



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CFM- CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
QMC 5510 – Estágio Supervisionado**



**Síntese via enzimática de ésteres com lipases  
imobilizadas em filmes de dextrana**

**Alexandre Machado Ferraz**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento  
Co-orientador: Thiago Bergler Bitencourt**

**Florianópolis, agosto de 2006.**

*“Se cheguei aonde cheguei e consegui fazer tudo que fiz,  
foi porque tive a oportunidade de crescer bem, num bom ambiente familiar, de  
viver bem, sem problemas e de ser orientado no caminho certo e nos momentos  
decisivos da minha vida.”*

*Ayrton Senna*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Aos meus pais EneDir e Jussélia, a minha irmã Vanessa por todo amor e confiança recebido. Obrigado por fazer de “meus sonhos” também os seus. Meu respeito e minha eterna gratidão: AMO VOCÊS.

Aos meus familiares que de uma forma ou de outra contribuíram em minha vida acadêmica, em especial aos meus avôs Tô e Léla pela força incondicional.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria da Graça Nascimento pela sua paciência, incentivo, orientação e amizade sempre presentes ao longo da realização deste trabalho. Muito obrigado.

Ao co-orientador e amigo Thiago Bergler Bitencourt, pelo companheirismo, apoio e sua valiosa contribuição na realização deste trabalho, minha gratidão.

Aos amigos do Laboratório de Biocatálise (Aline, Pati, Cris, Tiago, Vanessa, Damianni, Rosane, Isabel, Fernanda, Marcelo) pelos ensinamentos repassados no laboratório e pelas boas risadas. Muito obrigado.

Aos amigos de tempos: Mano, Sano, Ediana, Greyce, Pedra, Kátia, Marcella, meu cunhado Hugo, e em especial ao carinho e companheirismo da Ana que procurou sempre entender e me compreender. Valeu!

Aos grandes amigos feitos na faculdade: Paulo, Heros, Jair, Maria, Larissa, Paulinha, Suellen, Roberta, Elisa, T. Frizon, T. Conceição, Alessandra, Gabriel, Elaine e Geórgia, e muitos outros não citados, porém não menos especiais: muito obrigado pela força prestada sempre e pela “paciência” em ter me ajudado ao longo destes anos.

Aos professores: Marcus Mandolesi Sá, Maria Marta de Souza Sierra, José Roberto Bertolino, Eduardo Pinheiro, Eduardo Carasek e Luiz Madureira pelos ensinamentos e atenção prestada.

Ao Departamento de Química (funcionários, bolsistas e professores) pela atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi, pela doação da dextrana.

A Central de Análises, por tornar possível nosso trabalho, com suas análises.

A UFSC, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e facilidades concedidas.

A Amano e a Novozymes, pelo fornecimento das enzimas.

## Índice Geral

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Enzimas.....	1
1.2 Lipases.....	6
1.3 Imobilização de enzimas.....	9
1.3.1 Confinamento em matrizes sólidas.....	12
1.4 Polissacarídeos.....	13
1.4.1 Dextranas.....	15
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. METODOLOGIA	
3.1. Reagentes, solventes e lipases utilizadas.....	18
3.2.Equipamentos, caracterização do suporte polimérico e caracterização/quantificação dos produtos.....	19
3.3 Métodos experimentais.....	20
3.3.1 Preparação dos filmes de dextrana com e sem enzimas .....	20
3.3.2 Preparação do meio reacional: síntese do laurato de <i>n</i> - propila.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Preparação dos filmes de dextrana.....	24
4.2 Caracterização do suporte.....	26
4.2.1 Estabilidade frente a solventes orgânicos.....	26
4.2.2 Determinação da quantidade de água nos filmes.....	27
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
4.3 Síntese do laurato de <i>n</i> -propila catalisada por lipases.....	29
4.4 Influência da massa de lipase.....	32
4.5 Influência do tempo de reação.....	34
4.6 Influência do solvente no meio reacional.....	35
4.7 Reutilização dos filmes de dextrana/glicerol com lípases imobilizadas.....	37

5. CONCLUSÕES FINAIS.....	39
6. PERSPECTIVAS.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
8. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS.....	47

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Representações gráficas, da estrutura tridimensional obtida por Raio-X, da lipase de <i>Penicillium sp</i> .....	1
<b>Figura 2.</b>	Representação esquemática do mecanismo de uma reação enzimática (adaptado da ref. 9 ).....	3
<b>Figura 3.</b>	Diagrama de energia de uma reação na presença e ausência de um catalisador. $E_a$ é a energia de ativação e $\Delta G^\circ$ a variação da energia livre padrão entre reagentes e produtos.....	4
<b>Figura 4.</b>	Utilização relativa das enzimas em biotransformações.....	5
<b>Figura 5.</b>	Representação gráfica, da estrutura tridimensional obtida por Raio-X, da lipase de <i>Candida rugosa</i> (LAY).....	6
<b>Figura 6.</b>	Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.....	7
<b>Figura 7.</b>	Resolução cinética da mistura racêmica do éster 2-etóxietil-ibuprofeno.....	9
<b>Figura 8.</b>	Esterificação regiosseletiva da D-glicose com L-fenilalanina.....	9
<b>Figura 9.</b>	Métodos mais comuns de imobilização de enzimas.....	11
<b>Figura 10.</b>	Unidade monomérica da dextrana.....	15
<b>Figura 11.</b>	Preparação dos filmes com ou sem lipases.....	21
<b>Figura 12.</b>	Espectro de RMN- $^1H$ , de uma alíquota da reação de esterificação enzimática do ácido láurico com n-propanol. [DEX/G/LPS 50mg, 24h, 35°C, n-hexano, 77% de conversão (400MHz, $CDCl_3$ )].....	22
<b>Figura 13.</b>	Preparação do meio reacional e isolamento dos produtos.....	23
<b>Figura 14.</b>	Fotomicrografia de filme de dextrana DEX/G (a) 50 x , (b) 2000X e filme de DEX/G/LPS (c) 500 X e (d) 1000X.....	28
<b>Figura 15.</b>	Fotomicrografia do filme de dextrana/glicerol com LPS, 2000X.....	29
<b>Figura 16.</b>	Reação de esterificação de ácido láurico com n-propanol mediada por lipases livres ou imobilizadas.....	29
<b>Figura 17.</b>	Espectro de infravermelho do laurato de n-propila (filme).....	30
<b>Figura 18.</b>	Espectro de RMN- $^1H$ do laurato de n-propila (400MHz, $CDCl_3$ ).....	31

<b>Figura 19.</b>	Efeito da massa de lipases imobilizadas em filme de DEX/G na esterificação do ácido láurico com <i>n</i> -propanol. [ácido] e [álcool] = 5mmol, 24h, 35°C, <i>n</i> -hexano.....	<b>33</b>
<b>Figura 20.</b>	Percentagem de conversão em laurato de <i>n</i> -propila em função do tempo catalisada por lípases imobilizadas em filmes de DEX/G. [ácido] e [álcool] = 5mmol, 24h, 35°C, <i>n</i> -hexano.....	<b>34</b>
<b>Figura 21.</b>	Conversão em oleato de <i>n</i> -propila em função do número de reutilização e tempo de estocagem, utilizando os suportes DEX/G/LPS, DEX/G/LLM e DEX/G/LRO. [ácido] e [álcool] = 5mmol, 24h, 35°C, <i>n</i> -hexano.....	<b>37</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Classificação das enzimas, segundo a IUBMB.....	<b>2</b>
<b>Tabela 2.</b>	Lipases utilizadas.....	<b>18</b>
<b>Tabela 3.</b>	Influência da adição de PCL nos filmes de dextrana.....	<b>25</b>
<b>Tabela 4.</b>	Influência da quantidade de gelatina e glicerol nos filmes de dextrana	<b>25</b>
<b>Tabela 5.</b>	Influência da adição de glicerol nos filmes de dextrana com glicerol....	<b>26</b>
<b>Tabela 6.</b>	Estabilidade dos filmes em solventes orgânicos.....	<b>27</b>
<b>Tabela 7.</b>	Conversão em laurato de <i>n</i> -propila utilizando lípases livres e imobilizadas.....	<b>32</b>
<b>Tabela 8.</b>	Efeito da variação da polaridade do solvente na esterificação do ácido láurico com <i>n</i> -propanol com o sistema DEX/G/LPS.....	<b>36</b>

