveis, que são importantes pra mim, por ter me dado a mão e me levantado nos momentos de dificuldade, e por fazer com que eu aprenda com meus próprios erros.

À minha família, onde estão as pessoas que mais amo, pelas palavras de consolo e pela força nos momentos de ansiedade. Sou grata especialmente a meus pais que sempre me esperavam em casa com um sorriso, que se preocupavam comigo quando eu chegava tarde, quando tinha festa com os amigos, ou quando eu ficava doente. Por me depositarem tanta confiança, proteção e amor.

Agradeço ao meu namorado Leonardo, por todo o amor, pelo carinho, pelas palavras doces, pela alegria e confiança. Agradeço principalmente pela sua parceria, estando comigo quando eu mais precisava, me fazendo sorrir quando eu estava triste. Pela tranquilidade que me transmite, fazendo com que eu esquecesse dos problemas. Por ser tão especial e fundamental na minha vida, um príncipe que amo muito.

Agradeço aos amigos que fiz, pessoas que tornam nossos dias tão mais felizes, pela cooperação, pelos estudos em grupo, pelas festas. Em especial à Vanessa, a Nane, e a Magda pelas gargalhadas nos momentos felizes, consolo nos momentos tristes. São amigas de uma vida inteira!

Agradeço especialmente à professora Maria da Graça Nascimento, por ter sido uma orientadora presente, sempre disposta a nos receber e a nos ensinar. Por ter me dado a chance de trabalhar em seu projeto de pesquisa, que foi um grande e importante aprendizado.

Aos meus colegas do laboratório, Vanessa, Damianni Cristiane, Patrícia, Fernanda, Alexandre, Marcelo, Thiago, Tiago, Isabel, Rosana, por terem me ensinado tantas coisas, sempre dispostos a ajudar. Por termos trabalhado em grupo com cooperação, tornando o ambiente de trabalho um lugar agradável e alegre. Agradeço especialmente ao doutorando Damianni, por ter sido fundamental na minha formação acadêmica, e principalmente pela amizade verdadeira.

Agradeço também a minha prima Cristina, uma grande amiga, alegre, companheira, e um pouco “maluquinha”, que compartilhou vários momentos da minha vida acadêmica comigo.

A todos os professores do curso de Química da UFSC.

À professora Sônia Peduzzi de física, com a qual trabalhei por dois anos, que pacientemente me ensinou a usar o computador. Foi meu primeiro serviço e vou sempre lembrar com muito carinho.

À central de análises pelos serviços prestados.

À UFSC, CNPq e CAPES pelo suporte e apoio financeiro.

À Amano e Novozyme pela doação das enzimas.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Enzimas	7
1.1.1. Catálise Enzimática.....	8
1.1.2. Classificação das Enzimas	9
1.2. Lipases – Classificação e Fontes	10
1.3. Imobilização de Enzimas.....	14
1.3.1. Imobilização por Confinamento em Matriz Polimérica.....	18
1.4. Coquetel Enzimático.....	19
1.5. Ésteres.....	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Materiais	23
3.1.1. Enzimas.....	23
3.1.2. Poli(álcool vinílico).....	23
3.1.3. Reagentes e Solventes.....	24
3.2. Métodos	25
3.2.1. Imobilização de Lipases em Filmes de PVA	25
3.2.2. Preparação do Meio Reacional	25
3.2.3. Determinação da Quantidade de Água nos Filmes Poliméricos	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Determinação da Quantidade de Água no Filme de PVA	29
4.2. Seleção de Lipases e Efeito do Doador Acila.....	30
4.3. Efeito do Solvente	34

4.4. Esterificação de Ácidos Graxos Insaturados com <i>n</i> -Pentanol	35
4.5. Reutilização e Tempo de Estocagem do Biocatalisador	38
4.6. Síntese do Estearato de <i>iso</i> -Propila.....	39
5. CONCLUSÕES.....	40
6. PERSPECTIVAS	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8. ANEXOS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> ¹²	11
Figura 2 - Algumas possibilidades de transformações orgânicas utilizando catálise enzimática, a partir de um intermediário acil-enzima.....	12
Figura 3 - Proposta mecanística de hidrólise de éster catalisada por lipase ¹⁹	14
Figura 4 – Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptada da ref. 3).....	16
Figura 5 – Relação mútua entre os vários componentes envolvidos em uma reação biocatalisada na presença de solvente orgânico.....	17
Figura 6 – Reação de polimerização do acetato de vinila para formação do álcool polivinílico.	18
Figura 7 – Fórmula estrutural de alguns ésteres com aplicação industrial.....	20
Figura 8 – Estruturas dos ésteres saturados de cadeia longa.	20
Figura 9 – Estrutura do álcool polivinílico (PVA).....	24
Figura 10 – Procedimento experimental utilizado na preparação dos filmes.....	25
Figura 11 – Preparação do meio reacional e análise do produto.....	26
Figura 12 – Região do espectro de RMN- ¹ H dos deslocamentos químicos dos prótons metilênicos do álcool e éster utilizada para o cálculo da percentagem de conversão (39%).	27

Figura 13 – Fotografia do titulador automático de Karl Fischer.	28
Figura 14 – Região ampliada do espectro de RMN- ¹ H do produto da reação do ácido palmítico com <i>n</i> -pentano catalisada pela LRO, mostrando a formação de éster. (200MHz, CDCl ₃).	32
Figura 15 – Valores de conversão (%) em ésteres em função dos ácidos carboxílicos e lipases, 24h, 35°C, <i>n</i> -hexano.	33
Figura 16 – Estrutura dos ácidos graxos insaturados.	36
Figura 17 – Formas de ressonância dos ácidos (a) <i>trans</i> -2-octenóico e (b) sórbico.	37
Figura 18 – Influência do tempo de estocagem e reutilização na esterificação do ácido láurico com <i>n</i> -pentanol com o sistema LPS/PVA.	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas segundo a UIBBM.	9
Tabela 2 – Enzimas utilizadas.	23
Tabela 3 - Valores dos teores de água (%) presentes nos filmes de PVA.	29
Tabela 4 - Conversão(%) em miristatos (7) e palmitatos (8) de <i>n</i> -pentila com as lipases imobilizadas em filmes de PVA.	30
Tabela 5- Efeito da polaridade do solvente na conversão em palmitatos de <i>n</i> -pentila catalisada pelas lipases LMJ e LCR imobilizadas em filme de PVA ^(a)	34
Tabela 6 – Conversão (%) em ésteres derivados de ácidos insaturados com <i>n</i> -pentanol com os sistemas LPS/PVA e LOR/PVA.	36

RESUMO

Neste trabalho é descrita a imobilização de lipases de fontes variadas em filmes de álcool polivinílico (PVA). Estes sistemas foram usados para catalisar a reação de esterificação dos ácidos palmítico, mirístico, láurico e decanóico em *n*-hexano como solvente. Os maiores valores de conversão (~90%) foram obtidos com as lipases imobilizadas de *Pseudomonas sp.* (LPS) e de *Rhizopus oryzae* (LRO). Utilizando os sistemas LPS/PVA e lipase de *Candida rugosa* (LCR)/PVA, foram realizadas também reações de esterificação dos ácidos saturados 4-pentenóico, *trans*-2-octenóico, citronélico (ácido 3,7-dimetil-6-octenóico), oléico (ácidos *cis*-9-octadecanóico), sórbico (ácido 2,4-hexadienóico) e linoléico (ácido *cis*-9, *cis*-12-octadecadienóico).

As maiores conversões foram obtidas utilizando-se o sistema LPS/PVA. A maior conversão foi obtida na esterificação do ácido oléico, 88%.

Para verificar a influência da imobilização de duas lipases “coquetél enzimáticos” e da polaridade do solvente, as lipases de *Mucor javanicus* (LMJ) e a LCR foram imobilizadas simultaneamente em filmes de PVA. Estes sistemas foram usados para catalisar a reação do ácido palmítico com *n*-pentanol. Os resultados mostraram que com a adição do *t*-butanol, um solvente mais polar, os valores de conversão aos correspondentes palmitatos diminuíram e que não foi observado um efeito adicional ao imobilizar estas duas lipases no mesmo suporte.

O estudo da reutilização do sistema LPS/PVA, mostrou a estabilidade da enzima após sete reações consecutivas, permanecendo 239 dias estocado em *n*-hexano. O laurato de *n*-pentila foi obtido com conversões de 75-99%

O estearato de *iso*-propila não foi obtido ao utilizar a LPS imobilizada em PVA, com uma mistura de hexano e *terc*-butanol, em 24h à 35 °C.

Palavras-chave: Imobilização, lipases, ésteres alquílicos

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas

Enzimas são substâncias de estrutura complexa, geradas no interior da célula (mas que podem agir fora dela), que aumentam de várias ordens de grandeza a velocidade das reações e, por serem altamente específicas, selecionam entre todas as reações potencialmente possíveis aquelas que efetivamente vão ocorrer¹.

Quimicamente, e em geral, são proteínas globulares com estrutura espacial contendo um sítio ativo, onde as reações ocorrem¹.

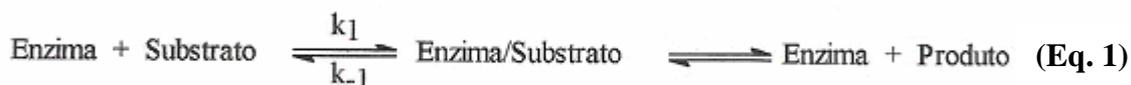
As enzimas, como as outras proteínas, são constituídas de longas cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas que aceleram muitas reações biológicas com muita eficiência. Podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microorganismos. Entretanto, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato ou quando acontecem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas. As enzimas são altamente específicas e capazes de diferenciar estereoisômeros de certos compostos, de modo que somente certos substratos sofrem sua ação e unicamente um tipo de reação ocorre, sem reações colaterais ou produtos derivados. As vantagens de utilizá-las como catalisadores são^{2,3}:

- Alta velocidade de reação: as velocidades de reações catalisadas por enzimas podem ser de 10^6 a 10^{14} vezes mais rápidas que as correspondentes não catalisadas.
- Atuam, em geral, em condições suaves: de temperatura, pressão e em meio de pH e concentração salina praticamente constantes. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização e rearranjos, que freqüentemente permeiam a metodologia tradicional.
- Apresentam diversos tipos de seletividade: quimiosseletividade, regioseletividade, diastereoseletividade, e também enantioseletividade. As reações raramente formam subprodutos.

- Tem 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: aceleram a velocidade da reação sem alterar o equilíbrio termodinâmico.

1.1.1. Catálise Enzimática

As enzimas são reagentes que se combinam com o substrato formando um complexo enzima-substrato que posteriormente se separa dando origem ao produto e a enzima livre (**Equação 1**).