## Lista de abreviaturas

%c - percentual de conversão

CCD - cromatografia de camada delgada

$\text{CDCl}_3$  – clorofórmio deuterado

Col. - colaboradores

DEX - Dextrana

$E_a$  - Energia de ativação

G - glicerol

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

IV - infravermelho

LAN - lipase de *Aspergillus niger*

LAY - Lipase de *Candida rugosa*

LMJ - lipase de *Mucor javanicus*

Log P - logaritmo do coeficiente de partição

LPP - lipase Pancreática de porco

LPS - lipase de *Pseudomonas sp*

LRO - lipase de *Rhizopus orizae*

M.M. - massa molar

MEV – microscopia eletrônica de varredura

n.d. - não houve detecção do produto

PCL – poli-caprolactona

PEO – poli-(óxidoetileno)

pH - potencial hidrogeniônico

RMN- $^1\text{H}$  - ressonância magnética nuclear de próton

TMS - tetrametilsilano

UIBBM - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

Ref. - Referência

## RESUMO

Lipases de diferentes fontes foram imobilizadas em filmes de dextranas e posteriormente utilizadas em reações de esterificação do ácido láurico com *n*-propanol. A preparação dos filmes foi feita utilizando 0,7g de dextrana com 0,2g de glicerol e 15mL de água. Estes foram submetidos a testes de solubilidade com solventes orgânicos por 24h e análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Como biocatalisadores foram utilizadas as lipases de *Candida rugosa* (LAY), *Pseudomonas* sp. (LPS), *Rhizopus orizae* (LRO), Pancreática de porco (LPP), *Aspergillus niger* (LAN) e *Mucor javanicus* (LMJ). Foram investigados alguns parâmetros experimentais que influenciam nestas reações, a 35 °C. A porcentagem de água nos filmes de dextrana/glicerol foi determinada obtendo-se 12-15% de água nos filmes. As análises de MEV mostraram que a imobilização das lipases ocorreu na superfície do polímero. Foram também avaliadas as atuações das diversas lipases na forma livre ou imobilizada na formação do laurato de *n*-propila. De modo geral, as conversões em produto variaram com a fonte da lipase utilizada. A conversão em éster foi maior após a imobilização dos biocatalisadores em filme de DEX/G com todas as lipases testadas. Utilizando a LRO a conversão em éster aumentou de >5% para 91%, após a imobilização em 8h de reação. Com o sistema DEX/G/LPS, observou-se que após 24 h a conversão foi de 96%. Com o sistema DEX/G/LAY, a reação iniciou-se após 8 h, e após 24h a conversão foi de 36%. Com os sistemas DEX/G/LAY, DEX/G/LAN e DEX/G/LMJ e DEX/G/LPS após 12 h de reação, as conversões em éster foram o de 8, 15, 37 e 60%, respectivamente.

No estudo da influência da massa de lipase imobilizada, verificou-se que as maiores conversões foram obtidas com 50mg do biocatalisador. O efeito do solvente orgânico na reação foi também avaliado. Os dados mostraram que solventes com log P 2,5 são excelentes como meio reacional, pois formaram o laurato de *n*-propila com maiores conversões, sendo 61,96 e 64% com o cicloexano, hexano e heptano.

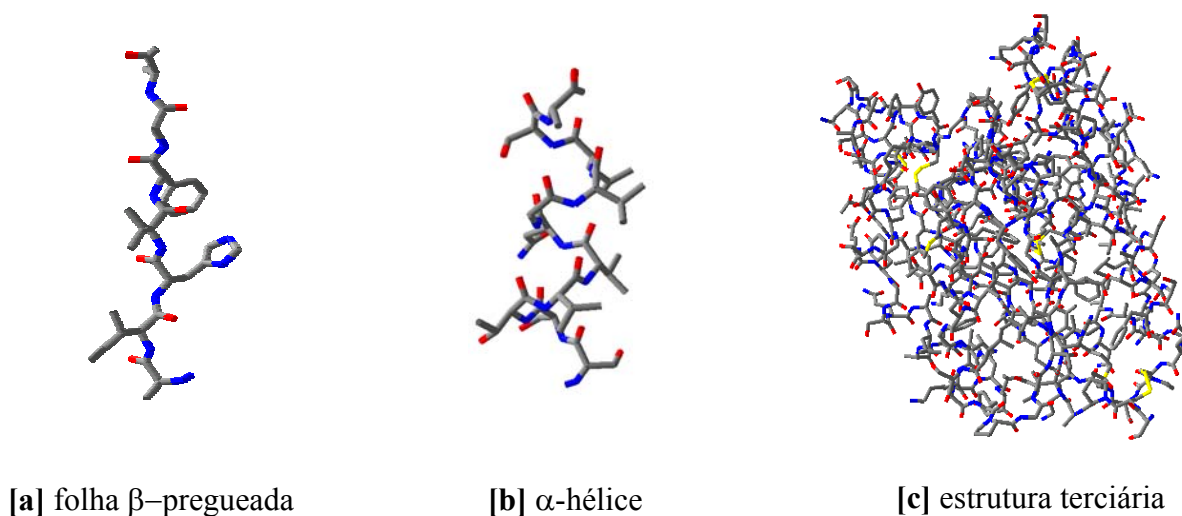
Os resultados obtidos neste trabalho, mostram a habilidade e importância do uso de biocatalisadores em reações de esterificação, bem como a viabilidade do processo de imobilização de lipases utilizando dextranas como suporte. As reações foram realizadas em condições brandas, e o suporte pode ser reutilizado tornando o processo eficaz e de baixo custo.



# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1. Enzimas

As enzimas são conhecidas como biocatalisadores e são geralmente proteínas, isto é, são formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas.<sup>1,2,3</sup> A seqüência exata de aminoácidos em uma proteína é chamada de estrutura primária. A conformação tridimensional é chamada de estrutura secundária (**Figuras 1a e 1b**) e a disposição espacial da seqüência é designada como estrutura terciária (**Figura 1c**).<sup>4</sup>



**Figura 1.** Representações gráficas, da estrutura tridimensional obtida por Raios-X, da lipase de *Penicillium sp.*<sup>4</sup>

Estas biomoléculas apresentam especificidade e poder catalítico superiores aos catalisadores produzidos sinteticamente. A atividade catalítica depende da integridade da sua conformação protéica nativa (estrutura tridimensional). A desnaturação ou dissociação de uma enzima em subunidades pode eliminar a atividade catalítica.<sup>5</sup>

As oportunidades sintéticas proporcionadas pelas enzimas se baseiam na especificidade com que ocorrem as reações. As enzimas mais úteis para aplicações em síntese orgânica são aquelas que aceitam várias modificações

estruturais no substrato, porém retém a habilidade de operar estereoespecificamente em cada substrato em particular.<sup>2, 3, 5</sup>

No Banco de Dados de Proteínas (PDB), encontram-se catalogados 37392 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucléicos e complexos proteína/ácido nucléico), sendo que destas 34221 são proteínas.<sup>4,6</sup>

A classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as reações catalisadas por enzimas em seis grupos principais, e cada uma delas em sub-grupos de acordo com o tipo de reações que catalisam.<sup>2,6</sup>

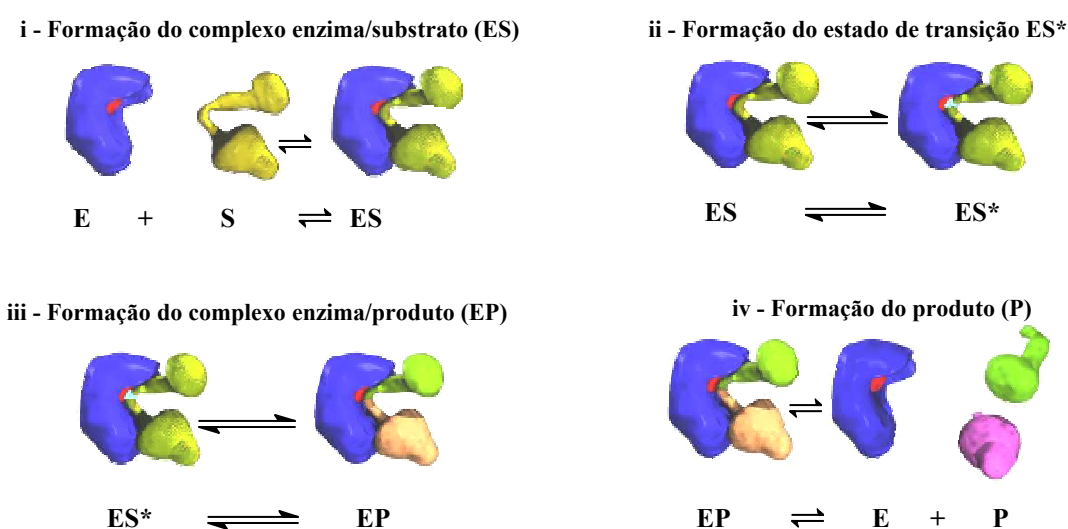
**(Tabela 1)**

**Tabela 1:** Classificação das enzimas, segundo a IUBMB.

Número	Classes	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	oxidoreduases	transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	hidrogenases, oxidases, peroxidases
2	transferases	reações de transferência de grupos	transaldolases, transcetolases
3	<b>hidrolases</b>	Reações de hidrólise	esterases, <b>lipases</b> , peptidases, fosfatases
4	liases	reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos.	descarboxilases, fosfatases
5	isomerases	transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros.	racemases, epimerases, oxireduases, mutase
6	ligases	formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato.	Sintetases

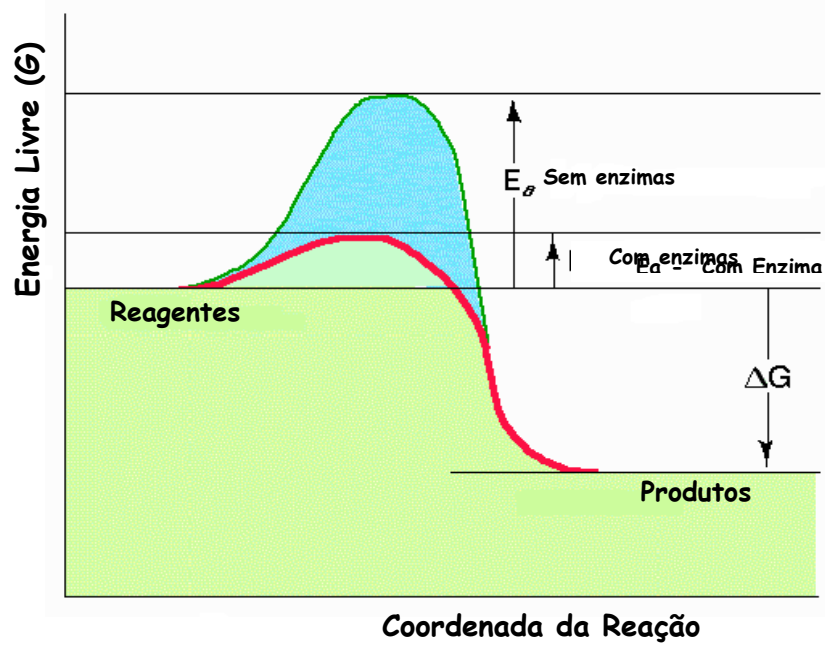
As reações catalisadas por enzimas podem ser feitas em uma grande faixa de pH e em geral, apresentam grande estabilidade térmica.<sup>7</sup>

Além disso, catalisam uma grande variedade de reações e podem freqüentemente promover reações em posições muito pouco reativas do substrato.<sup>8</sup> São altamente eficientes, aumentando a velocidade das reações na ordem de  $10^{12}$  vezes e geralmente são muito seletivas em termos dos tipos de reações catalisadas, com relação à estrutura e estereoquímica do substrato e do produto. Essa especificidade só ocorre devido ao formato de seu sítio catalítico, que só atua em moléculas com configuração bastante precisa.<sup>8</sup> A **Figura 2**, mostra uma representação esquemática do mecanismo de uma reação catalisada por enzima.



**Figura 2.** Representação esquemática do mecanismo de uma reação enzimática (adaptado da ref. 9).

As enzimas aumentam a velocidade de reação, diminuindo a energia de ativação ( $E_a$ ) entre reagentes e produtos. A capacidade catalítica é devido à aproximação favorável entre substrato e enzima para a formação do complexo enzima/substrato. A **Figura 3** apresenta o diagrama de energia livre ( $\Delta G$ ), em função da coordenada de reação para uma reação não catalisada e uma catalisada por enzima.<sup>2,3,5</sup>



**Figura 3.** Diagrama de energia de uma reação na presença e ausência de um catalisador.  $E_a$  é a energia de ativação e  $\Delta G^\circ$  a variação da energia livre padrão entre reagentes e produtos.

De maneira geral, em síntese orgânica, a utilização de enzimas está associada a três características principais:<sup>2,8,10</sup>

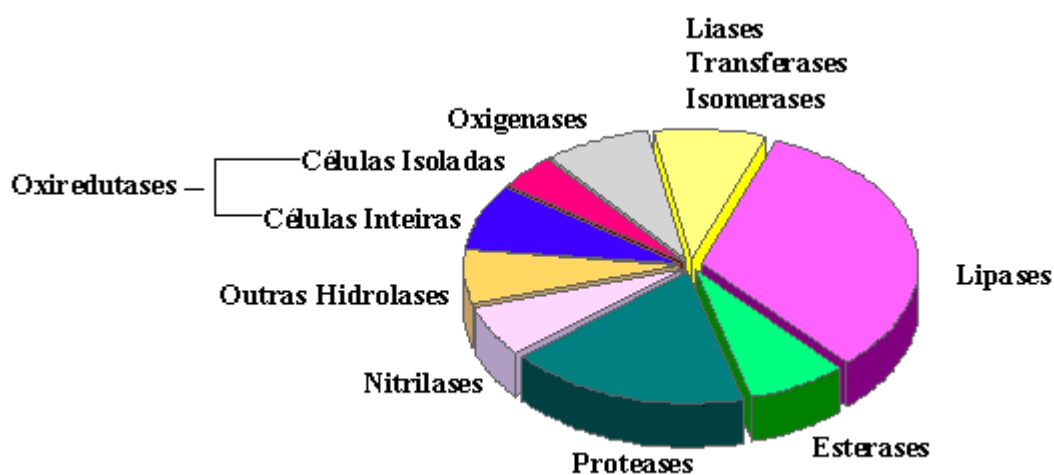
- **Quimiosseletividade:** podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos;
- **Regiosseletividade:** as enzimas podem distinguir grupos funcionais que estão situados em regiões diferentes do substrato;
- **Enantiosseletividade:** as enzimas são formadas de L-aminoácidos. Portanto, a quiralidade do substrato pode ser reconhecida. Assim, um produto pró-quiral pode reagir e formar um produto quiral, e um par de enantiômeros em uma mistura reagir com velocidades diferentes levando a resolução cinética.

A catálise enzimática depende do meio no qual se encontra a enzima. Geralmente esta é mais favorável em meio aquoso devido principalmente à idéia pré-concebida de que somente este meio é propício para manter a conformação

estrutural cataliticamente ativa.<sup>11</sup> Entretanto, atualmente sabe-se que muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas, ou ainda, até superior. Acredita-se que as enzimas são cataliticamente ativas em meio orgânico porque elas mantêm a estrutura nativa.<sup>12</sup>

Nos últimos anos tem aumentado o uso de biocatalisadores em meio orgânico, e com isso novas implicações teóricas e aplicações práticas estão surgindo. O uso destes é um campo intensivamente investigado devido ao seu uso em escala industrial, especialmente pela indústria farmacêutica.<sup>13</sup>

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulasas, amilases e lipases) são as mais freqüentemente utilizadas em síntese orgânica. Entre as várias razões que as tornam mais atrativas, pode se citar a ampla disponibilidade, baixo custo, condições brandas de síntese, facilidade no seu uso e aplicação.<sup>2</sup> **(Figura 4)**



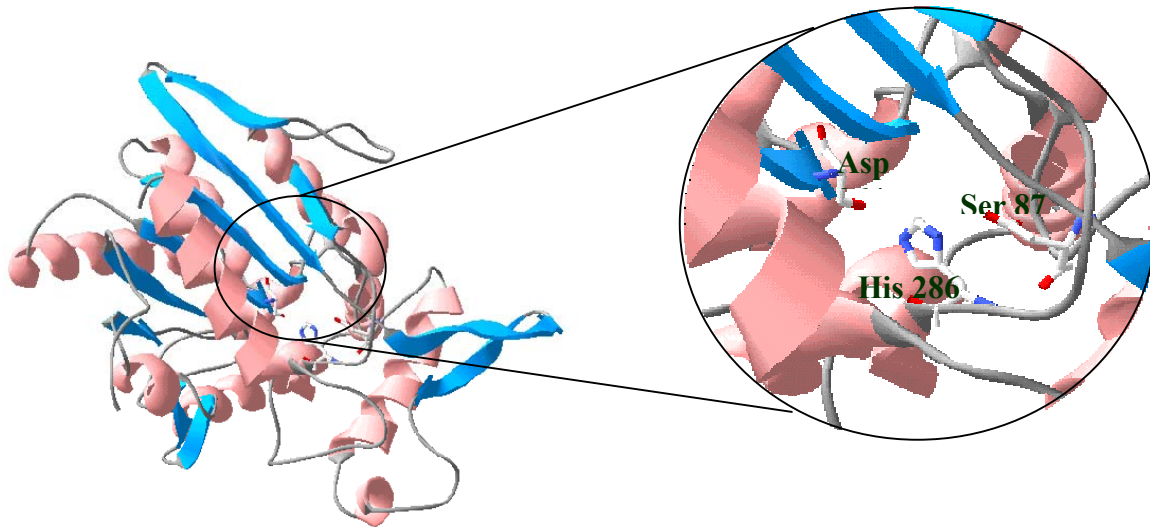
**Figura 4.** Utilização relativa das enzimas em biotransformações.

## 1.2. Lipases

As lipases são dotadas de uma especificidade pelo substrato que supera a especificidade de outras enzimas conhecidas. Podem ser empregadas na produção de fármacos, cosméticos, modificações de couros, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos e de outros materiais orgânicos sintéticos.<sup>14,15</sup> Têm sido isoladas de uma ampla variedade de tecidos de animais e plantas, sendo também produzidas por processos de fermentação (fungos e bactérias).<sup>16</sup>

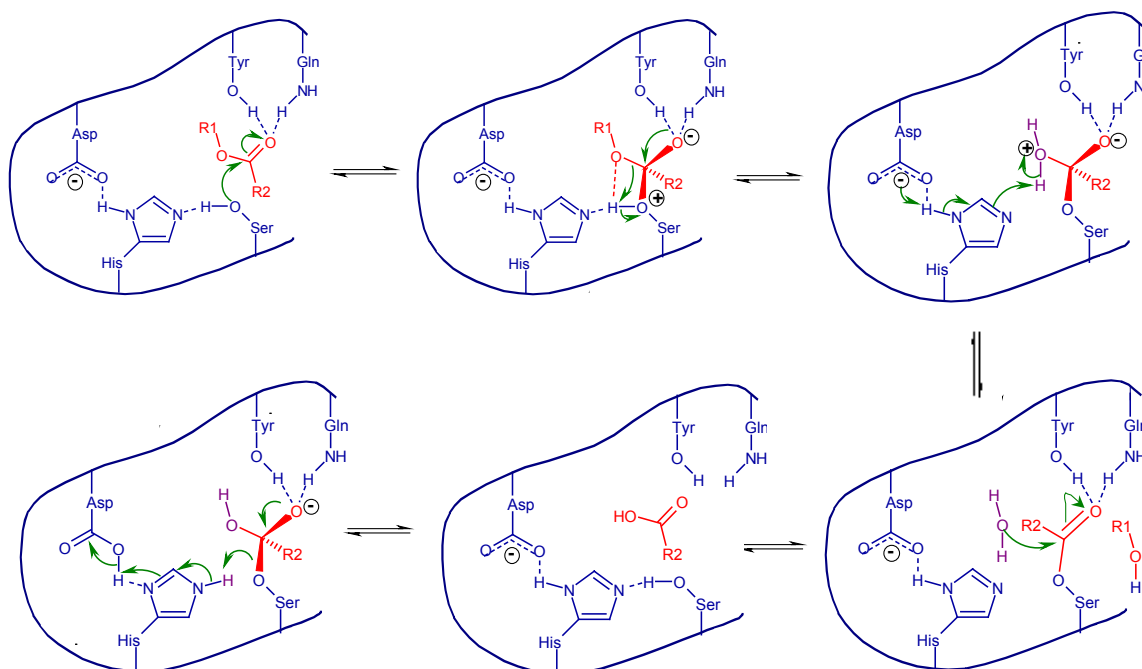
Em seu ambiente natural estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol. Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia principalmente na indústria de óleo e de alimentos, e em síntese orgânica de compostos enantiomericamente enriquecidos.<sup>17, 18 , 19</sup>

A **Figura 5**, mostra a representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase da *Candida rugosa* (LAY) com a ampliação do seu sitio ativo formado pela cadeia lateral da histidina, serina e ácido aspártico.