Apenas uma região restrita da enzima está envolvida no processo de catálise, que é denominada sítio ativo. O sítio ativo possui uma conformação cujos grupos ligantes R dos aminoácidos estão corretamente posicionados, e sua conformação é complementar a estrutura do substrato (Teoria da “chave-fechadura” proposta por Emil Fischer). Um modelo mais refinado para explicar as propriedades das enzimas é o modelo do “encaixe induzido”, proposto por Koshland que propõe que o sítio ativo é uma região flexível cuja forma pode ser induzida para alojar compostos estruturalmente semelhantes. No entanto, somente o substrato capaz do alinhamento correto com o grupo catalítico, é que sofre a ação da enzima^{2,4,5}. A especificidade estrutural ou regioseletividade é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do centro ativo à ligação do substrato. É a capacidade que algumas enzimas possuem de discriminar os enantiomêros de uma mistura racêmica. Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula. A seletividade e a estereoquímica advém da própria quiralidade da enzima, ou seja, de sua simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não satisfaçam determinadas relações espaciais. Desse modo, a catálise enzimática permite transferir ou gerar centros quirais nas moléculas, assim como distinguir

formas enantiômeras. Elas têm sido empregadas para resolução de racematos, resultando em rendimentos elevados, para obtenção de ésteres, álcoois e ácidos opticamente puros⁶.

1.1.2. Classificação das Enzimas

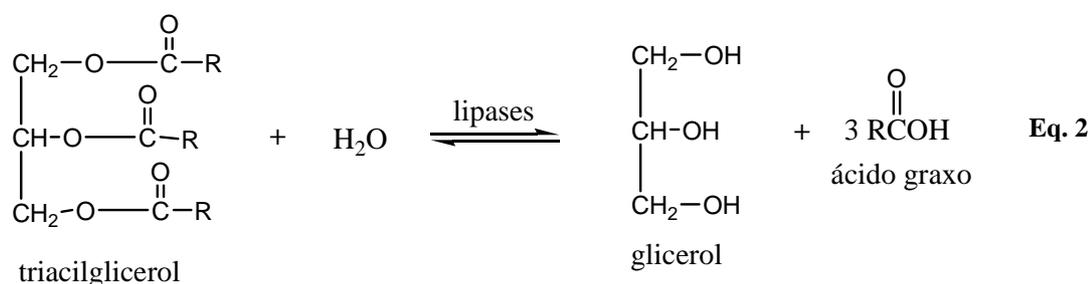
De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), as enzimas podem ser classificadas em seis grandes grupos, de acordo com o tipo de reação envolvida (**Tabela 1**)².

Tabela 1 – Classificação das enzimas segundo a UIBBM.

Grupo	Tipo de Reação	Subclasse
Oxidoreduases	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	Hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc
Transferases	Reações de transferência de grupos	Transaldolases, transcetolases, etc
Hidrolases	Reações de hidrólise	Estearases, lipases , peptidases, fosfatases, etc
Liasas	Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoácidiolases, hidroliases
Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, oxirreduases, mutase, etc
Ligases	Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-C e C-N e ésteres de fosfato	

1.2. Lipases – Classificação e Fontes

As lipases são enzimas que em seu meio natural catalisam a hidrólise de triglicerídeos para formar di e mono-glicerídeos, glicerol e ácidos graxos (**Equação 2**). Elas têm sido isoladas de uma ampla variedade de tecidos de animais e plantas, podendo ser também produzidas por processos de fermentação usando várias espécies de microorganismos (fungos e bactérias)^{7,8,9}.



Estudos de raios X mostram que a estrutura tridimensional das lipases apresenta um padrão conformacional comum, denominado de conformação / hidrolase, composto de uma seqüência de α -hélices e folhas β -pregueadas. O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas^{10,11}.

Na **Figura 1** pode-se observar o modelo tridimensional da lipase de *Pseudomonas cepacia* com a ampliação do seu sítio ativo, composto dos resíduos de aminoácidos Ser 87, His 286 e Asp 264¹².

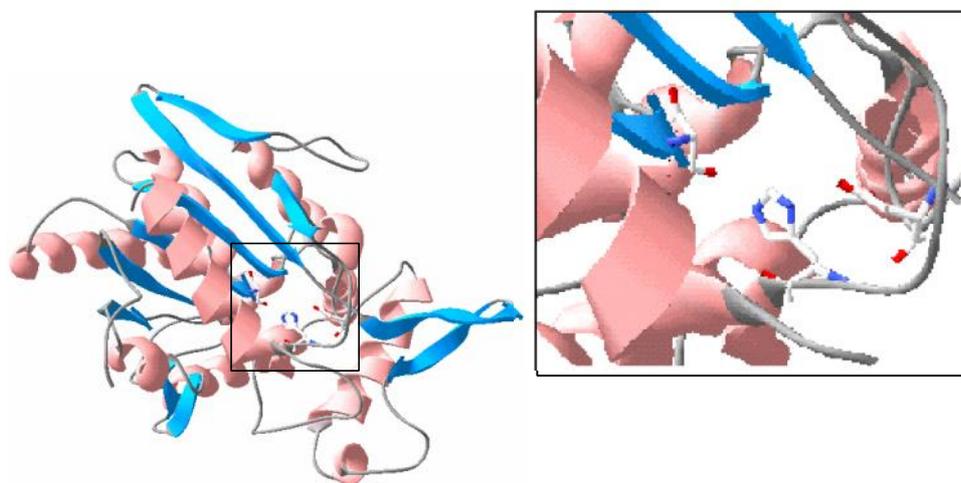


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas cepacia*¹².

As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais. Embora, atualmente, os usos industriais das lipases estejam concentrados nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais. As lipases vêm, deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas^{6, 13, 14}.

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais^{6, 13}.

São muito utilizadas em síntese orgânica devido a sua grande disponibilidade, baixo custo, não requererem cofatores, atuarem em uma faixa de pH relativamente grande e serem muito estáveis. Em solvente orgânico, catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores da água^{15, 16, 17}.

Entre todos os tipos de reações catalisadas por enzimas, as transformações hidrolíticas, envolvendo a formação de ligações amídicas e éster podem ocorrer facilmente usando proteases, esterases ou lipases. Quando a enzima está operando em um ambiente que tem baixa concentração de água, qualquer nucleófilo pode competir com a água e

formar o produto a partir de um intermediário acil-enzima, levando assim a várias transformações sintéticas úteis (**Figura 2**)³.

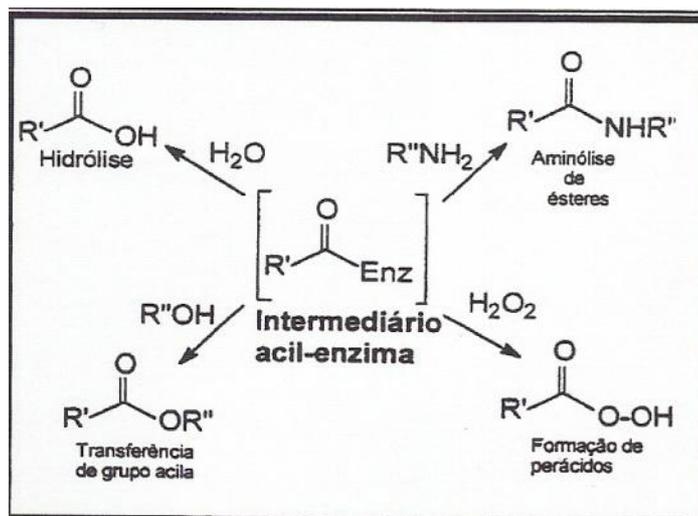
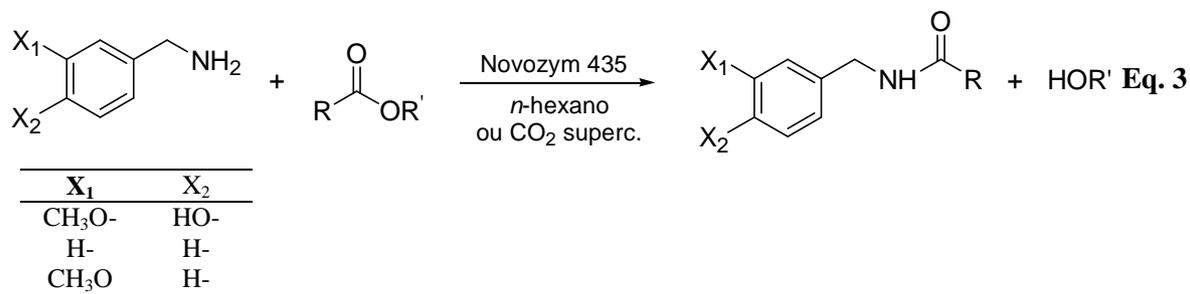


Figura 2 - Algumas possibilidades de transformações orgânicas utilizando catálise enzimática, a partir de um intermediário acil-enzima.

As enzimas hidrolíticas têm sido amplamente utilizadas em síntese orgânica. Porém, muitas ainda apresentam relativa instabilidade em meio orgânico e alto custo, o que pode levar a algumas limitações de seu uso.

Castillo e col. realizaram a síntese biocatalisada de análogos da capsaicina ((E)-N-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-8-metil-6-nonamida), uma molécula natural responsável pela sensação picante das pimentas (*Capsicum* spp.). Várias aminas e doares acila foram utilizados, e a reação foi catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435), em *n*-hexano ou CO_2 supercrítico (**Equação 3**)¹⁸.



R = -C₃H₇; -C₅H₁₁; -C₇H₁₅; -C₉H₁₉; -C₁₁H₂₃; -C₁₃H₂₇; -C₁₅H₃₁; -(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃

R' = -H; -CH₃; -CH₂CH₃

Nas reações de hidrólise de ésteres catalisadas por lipases, o mecanismo proposto envolve várias etapas. Este, inicia-se com o ataque nucleofílico pelo oxigênio da serina no átomo de carbono carbonílico na ligação éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico estabilizado pelas ligações de hidrogênio a átomos de nitrogênio de resíduos da cadeia principal pertencente à cavidade de oxiânion. Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-enzima, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação dos ácidos graxos e regeneração da enzima. Este mecanismo está apresentado na **Figura 3**^{6,19}.