**Figura 5.** Representação gráfica, da estrutura tridimensional obtida por Raios-X, da lipase de *Cândida rugosa* (LAY).<sup>4</sup>

Todos os membros da família de estrutura  $\alpha/\beta$ -hidrolase possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, que consiste em cinco etapas; ligação ao substrato éster; formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica com o oxianion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio; quebra da ligação éster; saída da porção alcoólica e hidrólise do complexo acil-enzima. **(Figura 6)**

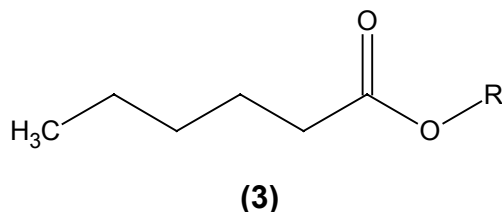
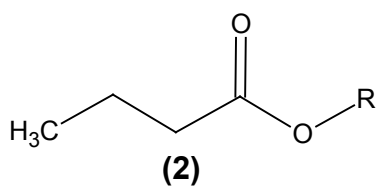
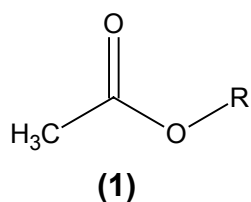


**Figura 6.** Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.<sup>20, 21, 22</sup>

Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla variedade de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos e formação de perácidos.<sup>2, 3, 23, 24</sup> Estes últimos podem ser utilizados na síntese de epóxidos a partir de compostos insaturados.<sup>25</sup>

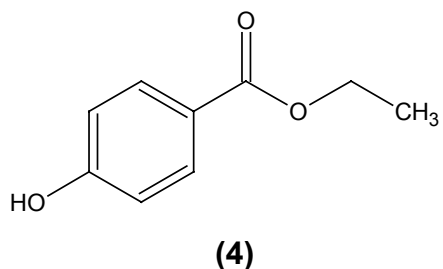
Os ésteres (RCOOR') são compostos orgânicos que se apresentam bem distribuídos na natureza. Grande parte destes são ésteres de glicerina, chamados

de glicerídeos e são os constituintes principais de óleos e gorduras. São encontrados ainda em diversas essências de frutas e nestes casos são constituídos de ácidos monocarboxílicos de baixo peso molecular e álcoois de cadeias alquílicas longas. Os ésteres de cadeia curta possuem como característica odor de frutas e flores, e com isso possui grande aplicabilidade industrial como flavorizantes e aromatizantes além de estarem presentes em bebidas fermentadas, com no caso de vinhos, onde se pode identificar muitos acetatos **(1)**, butanoatos, **(2)** hexanoatos **(3)**, dentre outros.<sup>26,27</sup>



R = Cadeia alquílica

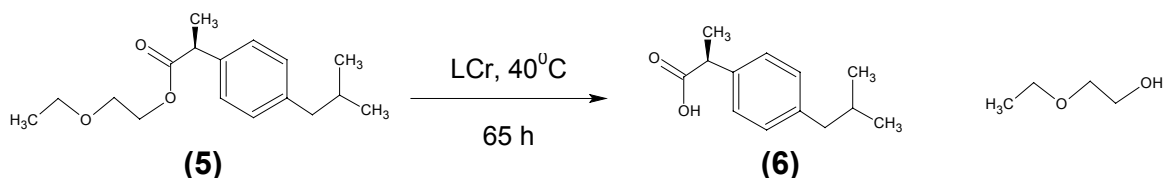
Pode-se citar ainda a grande utilização destes ésteres e diésteres na síntese de medicamentos e como biocidas, como, por exemplo, o p-hidroxibenzoato de etila **(4)**, que vem sendo usado na limpeza de esculturas eliminando microrganismos e impedindo a sua recolonização.<sup>28</sup>



As principais vantagens na utilização de lipases em síntese orgânica são o baixo custo, grande disponibilidade comercial, não requerem co-fatores, atuam em uma faixa de pH grande e apresentam alta estabilidade.<sup>2,12, 20</sup>

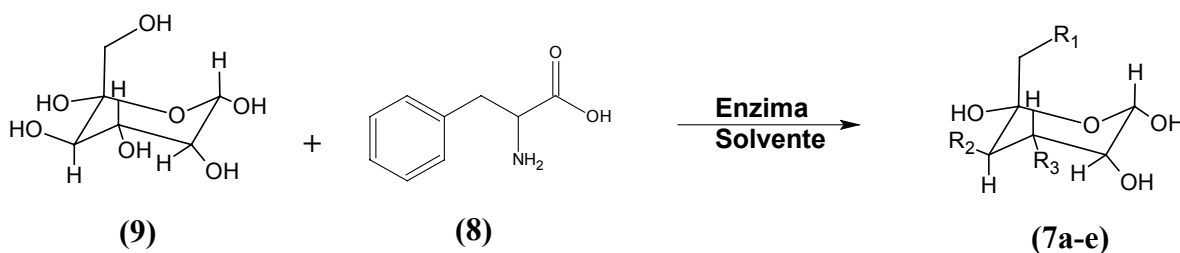


Como já citado, as lipases apresentam inúmeras aplicações. Outros trabalhos incluem o Long e col.<sup>29</sup> que utilizaram a lipase de *Candida rugosa* (LCr) na hidrólise do 2-etóxi-etil-ibuprofeno (**5**) para produção do S-ibuprofeno (**6**). (Figura 7)



**Figura 7.** Resolução cinética do racemato do éster 2-etóxi-etil-ibuprofeno.

Lohith e col.<sup>30</sup> em seus estudos empregaram as lipases de *Rhizomucor miehei* (LRM) e pancreática de porco (LPP) na síntese regioseletiva de L-fenilalanil-D-glicose (**7a-e**) a partir de fenilalanina (**8**) e D-glicose (**9**) obtendo-se os produtos com rendimentos de até 98%. (Figura 8)



- 7a** 2-O-ester:  $R_2 = L-C_6H_5CH_2CH(NH_2)COO$ ,  $R_1 = R_3 = OH$   
**7b** 3-O-ester:  $R_3 = L-C_6H_5CH_2CH(NH_2)COO$ ,  $R_1 = R_2 = OH$   
**7c** 6-O-ester:  $R_1 = L-C_6H_5CH_2CH(NH_2)COO$ ,  $R_2 = R_3 = OH$   
**7d** 2,6-di-O-ester:  $R_2 = R_1 = L-C_6H_5CH_2CH(NH_2)COO$ ,  $R_3 = OH$   
**7e** 3,6-di-O-ester:  $R_2 = R_1 = L-C_6H_5CH_2CH(NH_2)COO$ ,  $R_2 = OH$

**Figura 8.** Esterificação regioseletiva da D-glicose com L-fenilalanina.

### 1.3. Imobilização de Enzimas

Um biocatalisador ao ser selecionado para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água, e a solubilidade dos substratos e produtos devem

ser avaliadas e otimizadas. Um desconhecimento entre as possíveis relações podem levar a uma interpretação errônea.<sup>31</sup>

Quando um biocatalisador é utilizado em meio orgânico, a água é o componente mais importante para manter sua estrutura. As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para manter sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando ligadas covalentemente em um suporte.<sup>32,33</sup> É reportado na literatura que uma mínima quantidade de água, que é dependente do solvente e do suporte utilizado, é absolutamente necessário 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. Deve-se ainda levar em consideração que um excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a de síntese.<sup>34,35</sup> A água contribui para a polaridade do sítio ativo e a estabilidade da proteína, e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima.<sup>31</sup>