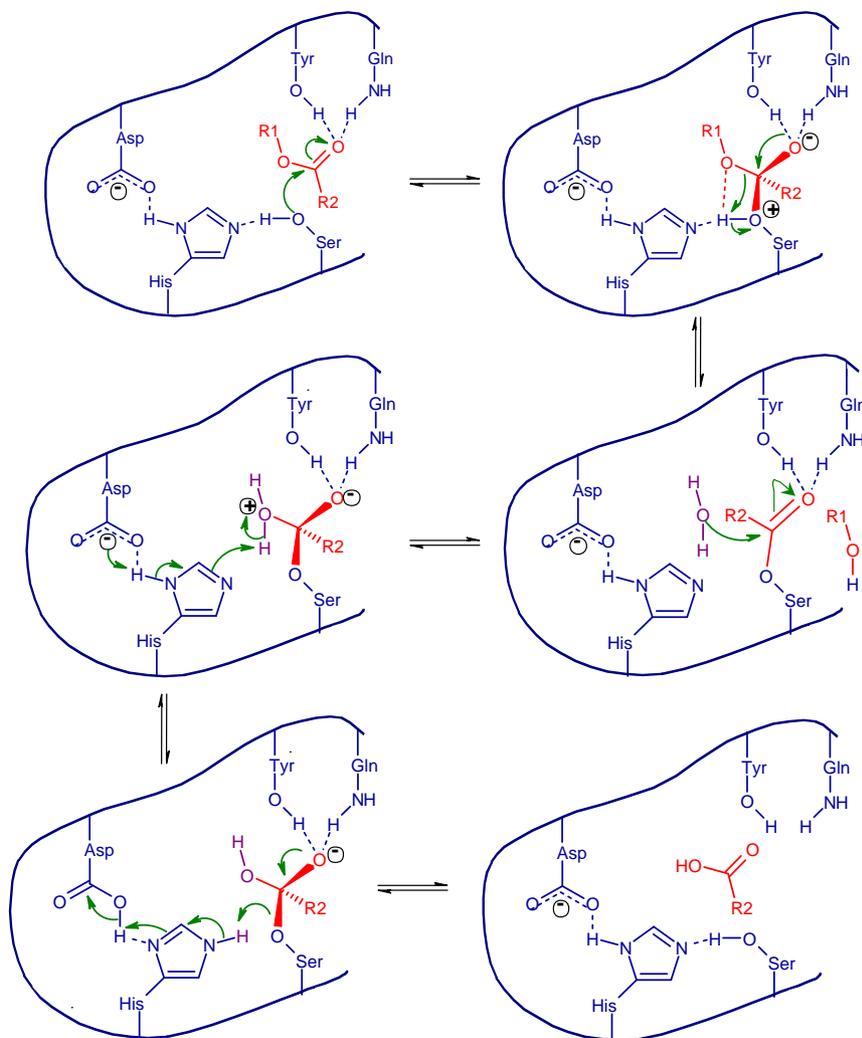


Figura 3 - Proposta mecanística de hidrólise de éster catalisada por lipase¹⁹.

1.3. Imobilização de Enzimas

Na prática, alguns inconvenientes são frequentemente encontrados em reações catalisadas por enzimas. Os principais são^{20,21,22}.

- Muitas enzimas não são suficientemente estáveis dentro das condições operacionais, e elas podem perder a atividade catalítica devido a altas temperaturas, auto-oxidação, autodigestão e/ou desnaturação pelo solvente ou reagentes.

- Já que as enzimas são moléculas solúveis em água, o seu uso repetido que é importante para viabilizar um processo econômico, pode ser problemático devido ao fato que elas são difíceis de serem recuperadas deste meio além da separação dos substratos e produtos.
- A produtividade de processos industriais, medidas de rendimento com o espaço de tempo, é freqüentemente baixa devido ao limite tolerado pela enzima para altas concentrações de substrato(s) e produto(s).

Para minimizar estes problemas, foram desenvolvidas técnicas de imobilização. A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, ou pelo confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos, ou ainda por encapsulação através de uma membrana polimérica^{3,21,22}.

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 dessas enzimas, aumentando assim a estabilidade térmica^{21, 22, 23}.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não foram alterados durante o processo, em comparação a sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disto, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no seu sítio ativo²⁴.

As vantagens da imobilização, são que, em geral, aumentam a estabilidade das enzimas, são de baixo custo, fáceis de separar, recuperar e, uma das mais importantes é que podem ser reutilizadas, o que possibilita operações contínuas. Este processo mantém muitas vezes, a estabilidade da enzima durante vários ciclos, o que pode eficazmente reduzir o custo em aplicações na indústria²⁵. Em alguns casos verifica-se um aumento na atividade enzimática^{20,21}.

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

Métodos de Imobilização de Enzimas

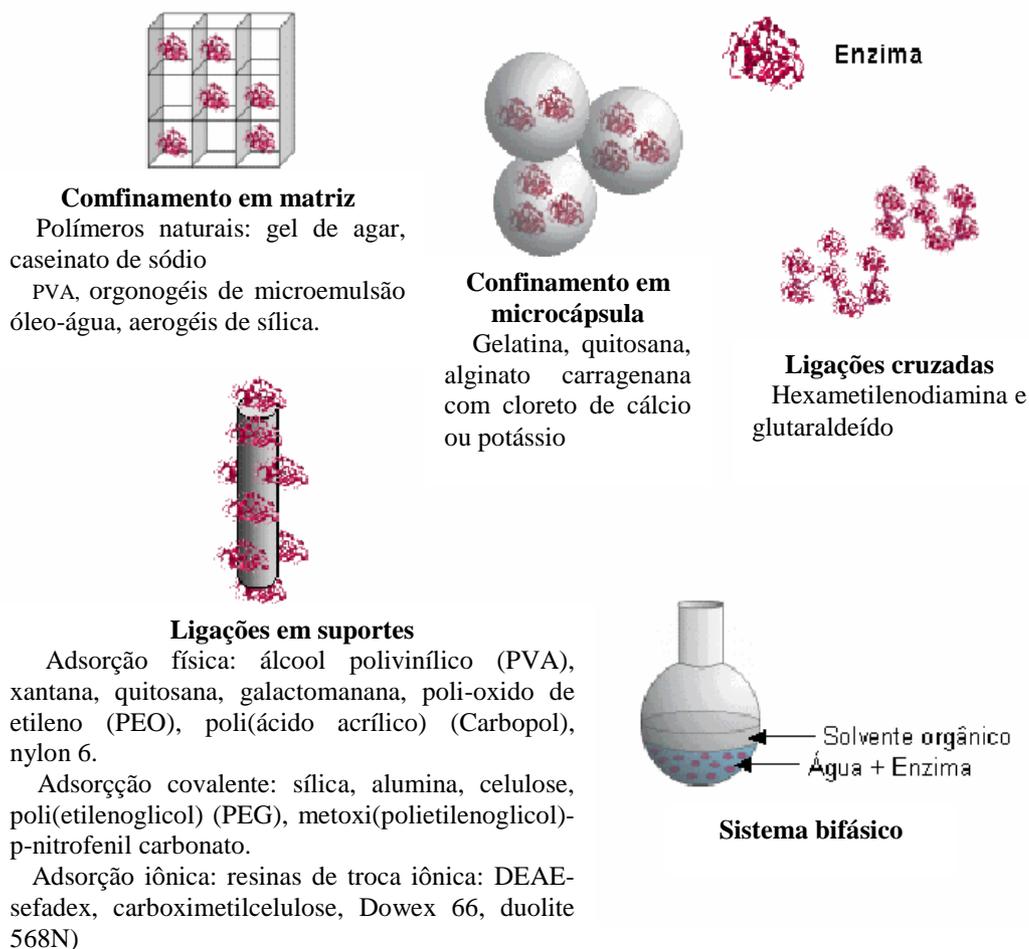


Figura 4 – Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptada da ref. 3).

A heterogeneidade do sistema biocatalítico, em meio orgânico, implica em uma relação mútua entre os diferentes componentes do sistema (**Figura 5**)¹⁵.

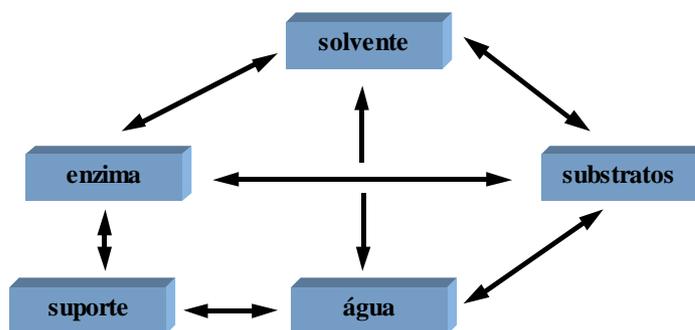


Figura 5 – Relação mútua entre os vários componentes envolvidos em uma reação biocatalisada na presença de solvente orgânico.

Em geral, os suportes têm sido considerados como materiais inertes com pouca ou nenhuma interferência no comportamento cinético da enzima. A característica que mais interfere na escolha de um tipo de suporte para imobilização é a sua afinidade ou não pela água, ou seja, o caráter hidrofílico ou hidrofóbico^{3,4,15}.

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^{26,27}.

As enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para reter sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente em um suporte^{28,29,30}. 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 enzima³¹.

O suporte para ser efetivo na imobilização deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter a atividade por um longo período e possibilitar a regeneração do sistema suporte/enzima ao final do processo, sem que ocorra a perda da atividade enzimática.

1.3.1. Imobilização por Confinamento em Matriz Polimérica

Neste trabalho, lipases foram imobilizadas em um polímero através do método do confinamento em matriz polimérica, que consiste em “prender” uma proteína em um polímero insolúvel. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, difundem-se^{15,22}.

A vantagem da utilização desta técnica, é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando assim a desnaturação.

O polímero utilizado foi o álcool polivinílico (PVA). Este é um polímero sintético, de baixo custo e não-tóxico para microorganismos e por isso tem sido usado recentemente para imobilizar células e enzimas³². É usado também na fabricação de filmes solúveis em água, e adesivos.

O álcool polivinílico (polímero solúvel em água) não pode ser preparado diretamente a partir do seu monômero, pois o álcool vinílico é um composto instável que se rearranja espontaneamente em acetaldeído³³. É produzido através da polimerização do monômero acetato de vinila, e a massa molar pode ser controlada (**Figura 6**).

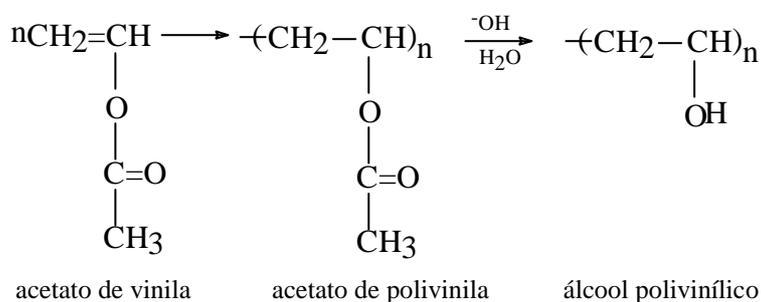


Figura 6 – Reação de polimerização do acetato de vinila para formação do álcool polivinílico.

1.4. Coquetel Enzimático

O termo “coquetel enzimático” tem sido aplicado quando dois ou mais biocatalisadores são usados simultaneamente, imobilizados ou não, no mesmo suporte, visando aumentar a atividade catalítica³⁴.

Para acelerar a maturação de vários tipos de queijo, Kheadr e col. encapsularam três tipos de enzimas (proteases, peptidases e lipases) em liposoma (Pro-lipo VPF 012). Os resultados demonstraram que para alguns sistemas foram obtidos queijos com sabor agradável (não amargo), sem mofo ou defeito na textura, em um curto tempo de maturação.³⁵

1.5. Ésteres

Os ésteres (RCOOR') são compostos orgânicos que apresentam-se bem distribuídos na natureza. Muitos deles são ésteres de glicerina, chamados glicerídios e são constituintes principais dos óleos e das gorduras. Muitos ésteres simples são líquidos de cheiro agradável, responsáveis pelos odores de frutas e flores. Por exemplo, o butanoato de metila (**1**), ocorre no óleo de abacaxi, e o acetato de *iso*-pentila (**2**), no óleo da banana. Estes ésteres de cadeia curta têm, 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 ésteres^{36, 37}. O acetato de etila (**3**) é um solvente comum encontrado no removedor de esmalte de unha, e os ftalatos de dialquila (**4**) são usados como plastificantes, que evitam que os plásticos se tornem quebradiços³⁷ (**Figura 7**).

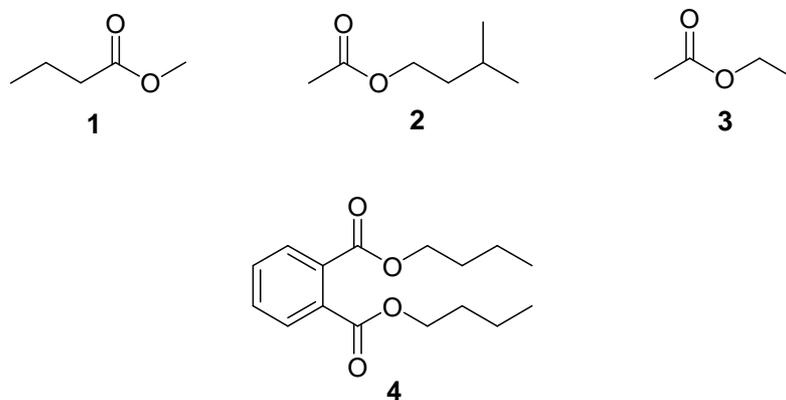


Figura 7 – Fórmula estrutural de alguns ésteres com aplicação industrial.

Neste trabalho foram preparados ésteres de cadeia longa (**Figura 8**) a partir de ácidos graxos saturados de cadeia longa e álcoois de cadeia pequena. Estes ésteres são utilizados na indústria de alimentos, de detergentes, farmacêutica e cosmética. A produção biotecnológica destes com lipases tem recebido grande destaque em relação aos métodos de síntese tradicional, particularmente na produção de aromatizantes naturais e fragrâncias⁶.

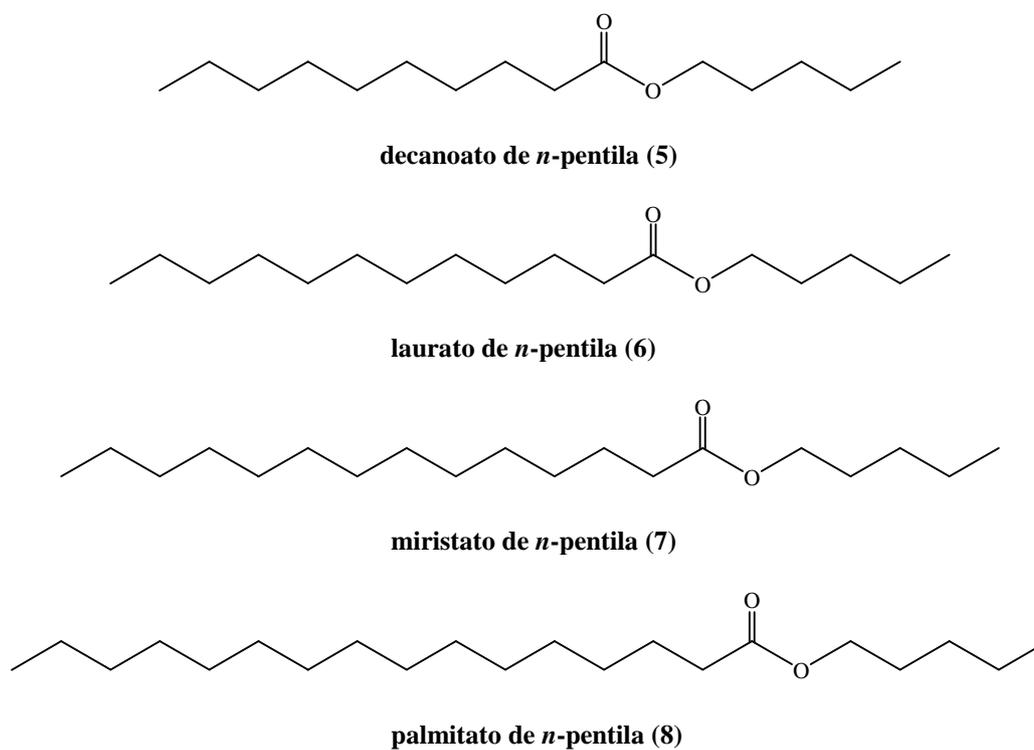


Figura 8 – Estruturas dos ésteres saturados de cadeia longa.

Foram sintetizados também, ésteres a partir dos ácidos graxos insaturados 4-pentenóico, *trans*-2-octenóico, citronélico, oleico, sórbico e linolêico.

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pela técnica de imobilização, a síntese de ésteres apresenta dificuldades técnicas em função do complexo mecanismo da ação enzimática em meios altamente polares. Diversos parâmetros, como por exemplo, hidratação da enzima, temperatura, concentração do substrato, tamanho da cadeia e estrutura química, podem afetar o desempenho da síntese⁶.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Imobilizar diferentes lipases em filmes de álcool polivinílico (PVA) e utilizar estes sistemas na síntese de ésteres em solvente orgânico.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a porcentagem de água presente nos filmes, pelo método de titulação de Karl-Fisher.
- Utilizar estes sistemas para catalisar a reação de esterificação dos ácidos decanóico (C10), láurico (C12), mirístico (C14) e palmítico (C16) com *n*-pentanol.
- Verificar o efeito da polaridade do solvente nestas reações utilizando *n*-hexano e *t*-butanol.
- Verificar a influência dos “coquetéis enzimáticos”, imobilizando as lipases de *Mucor javanicus* (LMJ) e de *Candida rugosa* (LCR) no mesmo suporte.
- Preparar ésteres a partir dos ácidos carboxílicos insaturados 4-pentenóico, trans-2-octenóico, citronélico, sórbico, oléico e linoleico com *n*-pentanol, catalisada pelas lipases de *Pseudomonas sp* (LPS) e pela LCR.
- Efetuar o estudo da reutilização dos filmes de PVA com a LPS, na reação de esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol.
- Preparar o estearato de *iso*-propila, um éster usado em cosméticos.
- Comparar os resultados obtidos com outros descritos na literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

As enzimas utilizadas neste trabalho estão apresentadas na **Tabela 2**:

Tabela 2 – Enzimas utilizadas.

Fontes de Lipases	Sigla	Atividade ^(a,b)	Fornecedor
<i>Pseudomonas sp.</i>	LPS	30.000 U/mg	Amano
<i>Rhizopus oryzae</i>	LRO	150.000 U/g	Amano
<i>Mucor javanicus</i>	LMJ	10.000 U/g	Amano
<i>Thermomices lanuginosus</i>	LTL	100.000 U/g	Novozymes
<i>Candida rugosa</i>	LCR	30.000 U/mg	Amano

(a) 1 unidade de lipase (U) é a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, utilizando-se óleo de oliva como substrato, a pH 7,0 e 37°C.³⁸ (b) 1 unidade é definida como 0,01% w/w de triestearina convertida por minuto, a pH 7,0 e 37°C³⁹.

3.1.2. Poli(álcool vinílico)

O polímero utilizado foi o álcool polivinílico (PVA), a sua estrutura está mostrada abaixo na **Figura 9** e a massa molar (MM) foi fornecida pelo fabricante.

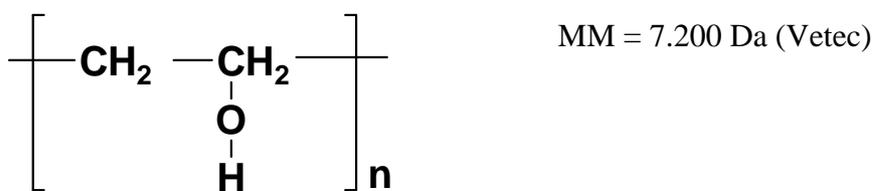


Figura 9 – Estrutura do álcool polivinílico (PVA).

3.1.3. Reagentes e Solventes

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

- Ácido palmítico (Aldrich);
- Ácido mirístico (Fluka);
- Ácido láurico (Vetec);
- Ácido decanóico (Fluka);
- Ácido esteárico (Vetec);
- Ácido 4-pentenóico (Sigma);
- Ácido 2-octenóico (Aldrich);
- Ácido citronélico (Sigma);
- Ácido sórbico (Sigma);
- Ácido oléico (Vetec);
- Ácido linoléico (Sigma);
- Álcool amílico (Vetec);
- Álcool *iso*-propílico (Merck);
- *n*-Hexano (Vetec);
- *t*-Butanol (Aldrich);
- Clorofórmio (Vetec).

3.2. Métodos

3.2.1. Imobilização de Lipases em Filmes de PVA

Em um béquer dissolveram-se 500mg de PVA em 25mL de água com agitação constante e aquecimento por 2 horas até total dissolução. Em seguida, 50 mg de lipase foram adicionadas, e o sistema agitado por mais 3 min. A solução resultante foi adicionada sobre uma placa de Petri, que foi colocada na capela onde evaporou-se o solvente à temperatura ambiente (**Figura 10**).