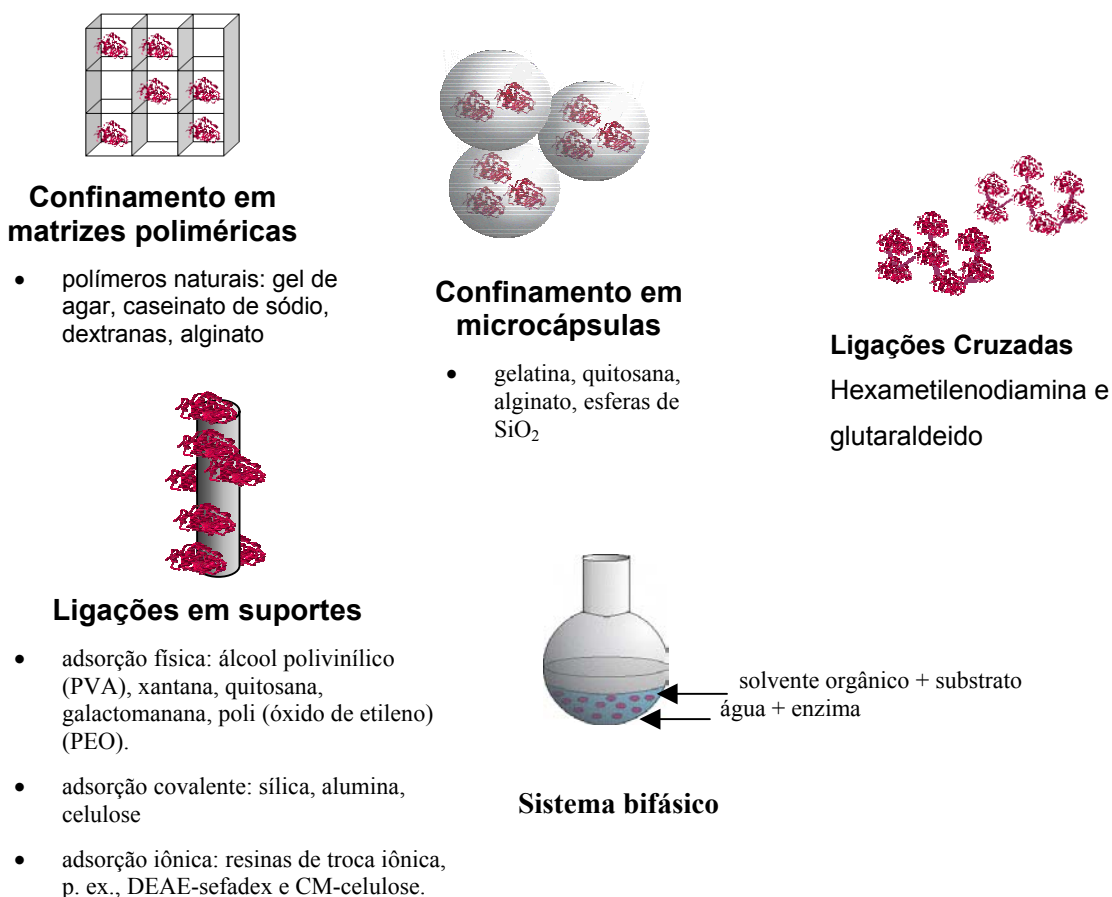
Nos últimos anos tem aumentado o uso de biocatalisadores em meio orgânico.<sup>2,36</sup> Porém as enzimas estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante uso, e ainda pode se tornar um processo de alto custo e sem reaproveitamento.<sup>2, 12</sup>

Para que a enzima catalise eficientemente um processo orgânico, há a necessidade de protegê-la do contato com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação impossibilitando a catálise da reação. Frente a estes problemas, várias técnicas têm sido desenvolvidas para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar a sua recuperação e reutilização.<sup>2,12,31</sup>

A imobilização de enzimas em diferentes suportes é uma das técnicas mais importantes e vem sendo utilizada na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos.<sup>37,38</sup> A técnica consiste no confinamento das mesmas em um determinado material. No caso de lipases e de outras enzimas, numerosos métodos de imobilização são viáveis, cada um envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência. Os vários métodos usados podem ser subdivididos em duas categorias principais.<sup>31, 39, 40</sup>

- **Método químico:** a enzima é fixada no suporte sólido insolúvel em água (ligação em suporte) por ligação covalente com formação de ligações cruzadas intermoleculares.
- **Método físico:** consiste na inserção de enzimas em espaços confinados, ao qual ela não pode sair, mas permanece cataliticamente ativa (confinamento em matriz sólida).

Outro método de imobilização, apesar de não apresentar ligações e não confinar fisicamente as enzimas é o sistema bifásico. Neste, como o próprio nome diz, é um sistema formado de duas fases, onde na fase aquosa se encontra a enzima e na orgânica se encontra o substrato a ser complexado. A interação das duas ocorre através de agitação mecânica.<sup>2, 25</sup> A **Figura 9**, ilustra os métodos mais utilizados para imobilização de enzimas.



**Figura 9.** Métodos mais comuns de imobilização de enzimas. (adaptado ref. 2)

A escolha do suporte é dependente de diversas características que são importantes para aplicações em processos industriais. Entre esses fatores estão a resistência microbiológica, estabilidade térmica, durabilidade química e funcional, caráter hidrofóbico e hidrofílico, facilidade de regeneração, capacidade de carga a baixo custo.<sup>12</sup>

### 1.3.1. Confinamento em matrizes sólidas

Neste método, a enzima (ou célula íntegra) é “presa” em um polímero insolúvel ou em microcapsula. Nestes sistemas cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa mantendo a atividade catalítica do biocatalisador. A grande vantagem deste processo é que a enzima não interage quimicamente com o polímero. Porém, a transferência de massa se dá através da membrana, podendo ser um problema.<sup>12</sup>

Alguns trabalhos com relação a este tipo de imobilização vêm sendo publicados:

Killing e col.<sup>41</sup> Imobilizaram a lipase pancreática de porco (LPP) em álcool poli-vinílico (PVA) e utilizaram este sistema na reação de hidrólise da tributirina. Foram avaliados parâmetros como atividade da enzima em diferentes pHs e temperaturas e estabilidade térmica, operacional e estocagem do processo. Foi verificado que a atividade da lipase foi mantida em 63% e a temperatura ótima alterou de 30 para 37°C após a imobilização.

Amorim e col.<sup>42</sup> imobilizaram a lipase de *Candida cylindracea* em filmes de quitosana de diferentes fontes. A lipase imobilizada reteve em 47% da sua atividade catalítica inicial após quatro ciclos reacionais na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNNP) a 37°C.

O encapsulamento de enzimas tem se mostrado um processo bastante eficiente. Darder e col. imobilizaram diversas oxidases em nanoporos de alumina ( $Al_2O_3$ ), demonstrando a manutenção de atividade enzimática frente a variações de pH e solventes orgânicos.<sup>43</sup>

Um outro fator a ser considerado na imobilização de enzimas é a sua reutilização, pois visa a diminuição de custos no processo além da facilidade de manuseio do biocatalisador.

Trabalhos recentes na literatura relatam a reutilização de várias enzimas imobilizadas.

Du e col. utilizaram lipases de *Candida antarctica* B (CALB) imobilizada em resina aniônica para a produção de biodiesel. Foi verificado que esta lipase pode ser reutilizada até 100 vezes a 40°C e 150rpm sem diminuição significativa da conversão em ésteres, sendo este um processo eficaz e de baixo custo.<sup>44</sup>

A recuperação de enzimas imobilizadas depende do tempo de meia vida, sendo que após certo tempo é necessário efetuar a purificação antes de ser reutilizada.<sup>12,45</sup>

Na literatura recente, tem sido descrito que alguns polissacarídeos vêm sendo bastante utilizados para a imobilização de enzimas. Entre eles destaca-se o alginato<sup>46</sup>, e a carboximetilcelulose (CMC)<sup>38</sup>, devido ao baixo custo e toxicidade.

Neste trabalho buscou-se utilizar um outro polissacarídeo a dextrana – (DEX) como suporte polimérico para as lipases, visando a sua aplicação na síntese enzimática de ésteres de cadeia longa.

#### **1.4. Polissacarídeos.**

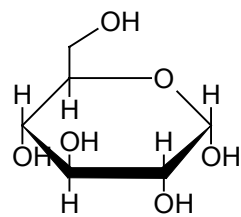
Os polissacarídeos são polímeros de elevada massa molar que, em alguns casos, podem ser acima de um milhão. São macromoléculas que ocorrem em quase todos os organismos vivos exercendo várias funções. Os polissacarídeos são formados pela condensação de vários monossacarídeos e de seus derivados, através de ligações glicosídicas. Podem ser hidrolisados em polissacarídeos menores, tais como em dissacarídeos ou monossacarídeos mediante a ação de determinadas enzimas.<sup>47,48</sup>

Os polissacarídeos de menor massa molar são na sua grande maioria solúveis em água. Porém, a solubilidade diminui sensivelmente com o número de unidades glicosídicas associadas umas as outras, além do aumento da massa

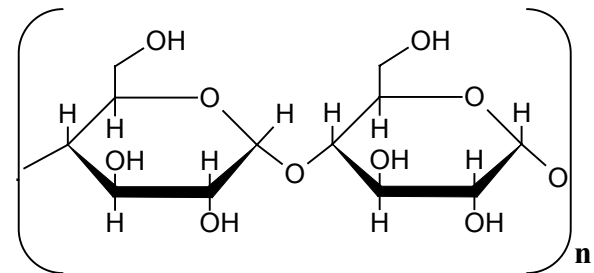
molar. A interação polissacarídeo-água ocorre principalmente através de ligações intermoleculares de hidrogênio.<sup>48</sup>

Nos organismos, os polissacarídeos são classificados em dois grupos dependendo da função biológica que exercem, reserva energética ou estrutural.