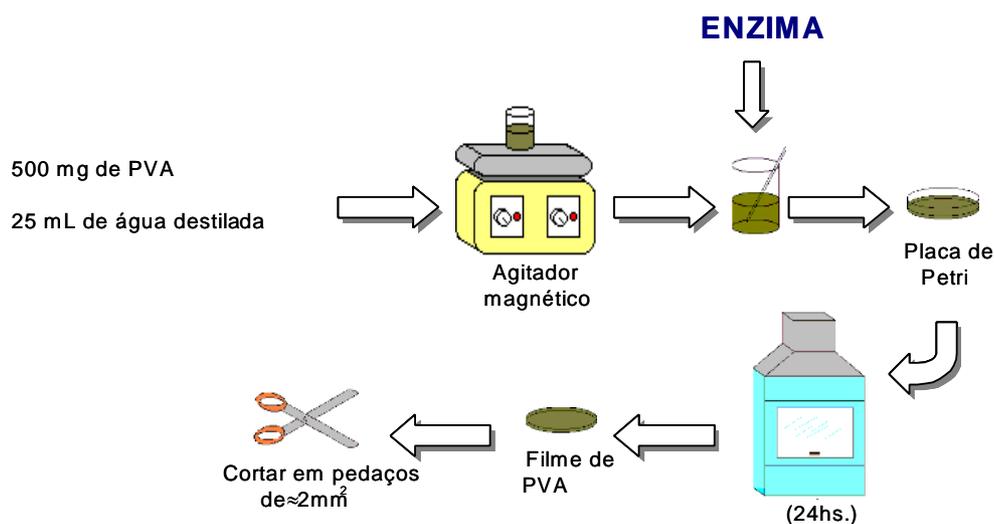


Figura 10 – Procedimento experimental utilizado na preparação dos filmes.

3.2.2. Preparação do Meio Reacional

Os filmes preparados foram cortados em pequenos pedaços e colocados em um erlenmeyer com 25mL de solvente orgânico. Os substratos foram adicionados na proporção de 1:1 (5 mmol do ácido e álcool).

O sistema reacional permaneceu sob agitação suave em um banho-maria termostatizado do tipo Dubnoff por 24 horas (ou por outro tempo pré-determinado).

As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (ccd), utilizou-se sílica gel (60 HF 254 da Merck) e uma mistura de *n*-hexano/acetato de etila

(9:1v/v) como eluente. Ao término da reação, os produtos e substratos remanescentes foram separados do filme por decantação, sendo este lavado várias vezes com solvente orgânico. O solvente orgânico foi evaporado em um rota-evaporador, e os produtos obtidos analisados e caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H). As percentagens de conversão em produtos foram quantificadas por ^1H -RMN (BRUCKER AC 200MHz), utilizando CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna, e por titulação gravimétrica com solução padronizada de KOH (0,020 mol/L) (Figura 11).

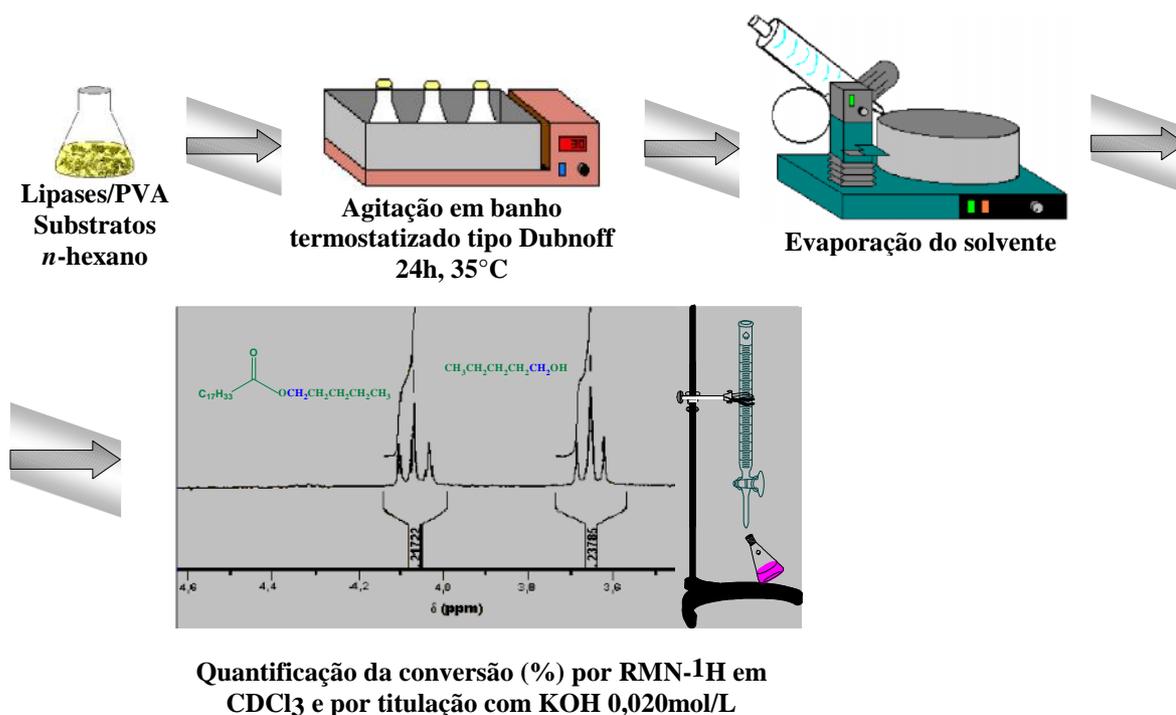


Figura 11 – Preparação do meio reacional e análise do produto.

As conversões a produtos foram quantificadas pelos espectros de RMN- ^1H , e foram calculadas por comparação da integração do triplete correspondente aos hidrogênios metilênicos do álcool ($-\text{CH}_2\text{OH}$) em $\sim 3,6$ ppm, com o triplete dos hidrogênios metilênicos do éster ($-\text{CH}_2\text{OCOR}$) em $\sim 4,1$ ppm (**Figura 12**).

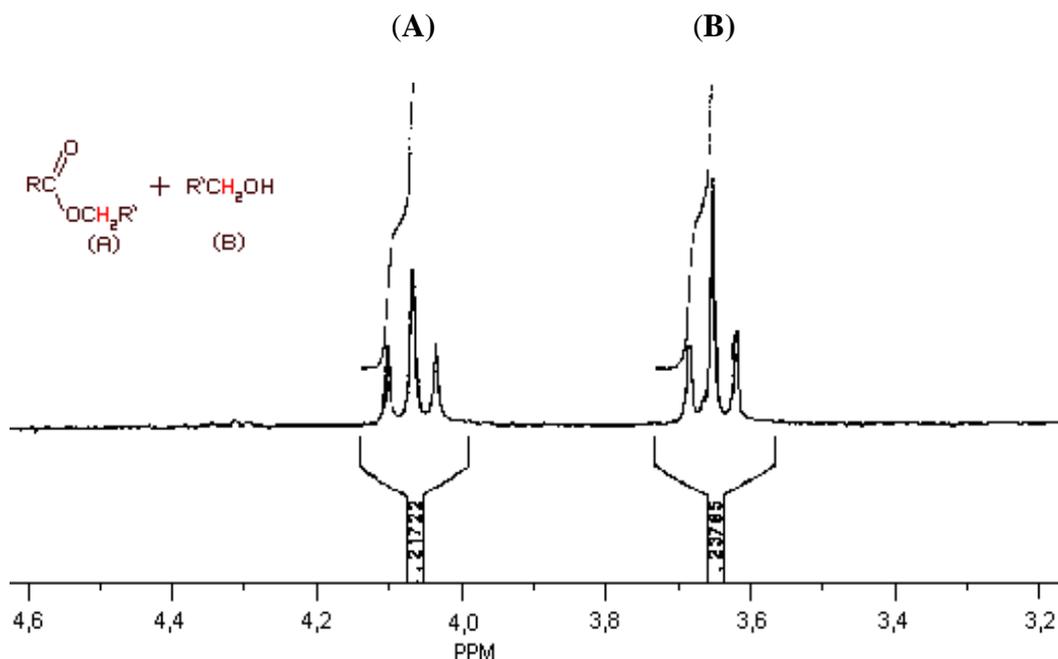


Figura 12 – Região do espectro de RMN- ^1H dos deslocamentos químicos dos prótons metilênicos do álcool e éster utilizada para o cálculo da percentagem de conversão (39%).

Na quantificação do produto por titulação, ao término da reação foi retirada uma alíquota de 2,0mL do meio reacional antes de evaporar o solvente. Foram adicionados aproximadamente 10mL de álcool etílico e três gotas do indicador fenolftaleína, e a solução titulada com KOH 0,02mol/L. Desta maneira, foi determinada a concentração do ácido carboxílico remanescente. A conversão foi, portanto, determinada através da diferença entre a concentração inicial de ácido no início e ao final da reação.

3.2.3. Determinação da Quantidade de Água nos Filmes Poliméricos

Para determinar o teor de água nos filmes de PVA com e sem a LPS e a LRO imobilizadas, estes foram triturados em pequenos pedaços e feitas análises por titulação pelo método de Karl-Fischer (Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau) (**Figura 13**). Os resultados são apresentados como média de triplicata.



Figura 13 – Fotografia do titulador automático de Karl Fischer.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da Quantidade de Água no Filme de PVA

Na literatura é mostrado que os biocatalisadores são circundados por camadas de água. A presença destas camadas é considerada um pré-requisito para a retenção da atividade enzimática em meio orgânico, devido à manutenção da estrutura terciária das enzimas. Portanto, este é um parâmetro importante e pode interferir não somente na atividade da enzima, mas também na sua estabilidade.^{3, 40, 41}

As porcentagens de água presente nos suportes de PVA sem lipases e com as lipases LPS, LRO, foram determinadas por titulação pelo método de Karl Fisher. Os resultados obtidos estão mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Valores dos teores de água (%) presentes nos filmes de PVA.

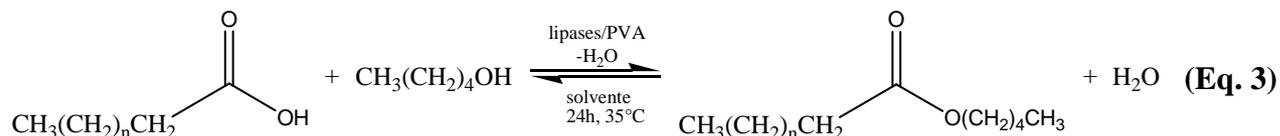
Sistema	Teor de água ^(a) (%)
PVA/LPS	7
PVA/LRO	9
PVA	12

(a) Média de 3 determinações

De acordo com estes resultados, os filmes de PVA contêm 7-12% de água. Deste modo é possível prever que as atividades catalíticas das lipases serão preservadas devido a presença da água nos sistemas utilizados.

4.2. Seleção de Lipases e Efeito do Doador Acila

Lipases de fontes variadas foram imobilizadas em filmes de PVA, visando avaliar a eficiência das mesmas para catalisar a reação de esterificação dos ácidos decanóico (C10), láurico (C12), mirístico (C14) e palmítico (C16) com *n*-pentanol em *n*-hexano (**Equação 3**).



$n = 7, 9, 11, 13$.

Na **Tabela 4**, são mostradas as conversões obtidas para os ésteres *n*-pentílicos derivados dos ácidos mirístico e palmítico.

Tabela 4 - Conversão(%) em miristatos (**7**) e palmitatos (**8**) de *n*-pentila com lipases imobilizadas em filmes de PVA.

Lipases	Conversão (%) ^(a)			
	Miristato de <i>n</i> -pentila (7)		Palmitato de <i>n</i> -pentila (8)	
	Titulação ^(d)	RMN- ¹ H	Titulação ^(d)	RMN- ¹ H
LPS ^(b)	84	99	92	99
LRO ^(b)	86	98	93	98
LMJ ^(b)	32	40	52	82
Lipolase ^(c)	23	41	43	81
LCR ^(b)	9	----	14	7

(a) 24h, 35°C, *n*-hexano (b) Amano, 50mg; (c) Novozymes, 50mg; (d) determinada por titulação com solução padronizada de KOH 0,020mol/L; média de 2 valores.

A formação dos produtos foi acompanhada por ccd, onde foram observadas três manchas, referentes ao ácido, ao álcool e ao éster. Por exemplo, na esterificação utilizando o ácido palmítico e *n*-pentanol os fatores de retenção (Rf) foram de 0,30 e 0,50 para o ácido e álcool, e 0,70 para o palmitato de *n*-pentila.

Analisando os valores obtidos por RMN-¹H, pode-se observar que utilizando as lipases LPS e LRO os valores de conversão em palmitatos e em miristatos foram muito próximos, e apresentaram valores de conversão elevados (> 90%). Este resultado pode ser devido a maior estabilidade conferida a LPS e LRO imobilizadas em filmes de PVA, em relação às outras lipases. Com as demais lipases (LMJ, Lipolase e LCR), as conversões em palmitatos foram superiores aos miristatos. Por exemplo, com a LMJ/PVA, o palmitato de *n*-pentila foi obtido com 82% e o miristato de *n*-pentila 40%.

Comparando os resultados obtidos por titulação com os obtidos por RMN-¹H, nota-se que os valores de conversão estão mais próximos quando se utilizam as lipases LPS e LRO. Estes resultados estão sendo mais estudados e explorados e também otimizados os métodos de análise, principalmente o da titulação.

A **Figura 14** mostra a ampliação do espectro de RMN-¹H, obtido na reação de esterificação do ácido palmítico com *n*-pentanol catalisada pela LRO, salientando a formação do éster através do triplete centrado em 4,1 ppm.

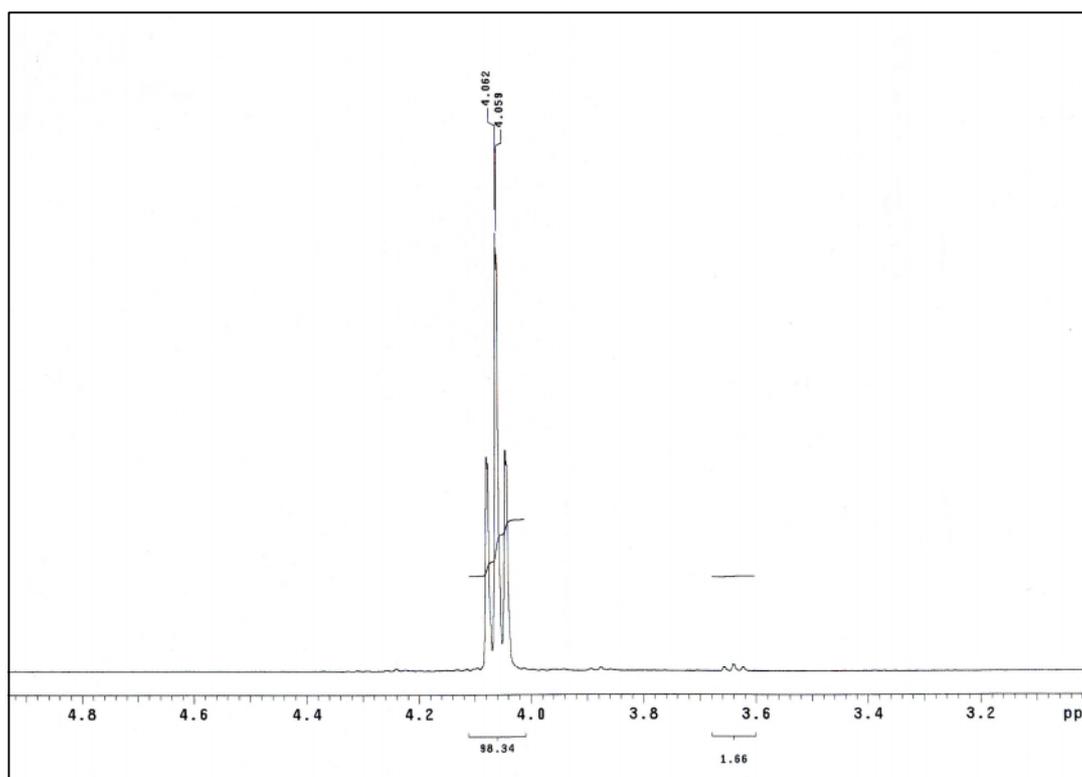


Figura 14 – Região ampliada do espectro de RMN- ^1H do produto da reação do ácido palmítico com *n*-pentano catalisada pela LRO, mostrando a formação do éster. (200MHz, CDCl_3)

Em sequência, foi realizada a reação de esterificação dos ácidos decanóico e láurico com *n*-pentanol em *n*-hexano utilizando as lipases LPS, LRO e LMJ imobilizadas em filmes de PVA. Conforme já apresentado, ao utilizar estas lipases obteve-se os maiores valores de conversão na preparação do miristato de palmitato de *n*-pentila.

As conversões a produtos foram quantificadas pelos espectros de RMN- ^1H , e comparadas com os obtidos anteriormente quando foram utilizados os ácidos mirístico e palmítico. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 15**.

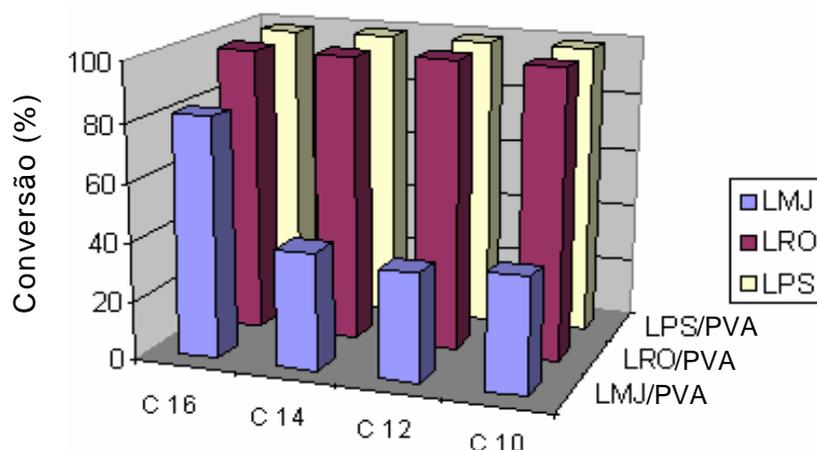


Figura 15 – Valores de conversão (%) em ésteres em função dos ácidos carboxílicos e lipases, 24h, 35°C, *n*-hexano.

Analisando os resultados obtidos, observou-se que ao utilizar as lipases LPS e LRO imobilizadas, os valores de conversão com todos os ácidos foram quantitativos (>98%). Este efeito pode ser devido a maior estabilidade conferida a LPS e LRO após imobilização em filmes de PVA, em relação a LMJ. Utilizando a LMJ as conversões foram de aproximadamente 40% na esterificação dos ácidos decanóico, láurico e mirístico. A conversão em palmitato de *n*-pentila com esta lipase foi de 82%.

Este efeito pode ser devido a cadeia do ácido palmítico ser mais adequada ao tamanho e forma do sítio ativo da LMJ. De acordo com Faber e outros autores, a habilidade de vários substratos em se ligarem ao sítio de lipases e liberar uma quantidade suficiente de energia, que é requerida para ocorrer mudanças na conformação e tornar um catalisador mais eficiente, é diferente. Substratos menores, que não possuem habilidade em liberar energia suficiente, não são hábeis em mudar a conformação da lipase para uma forma cataliticamente ativa e a reação se processa mais lentamente. Entretanto, substratos com cadeias maiores liberam energia suficiente para provocar as mudanças desejadas e a reação se processa rapidamente formando os produtos com altos valores de conversão².

4.3. Efeito do Solvente

A seguir, as lipases LMJ (25mg) e LCR (25mg) foram imobilizadas simultaneamente em filmes de PVA, e estes sistemas usados para catalisar a reação do ácido palmítico com *n*-pentanol. Este estudo, visa avaliar se uma lipase poderia ajudar na conversão da outra. Um outro parâmetro avaliado foi a influência da polaridade do solvente nos valores de conversão. Variou-se o volume de *t*-butanol (log P = 1,45) e de *n*-hexano (log P = 3,5), mantendo-se constante o volume total (25mL). Os dados obtidos estão apresentados na **Tabela 5**.

O *t*-butanol foi escolhido por ser um solvente polar e pouco reativo em reações de esterificação. Levou-se também em consideração, a alta solubilidade dos substratos nestes solventes.

Tabela 5- Efeito da polaridade do solvente na conversão em palmitatos de *n*-pentila catalisada pelas lipases LMJ e LCR imobilizadas em filme de PVA^(a).

Mistura de solventes		Conversão (%) ^(b)
hexano (mL)	<i>t</i> -butanol (mL)	
25	0	53
24	1	29
20	5	18
15	10	18
10	15	7
0	25	20

(a) coquetel com LMJ (25 mg) e LCR (25mg), 24h, 35°C, (b) determinado por RMN-¹H

Pode-se observar que com *n*-hexano puro, a conversão em palmitato de *n*-pentila utilizando o coquetel de lipases (LMJ/LCR) foi de 53%, sendo maior do que o obtido somente com a LCR (7%) e menor do que somente com a LMJ (82%) (dados citados na **Tabela 4**).