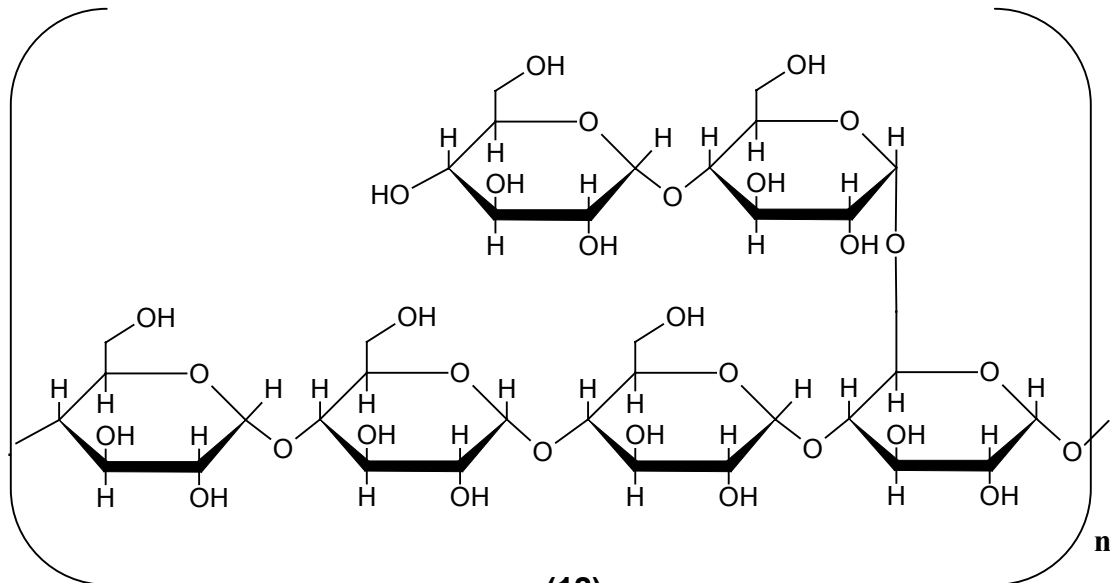
- **Polissacarídeos de reserva:** a molécula provedora de energia para os seres vivos é principalmente a glicose **(10)**. Quando esta não participa do metabolismo energético, é armazenada na forma de um polissacarídeo que, nas plantas é conhecida como amido **(11)** e nos animais como glicogênio **(12)**.<sup>48</sup>



**(10)**

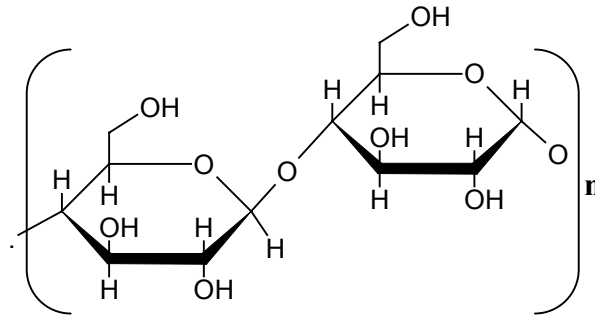


**(11)**



**(12)**

- **Polissacarídeos estruturais:** estes carboidratos atuam na formação de estruturas orgânicas, estando entre os mais importantes a celulose **(13)**, que participa na estrutura de sustentação dos vegetais.<sup>48</sup>

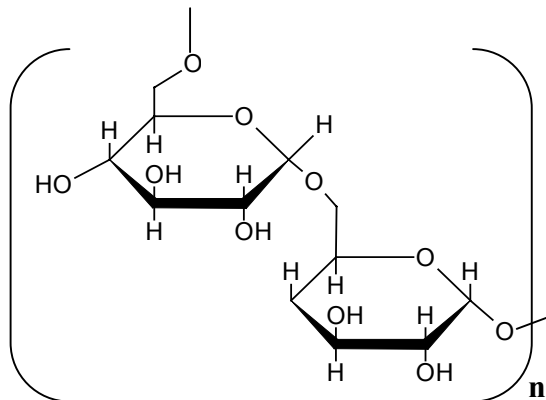


(13)

### 1.4.1. Dextranas

As dextranas constituem um grupo de polissacarídeos de origem bacteriana de alta massa molar variando 40 a 50 milhões, podendo alcançar a 100 milhões. São produzidas por algumas espécies de *Leuconostoc* principalmente *Leuconostoc mesenteroides*, quando a sacarose estiver no meio de crescimento destas bactérias.<sup>48</sup>

A dextrana (14) é formada por unidades de D-glicose ligadas nas posições  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 com resíduos de cadeias ligadas na posição  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3 e diferem quanto ao número de ramificações em 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3 e 1 $\rightarrow$ 4 e na massa molar, além de serem quimicamente inertes.<sup>48,49</sup>



(14)

**Figura 10.** Unidade monomérica da dextrana.

Este polissacarídeo, solúvel em água, tem tido um grande número de aplicações no campo biomédico e farmacêutico. Estudos recentes mostram que

estes podem ser usados, por exemplo, como modificadores de viscosidade, matrizes para a imobilização de enzimas e fármacos, e como materiais que atuam como suportes para a cromatografia.<sup>50, 51</sup>

Nos últimos anos foram feitos esforços consideráveis para desenvolver hidrogéis de dextrana. A disponibilidade da dextrana com diferentes massas molares e sua alta solubilidade em solventes orgânicos polares permite a modificação. Além disto, a biocompatibilidade faz este polissacarídeo natural apresentar grande interesse sintético.

Ferreira e col.<sup>49</sup> utilizaram lipases e proteases de diversas fontes na acilação de dextranas na presença de acrilato de vinila, para efetuar mudanças estruturais no polímero com conseqüente aplicação na formação de hidrogéis para indústria alimentícia e farmacêutica.

Barbani e col.<sup>52</sup> prepararam blendas poliméricas afim de avaliar a miscibilidade de polímeros sintéticos (PVA) com os naturais (dextranas). Os resultados deste trabalho mostram que a partir da inserção de grupos carboxílicos ao longo da cadeia de PVA, a estabilidade térmica e miscibilidade dos polímeros ou blendas aumentou consideravelmente.

Casa e col.<sup>53</sup> modificaram estruturalmente a lipase de *Candida rugosa* utilizando dextranas de diferentes massas molares, obtendo um complexo dextrana/lipase através de ligações covalentes do polissacarídeo com os grupos NH<sub>2</sub> da proteína. As modificações com dextranas no geral aumentaram a estabilidade térmica e catalítica do biocatalisador comparado com a lipase comercial. Estes “novos biocatalisadores” foram utilizados na esterificação enantioseletiva do (R,S)-ibuprofeno com *n*-propanol obtendo-se conversões em éster de até 50%.

O interesse crescente pela busca de novas áreas de aplicações da dextrana e seus derivados pode ser creditada pelas características que este polímero apresenta, tais como hidrofobicidade, estabilidade e capacidade de formar soluções claras e estáveis, além de serem derivados de fontes renováveis e degradadas por sistemas ecológicos.<sup>54</sup>



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Utilizar a dextrana como suporte polimérico para a imobilização de lipases e posterior utilização deste sistema como catalisador em reações de esterificação em meio orgânico.

### 2.2 Objetivos específicos

- √ Otimizar as condições experimentais na preparação dos filmes de dextrana;
- √ Avaliar a estabilidade macroscópica dos filmes em solventes orgânicos;
- √ Determinar o teor de água nos filmes pelo método de titulação Karl-Fischer;
- √ Comprovar a presença da lipase no suporte (enzima/polímero) por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- √ Preparar o laurato de *n*-propila utilizando lipases de diferentes fontes na forma livre ou imobilizada em filmes de dextrana;
- √ Determinar a conversão em ésteres alquílicos (laurato de *n*-propila) em função do tempo;
- √ Estudar a influência da massa de lipase imobilizada nos filmes de dextrana na reação de esterificação de ácido láurico com *n*-propanol;
- √ Avaliar a influência do solvente orgânico na reação de esterificação de ácido láurico com *n*-propanol;
- √ Verificar a reutilização do suporte (lipase/dextrana) após a estocagem em solvente orgânico;
- √ Quantificar a conversão em ésteres por ressonância magnética de próton (RMN <sup>1</sup>H) e caracterizar o produto por técnicas espectroscópicas de IV e RMN <sup>1</sup>H.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Reagentes, solventes e lipases utilizadas.

Reagentes utilizados neste trabalho:

- √ Aldrich: clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>);
- √ F. Maia: tolueno, *n*-hexano;
- √ Vetec: ácido láurico, *n*-heptano;
- √ Grupo Química: acetato de etila;
- √ Reagen: heptano; glicerol;
- √ Nuclear: clorofórmio, diclorometano, *n*-propanol;
- √ Carlo Erba: cicloexano;
- √ Dinâmica: éter etílico;
- √ Sigma: dextrana (massa molar: 10 000 – 200 000 Daltons)

Lipases utilizadas neste trabalho:

**Tabela 2.** Lipases utilizadas.

Lipases	Sigla	Atividade (u/g)*	Fornecedor/Lote
Pancreática do porco	LPP	135000	Sigma
<i>Pseudomonas sp.</i>	LPS	30000	Amano/LPSACO251903
<i>Mucor javanicus</i>	LMJ	10000	Amano10/LMVO1528
<i>Aspergillus níger</i>	LAN	120000	Amano12/LVO5508
<i>Candida rugosa</i>	LAY	30000	Amano/VO6517
<i>Rhizopus oryzae</i>	LRO	15000	Amano/LFY1050362

\* Quantidade de enzima que libera um  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto.

### **3.2. Equipamentos, caracterização do suporte polimérico e caracterização/quantificação dos produtos.**

Os suportes poliméricos foram preparados com o auxílio de agitadores magnéticos (Microquímica – MQAMA-301), e uma chapa de aquecimento (ESPECTRON). A morfologia dos suportes foi obtida com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Philips XL30, situado no Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. Foram realizadas análises nos filmes com ou sem enzimas na superfície do polímero. As amostras foram metalizadas, com uma fina camada de ouro em um metalizador modelo P-2 Diod Sputtering System.

A quantidade de água presente nos filmes, após a evaporação à temperatura ambiente, foi determinada por titulação pelo método de Karl Fischer (titulador 633 Automatic Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau).