Os resultados mostraram também que a medida em que aumenta a quantidade de *t*-butanol no meio, ocorreu uma diminuição da conversão em éster. Com 15mL de *t*-butanol ,

a conversão foi de apenas 7%. Ao utilizar apenas *t*-butanol, a conversão em éster foi de 20%.

De maneira geral, foi observado uma diminuição na porcentagem de conversão a éster (de 53 para 7%) com o aumento da polaridade do solvente. Um outro fator a ser analisado, é a estrutura do solvente bem como a possibilidade dos mesmos interagirem com as enzimas através de ligações de hidrogênio, como o *t*-butanol.

Estes resultados mostram a grande importância da escolha do solvente nas biotransformações para obter os produtos com altas porcentagens de conversão, e que estes deverão ser mais explorados para uma melhor compreensão destes efeitos.

É bem documentado que os solventes mais apolares ($\log P > 2,5$) são mais adequados como meio reacional, pois não perturbam a camada de água que envolve a enzima deixando o biocatalisador no seu estado ativo. Solventes mais polares (com $\log P < 2,5$) formam, em geral, os produtos com menores conversões. Estes provavelmente retiram a camada de água essencial ao redor da enzima causando uma distorção na conformação cataliticamente ativa da enzima⁴².

4.4. Esterificação de Ácidos Graxos Insaturados com *n*-Pentanol

Foram efetuados também estudos da reação de esterificação dos ácidos graxos monoinsaturados 4-pentenóico (**9**), *trans*-2-octenóico (**10**), citronélico (ácido 3,7-dimetil-6-octenóico) (**11**), oleico (ácidos *cis*-9-octadecanóico) (**12**) e dos ácidos graxos com duas insaturações tais como o sórbico (ácido 2,4-hexadienóico) (**13**) e linolêico (ácido *cis*-9, *cis*-12-octadecadienóico) (**14**) com *n*-pentanol. Neste estudo foram utilizadas a LPS e a LCR imobilizadas em filmes de PVA. A estrutura dos ácidos está representada na **Figura 16**.

As reações foram realizadas com *n*-hexano como solvente, exceto quando se utilizou o ácido sórbico, que não é solúvel neste solvente. Com este substrato, foi utilizado o clorofórmio ($\log P = 2,0$), que conforme descrito anteriormente, possui um valor de $\log P$ adequado para ser utilizado em reações biocatalisadas.

Avaliou-se o efeito do tamanho da cadeia alquílica e da posição da ligação dupla na reação aos correspondentes ésteres.

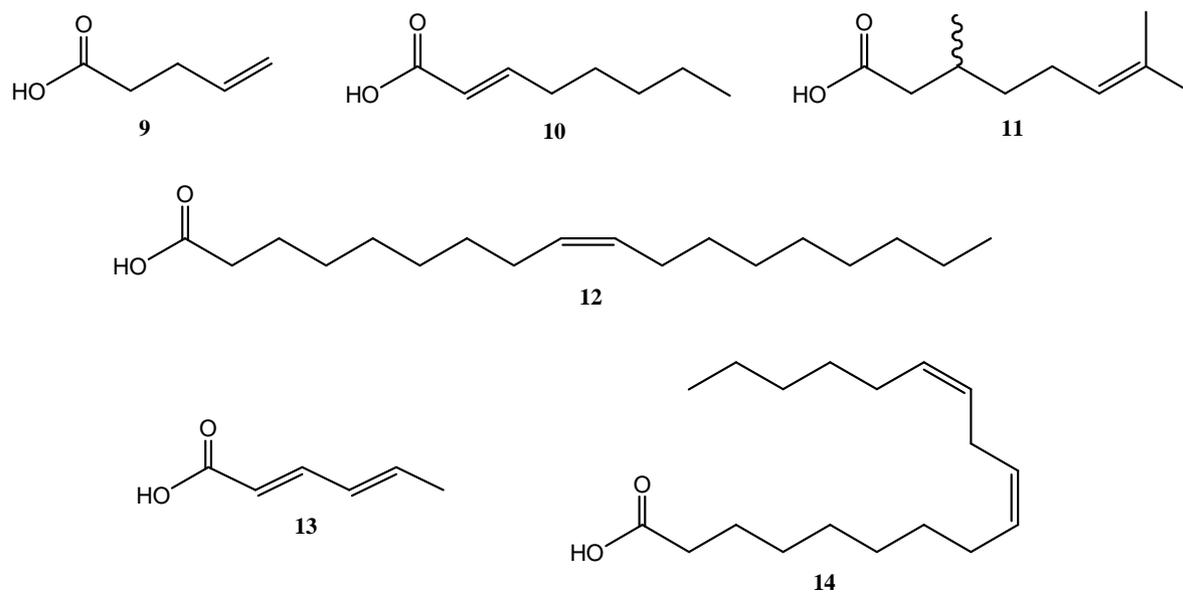


Figura 16 – Estrutura dos ácidos graxos insaturados.

Os valores de conversão obtidos na reação de esterificação destes ácidos estão mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Conversão (%) em ésteres derivados de ácidos insaturados com *n*-pentanol com os sistemas LPS/PVA e LCR/PVA.

Ácidos	Conversão (%) ^(a)	
	LPS/PVA ^(b)	LCR/PVA ^(b)
4-pentenóico ^(b)	50	14
<i>trans</i> -2-octenóico ^(c)	10	< 1
citronélico	< 1	< 1
oleico	88	21
sorbico	< 1	< 1
linolêico ^(b)	27	13

(a) determinado por RMN-¹H [24h, 35°C, n-hexano]; (b) 50 mg.

Warwel e col. demonstraram, através da esterificação dos ácidos insaturados oleico (**12**), linoleico (**14**) e linolênico (3 insaturações) com *n*-butanol em *n*-hexano, que a seletividade das lipases depende tanto do número de ligações duplas, como da isomeria *cis-trans* dos ácidos graxos. Por exemplo, a lipase de *Candida cylindracea* (LCC) foi mais eficaz na esterificação dos ácidos com maior número de insaturações, sendo seletiva com relação aos isômeros *cis*. Utilizando a lipase de *Mucor miehei* (LMM) a especificidade foi independente do número de insaturações, com preferência pelos isômeros *cis*. A lipase de *Candida antártica* apresentou baixa seletividade tanto com relação aos isômeros *cis-trans*, quanto pelo número de insaturações dos ácidos⁴³.

As conversões obtidas em ésteres utilizando-se LPS/PVA foram superiores às com a LCR/PVA. Por exemplo, o 4-pentenoato de *n*-pentila foi obtido com 50 e 14%. A maior conversão foi obtida na esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol usando o sistema LPS/PVA, sendo 88%.

Na esterificação do ácido *trans*-2-octenóico obteve-se baixa conversão com a LPS/PVA (10%), e <1% com o sistema LCR/PVA. Este resultado provavelmente é devido à posição da ligação dupla mais próxima ao centro reacional, que por conjugação pode diminuir a reatividade da carboxila por efeitos eletrônicos. O mesmo efeito foi observado na reação de esterificação do ácido sórbico, onde obteve-se valores de conversão < 1% com ambas as lipases.

A **Figura 17** mostra as estruturas de ressonância dos ácidos *trans*-2-octenóico e sórbico.

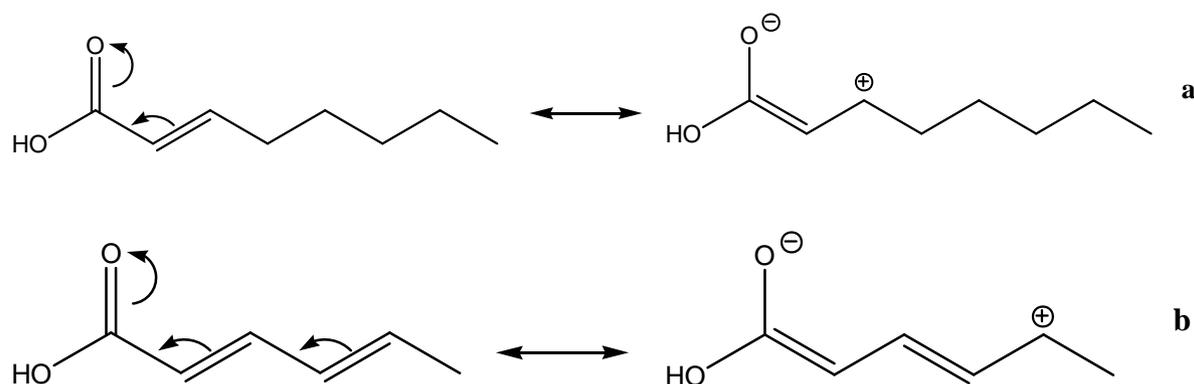


Figura 17 – Formas de ressonância dos ácidos (a) *trans*-2-octenóico e (b) sórbico.

Na esterificação do ácido citrônico com *n*-pentanol, a conversão foi <1% com ambas as lipases imobilizadas. Neste caso o grupo metila, posicionado próximo ao carbono da carbonila, pode, por efeito estérico, dificultar tanto o ataque nucleofílico da serina (primeira etapa do mecanismo da reação enzimática), quanto o ajuste deste substrato ao sítio ativo.

Nas reações do ácido linolêico (*9-cis*, *12-cis*) com *n*-pentanol, as conversões utilizando os sistemas LPS/PVA e LCR/PVA foram de 27 e 13%, respectivamente. Este ácido possui duas ligações duplas em posições afastadas do centro reacional, mas devido ao tamanho da cadeia e a estereoquímica das duplas, provavelmente o encaixe no sítio ativo não foi tão favorável, em comparação com o ácido oleico.

4.5. Reutilização e Tempo de Estocagem do Biocatalisador

A estabilidade da LPS/PVA foi verificada através de sucessivas reações do ácido láurico com *n*-pentanol em *n*-hexano a 35°C, por 24h. O filme foi reutilizado por sete vezes. Neste estudo analisou-se também o tempo de estocagem, em *n*-hexano, do biocatalisador imobilizado, sendo o total de 239 dias. Os resultados são mostrados na **Figura 18**.

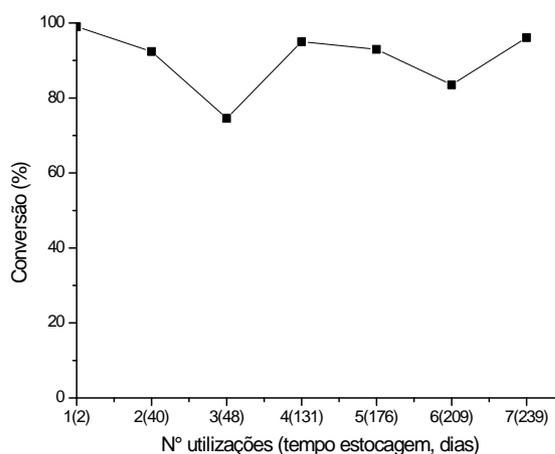


Figura 18 – Influência do tempo de estocagem e reutilização na esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol com o sistema LPS/PVA, 35°C.