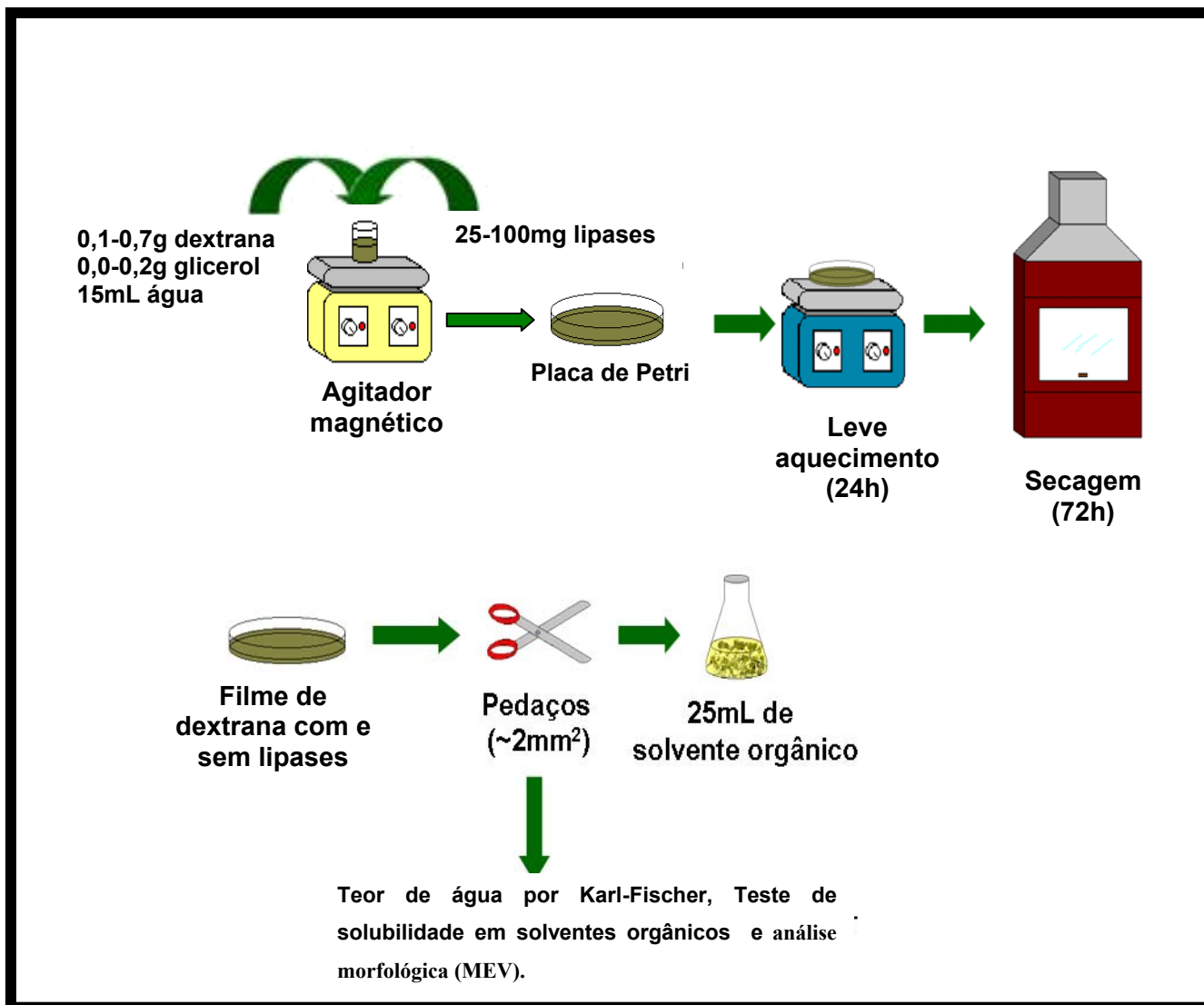
As reações foram realizadas sob agitação suave (agitador tipo Dubnoff, com banho termostaticado, MARCONI). Os filmes de dextrana, com ou sem lipase, e os produtos das reações foram caracterizados por de infravermelho (IV) em um espectrofotômetro FTIR da PERKIN ELMER modelo 16C.

A percentagem de conversão em éster foi determinada quantitativamente, através de análises dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H em um espectrômetro VARIAN AC400F (400MHz), utilizando CDCl<sub>3</sub> como solvente e TMS como padrão interno.

### 3.3 Métodos Experimentais

#### 3.3.1 Preparação dos filmes de dextrana com e sem enzimas

Para a preparação dos filmes, em um béquer foram solubilizados de 0,1-0,7g do polímero em 15mL de água, adicionando ao meio 1,0-3,0mL de solução de policaprolactona (PCL), 0,7-1,4g de gelatina ou 0,10-0,20g de glicerol, com agitação constante por 1 hora. Após este período, para todos os experimentos, exceto para a caracterização dos filmes e para o estudo da variação de massa do biocatalisador, 25-100mg de lipases de diferentes procedências foram adicionadas à solução e o sistema foi novamente deixado sob agitação constante por um período de 2 h, ou até completa homogeneização. A mistura resultante foi depositada em uma placa de poli(etileno) e colocada sob chapa de aquecimento (~30°C) por 24h. A seguir foi deixada à temperatura ambiente por 72 h, para a evaporação do solvente (H<sub>2</sub>O). Os filmes de DEX (com ou sem lipases) foram retirados, cortados em pequenas seções regulares e submetidos a testes de solubilidade em solventes orgânicos, determinação do teor de água (Karl Fischer), e análises de MEV. Os filmes foram armazenados em 25mL de solvente orgânico para posterior uso nas reações de esterificação. **(Figura 11)**



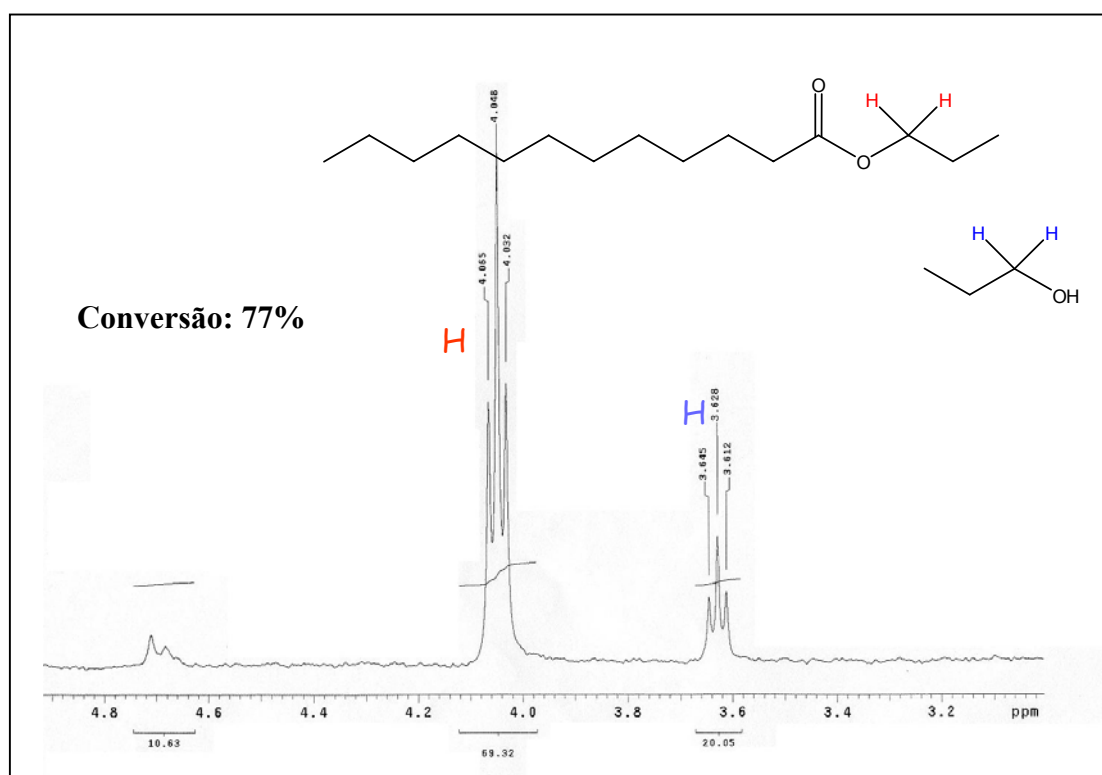
**Figura 11.** Preparação dos filmes de dextrana com ou sem lipases.

### 3.3.2 Preparação do meio reacional: síntese do laurato de *n*-propila

Os filmes, obtidos conforme descrito no item 3.3.1, foram cortados em seções de volumes regulares de aproximadamente 2mm<sup>2</sup>. Em seguida foram colocados em um erlenmeyer contendo 25mL do solvente orgânico. Ao meio reacional foram adicionados na proporção de 1:1 (5mmol) dos reagentes, ácido láurico e *n*-propanol, para a obtenção do laurato de *n*-propila.

O sistema foi deixado sob agitação suave em um agitador tipo Dubnoff, com banho termostatizado, a temperatura de 35°C, por um período de até 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada, utilizando-se como eluente a mistura de n-hexano:acetato de etila (9:1 v/v).