Os resultados mostram que o éster foi formado com valores de conversão elevados em todos os ciclos reacionais, mesmo após 239 dias de estocagem no solvente orgânico. Os valores se mantiveram relativamente constantes, estando entre 75-99%. Estes resultados comprovam que durante a estocagem em solvente, a LPS imobilizada em filme de PVA manteve sua estabilidade, formando o produto em altas conversões. Desta maneira, a imobilização de biocatalisadores pode ser viável economicamente e ser utilizada em processos biossintéticos.

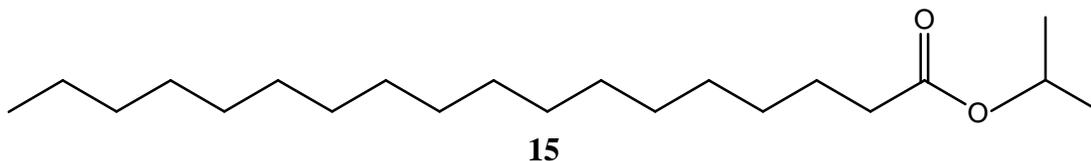
4.6. Síntese do Estearato de *iso*-Propila

O estearato de *iso*-propila (**15**) é um éster encontrado em alguns cosméticos. Pode ser utilizado como emoliente, para o melhor espalhamento das emulsões, e também como solvente para aditivos lipofílicos, auxiliando, por exemplo, na solubilidade dos princípios ativos contidos em protetores solares.⁴⁴

O ácido esteárico é pouco solúvel em *n*-hexano, e portanto foi adicionado 5 mL de *t*-butanol para aumentar sua solubilidade. Quando os sistemas LPS/PVA e LCR/PVA foram usados, não houve formação do produto desejado após 1 e 16 dias. A reação foi realizada a 35°C.

O *iso*-propanol é um álcool secundário, e deste modo efeitos estéreo podem também ter influenciado neste resultado.

Em estudos posteriores, serão testadas outras condições experimentais, tais como temperatura maior e o uso de outras lipases. As melhores condições serão utilizadas para a obtenção do miristato de *iso*-propila, que é também amplamente usado em cosméticos⁶.



5. CONCLUSÕES

- Os filmes de PVA contêm 7-12% de água, o que pode conferir uma maior estabilidade as lipases suportadas neste polímero.
- Os maiores valores de conversão (>90%) em decanoatos, lauratos, miristatos e palmitatos de *n*-pentila foram obtidos com as lipases LPS e LRO imobilizadas em PVA, com *n*-hexano.
- A imobilização simultânea de LMJ e LCR em PVA não influenciou significativamente na conversão em palmitato de *n*-pentila.
- A adição de *t*-butanol resultou na diminuição da conversão do palmitato de *n*-pentila, provavelmente devido ao aumento da polaridade do meio.
- No estudo da esterificação dos ácidos insaturados, os maiores valores de conversão foram obtidos com o ácido oléico, sendo de 88% com o sistema LPS/PVA e 21% com LCR/PVA.
- Os ácidos insaturados que possuem a dupla ligação posicionada próximo ao centro reacional (ácidos *trans*-2-octenóico e sórbico) formaram os produtos com baixos valores de conversão (1 – 10%).
- O sistema LPS/PVA foi reutilizado por sete vezes (239 dias de estocagem), e o laurato de *n*-pentila foi obtido com conversões de 83-99%.
- O estearato de *iso*-propila não foi obtido via enzimática com o sistema LPS/PVA.

- Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram que o álcool polivinílico é um suporte adequado para a imobilização de lipases. Os filmes com lipases são estáveis em meio orgânico e foram utilizados como biocatalisadores para a obtenção de diversos ésteres alifáticos de cadeias longas.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar a atividade das lipases estudadas após a imobilização em elastomero de maleato etileno propileno dieno (EPDM-g-AMO5) para sua posterior utilização nas reações de esterificação e em meio orgânico.
- Continuar com o estudo dos “coquetéis enzimáticos” utilizando outras lipases de atividades diferenciadas.
- Estudar o efeito da variação da massa das lipases em diversos solventes orgânicos, em função da temperatura e do tempo.
- Efetuar para fins comparativos, as reações citadas acima, na ausência do biocatalisador
- Efetuar o estudo da termoestabilidade das lipases imobilizadas nos filmes de PVA.
- Otimizar as condições reacionais na síntese do estearato de *iso*-propila e aplicar esta metodologia na preparação do miristato de *iso*-propila, que também é amplamente usado em cosméticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- UIEARA, M., **Química Orgânica e Biológica**, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 106, 2001
- 2- NELSON, D. L.; COX, M. M., **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 3ed USA, Saunders Publishing College, 2000.
- 3- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1997, cap. 1, p. 1-26.
- 4- SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. San Diego: Academic Press, 2000. 717p.
- 5- CAMPBELL, M. K.; **Biochemistry**, Saunders College Publishing, 2ª Ed., p. 137, 1995.
- 6- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C., Modificação de óleos e gorduras por biotransformação, **Quím. Nova**, 2004, 27, 1, 146-156.
- 7- CASTRO, H. F.; Anderson, W. A., Fine Chemicals by biotransformations using lipases. **Quím. Nova**, V. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.
- 8- FUCIÑOS, P.; ABADÍN, C. M.; SANROMÁN, A.; LONGO, M. A.; PASTRANA, L.; RÚA, M. L., Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus*, HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. **J. Biotechnol**, p. 233-241, 2005.
- 9- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C.; Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.** v. 19, p. 627-662, 2001.

10- BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S. et al. A serine protease triad form the catalytic center of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

11- CYGLER, M.; SCHRAG, D. J., Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. **Biochim. Biophys. Acta**, p. 205-214, 1999.

12- www.expasy.ch/spdbv/text/getpc.htm, **Swiss Protein Data Bank Viewer** acessado em 09/05/2005.

13- Biotimes – Revista Bioindustrial Trimestral da Novozymes, www.novozymes.com, 1998-2006.

14- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; Industrial applications of microbial lipases **Enzyme Microb. Technol.**, v.39, p. 235–251, 2006.

15- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V., Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

16- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K.; Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 89, p. 17-34, 2003

17- BAI, Y. X.; LI, Y. F.; YANG, Y.; YI, L. X.; Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized nanoscale SiO₂ spheres. **Process Biochem.** v. 41, p. 770-777, 2006.

18- CASTILLO, E.; TORRES-GAVILÁN, A.; SEVERIANO, P.; ARTURO, N.; LÓPEZ-MUNGUÍA A.; Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. **Food Chem.** v. 100, p. 1202–1208, 2007 (disponível *on line*).

19- CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQUI, A. N.; GUPTA, A. K.; A Structural basis for the chiral preferences of lipases, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, p. 3180-3186, 1994.

20- GOTO, M.; HATANAKA, C. GOTO, M., Immobilization of surfactant-lipase complexes and their high heat resistance in organic media. **Biochem. Eng. J.**, v. 24, p. 91-94, 2005.

21- DALLA-VECCHIA, R.; SEBRÃO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V., Carboxymethylcellulose and poly (vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. **Process Biochem.**, v. 40, p. 2677-2682, 2005.

22- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. et al. Customizing lipase for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 9, n. 4, p. 113-148, 2000.

23- PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M.; Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **J. Mol. Catal.** v. 39, p. 83-90, 2006.

24- ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.

25- YE, P.; XU, Z.; WU, J.; INNOCENT, C.; SETA, P., Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization. **Biomaterials** v. 27, p. 4169-4176, 2006.

26- ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. ^a P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media. **J. Biotechnol.**, v. 66, p. 61-67, 1998.

27- LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification. **Biotechnol. Adv.**, v. 15, n. 1, p. 115, 1997.

-
- 28- KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, n. 11, p. 241-246, 2001.
- 29- BASHEER, S.; MOGI, K.; NAKAJIMA, M. Surfactant-modified lipase for the catalysis of the interesterification of triglycerides and fatty acids. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 45, p. 187-195, 1995.
- 30- CARTA, G.; GAINER, J. L.; BENTON, A. H. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 37, p. 1004-1009, 1991.
- 31- TRIANTAFYLLOU, A. O.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. et al. Effects of sorbitol addition on the action of free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 45, p. 406-414, 1995.
- 32- DAVE, R.; MADAMWAR, D., Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. **Process Biochem.** v. 41, p. 951-955, 2006.
- 33- SOLOMONS, G.; FRYHLE, C., **Química Orgânica**, 7^a ed., v. 1, p. 399-400, 2001.
- 34 AHN, J. H.; PAN, J. G.; RHU, J. S. ,Expression of the lipase and ABC transporter gene Cluster, tliDEFA, Enhances lipase secretion in Pseudomonas spp. , **App. Envir. Microbiol.** 67(12), p. 5506-5511, 2001.
- 35- KHEADR, E. E.; VUILLEMARD, J. C.; EL-DEEB, S. A., Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening, **Food Res. Internat.** v. 36, p. 241-252, 2003.
- 36- McMurry, J., **Química Orgânica**, 4^a Ed., v.2, p. 188, 1997.

37- PAVIA D. L.; LAMPAMAMN G. M.; G. S. KRIZ, **Introduction to Organic Laboratory Techniques**, 3^a Ed., Saunders Golden Sunburst Series, p. 86, 1988.

38- Novozymes Product Sheet – Ficha Técnica, 2004

39- Ficha Técnica da Amano Pharmaceutical CO, 2004

40- KLIBANOV, A. M. Enzymes work in organic solvents. **CHEMTEC**, p. 354-359, 1986.

41- CHEN, Z. G.; ZONG, M. H.; LI, G. J.; Lipase-catalyzed acylation of konjac glucomannan in organic media, **Process Biochem.** v. 41, p. 1514, 2006

42 - LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K. Et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 30, p. 81-87, 1987.

43 - WARWEL, S.; BORGDORF, R.; BRÜHL, L.; Substrate selectivity of lipases in the esterification of oleic acid, linoleic acid, linolenic acid and their all-*trans*-isomers and in the transesterification of *cis/trans*-isomers of linoleic acid methyl ester. **Biotechnol. Lett.**, v. 21, p. 431-436, 1999

44 - <http://www.dhaymers.com.br/default.asp?area=6&id=78>, acessada em 15/08/2006.