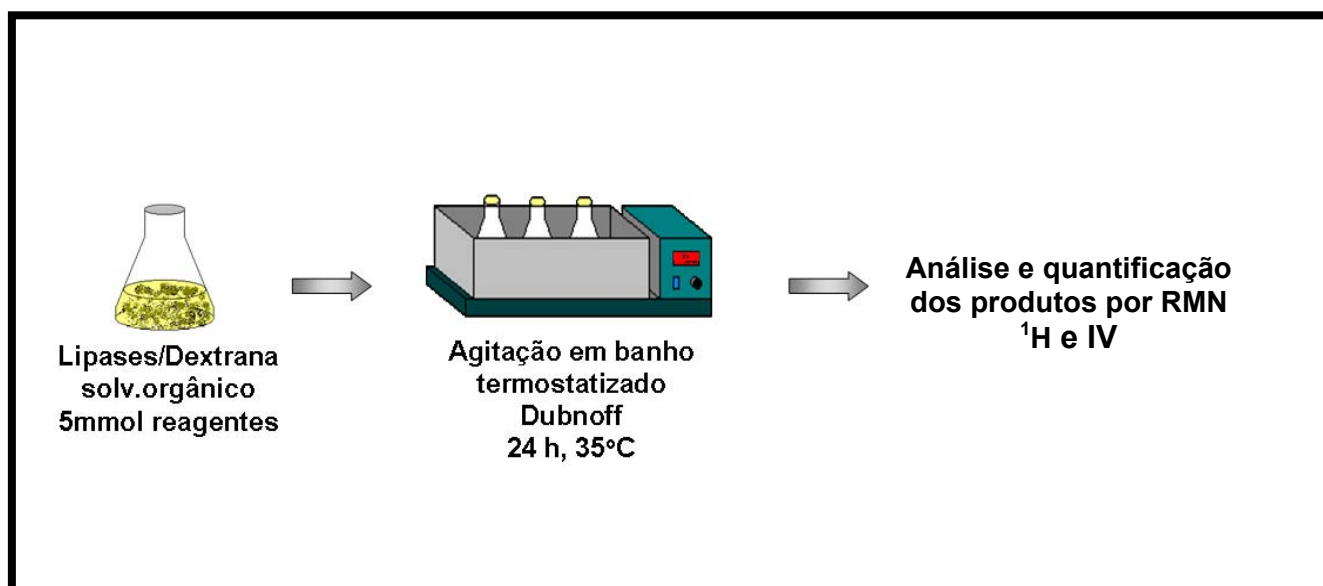
Periodicamente, foram retiradas alíquotas do meio reacional para determinar a percentagem de conversão em éster por RMN<sup>1</sup>H, usando CDCl<sub>3</sub> como solvente. O cálculo foi obtido pela comparação das integrais das áreas dos sinais dos hidrogênios metilênicos do álcool e do éster em 3,4 e 4,1 ppm, respectivamente. Como exemplificado na **Figura 12**, a soma das áreas 69,32+ 20,50= 89,37, corresponde a 100%. Portanto, o valor de 69,32 referente aos hidrogênios metilênicos do éster, corresponde a uma conversão de 77%.



**Figura 12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, de uma alíquota da reação de esterificação enzimática do ácido láurico com n-propanol. [DEX/G/LPS 50mg, 24h, 35°C, n-hexano, 77% de conversão (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)].

Ao término da reação os produtos e os substratos remanescentes foram separados do filme por decantação. Os mesmos foram lavados várias vezes com solventes orgânicos para assegurar que todos os reagentes e os produtos fossem retirados. A seguir, foram armazenadas para posterior reutilizações. Para a caracterização do éster, alíquotas da reação após conversão total ao produto, foram concentradas no rota evaporador, obtendo-se o produto purificado para ser analisado por ccd comparado a padrões e por análise de infra-vermelho.

Os filmes dos sistemas DEX/G/LPS, DEX/G/LRO e DEX/G/LMJ após a lavagem da primeira utilização foram armazenados em *n*-hexano, por 30 dias e a seguir, reutilizado sob mesmas condições experimentais. Após este processo os filmes foram novamente estocados em *n*-hexano por mais 30 dias para uma segunda reutilização. **(Figura 13)**



**Figura 13.** Preparação do meio reacional e isolamento dos produtos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

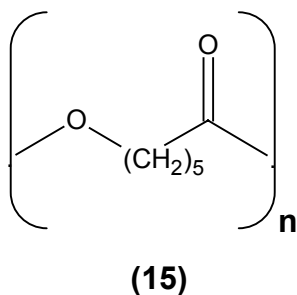
Neste trabalho foram preparados filmes de dextrana a fim de suportar lipases de diferentes fontes e utilizá-los como biocatalisadores na preparação de ésteres (laurato de *n*-propila). Os filmes foram caracterizados por diferentes técnicas que serão descritas a seguir.

### 4.1. Preparação dos filmes de dextrana

Inicialmente, foram feitos vários testes para a obtenção de um filme de dextrana, como material polimérico, que demonstrasse estabilidade frente a diversos solventes orgânicos e com capacidade de adsorção de lipases.

Os filmes de dextrana foram preparados dissolvendo-se o polímero em água, variando a quantidade do polissacarídeo (0,1-1,0g). Após evaporação do solvente, verificou-se que ao utilizar 0,7g de dextrana dissolvidos em 15mL de água formava um filme consistente, porém este não apresentava maleabilidade além de ter um aspecto totalmente quebradiço. Com quantidades menores não formou o filme.

A fim de aumentar a maleabilidade do filme, foram adicionadas diferentes quantidades de solução de poli-caprolactona (PCL) **(15)**, (2g de PCL dissolvidas em etanol: água 6:4 v/v).



Os filmes obtidos, após a adição de PCL, não apresentaram mudanças significativas nas características macroscópicas. **(Tabela 3)**



**Tabela 3.** Influência da adição de PCL nos filmes de dextrana<sup>a</sup>

Solução de PCL (mL)	Aspecto do filme
1,0	Quebradiço
2,0	Quebradiço
3,0	Quabradiço

<sup>a</sup>0,7g de dextrana em 20mL de água.

Na tentativa de aumentar a maleabilidade dos filmes, foram adicionadas à solução do polímero quantidades variadas de gelatina ou misturas de gelatina e glicerol. Os resultados obtidos quanto a aspecto macroscópico dos filmes, estão descritos na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Influência da quantidade de gelatina e glicerol nos filmes de dextrana<sup>a</sup>

Gelatina (g)	Glicerol (g)	Aspecto do filme
0,7	0,0	Quebradiço
1,4	0,0	Quebradiço
0,7	0,10	Pouco maleável
0,7	0,15	Maleável e gelatinoso

<sup>a</sup>0,7g de dextrana em 20mL de água.

A partir dos resultados da **Tabela 4**, ficou evidenciado que com a adição de gelatina não ocorreu alteração no aspecto macroscópico do filme. Entretanto, com a adição de glicerol como plastificante junto com a gelatina, os filmes apresentaram maior maleabilidade, após a evaporação do solvente. Ao utilizar 0,7g de dextrana, 15mL de água, 0,7g de gelatina e 0,15g de glicerol, o filme apresentou boa maleabilidade, mas de consistência muito gelatinosa.

Este estudo mostrou que a adição de um plastificante era importante para a formação do filme homogêneo e maleável. A seguir, foram preparados diversos filmes com 0,7 de dextrana e quantidades variáveis de glicerol. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Influência da adição de glicerol nos filmes de dextrana com glicerol<sup>a</sup>

<b>Glicerol (g)</b>	<b>Característica do filme</b>
0,0	Quebradiço
0,10	Quebradiço
0,15	Pouco Maleável
<b>0,20</b>	<b>Maleável</b>
0,25	Maleável

<sup>a</sup>0,7g de dextrana em 20mL de água.

Os melhores filmes, em termos de maleabilidade e estabilidade, foram os obtidos com 0,7g de dextrana e 0,20-0,25g de glicerol. A partir destes estudos, a composição dos filmes a ser utilizada para imobilização das lípases foi estabelecida como sendo 0,7g de dextrana e 0,20g de glicerol solubilizados em 15mL de água.

## **4.2. Caracterização do suporte**

Após a preparação dos filmes e a otimização do processo de obtenção, os mesmos foram submetidos a testes de solubilidade e de análise morfológica (MEV).

### **4.2.1. Estabilidade frente a solventes orgânicos**

Dando continuidade ao trabalho, foram realizados testes de estabilidade em diferentes solventes orgânicos a temperatura ambiente. Os filmes, depois de preparados (conforme descrito na Seção 2.3) foram cortados e transferidos para um recipiente hermeticamente fechado e deixados em contato com solventes de polaridades variadas, indicadas indiretamente pelo log de P, por 24h. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Estabilidade dos filmes em solventes orgânicos.

<b>Solvente</b>	<b>log P<sup>a</sup></b>	<b>Solubilidade</b>
acetonitrila	-0,33	Insolúvel
álcool etílico	-0,24	Insolúvel
acetato de etila	0,68	Insolúvel
clorofórmio	2,0	Insolúvel
n-hexano	3,5	Insolúvel
Éter de petróleo	3,8	Insolúvel

<sup>a</sup>Log P = coeficiente de partição octanol/água<sup>55</sup>

Após o período de 24h, os filmes foram analisados visualmente e verificados quanto a possíveis alterações macroscópicas causadas pela exposição direta ao solvente. Esta análise mostrou que os filmes não apresentaram qualquer alteração macroscópica. Após estes testes, prosseguiu-se com as análises da determinação do teor de água e morfológica. A seguir, lipases de diferentes fontes foram imobilizadas para a utilização em reações de esterificação.

#### **4.2.2. Determinação da quantidade de água nos filmes**

É bem reportado na literatura que os biocatalisadores são circundados por camadas de água, e que estas são consideradas pré-requisitos importantes para a retenção da atividade enzimática frente a solventes orgânicos principalmente devido à manutenção da estrutura terciária das enzimas. Assim, este parâmetro é importante não somente para a atividade enzimática, mas também para a sua estabilidade.<sup>33,34</sup>

A determinação do teor de água nos filmes, na presença e ausência de lipase (sistemas DEX/G e DEX/G/LPS), foi realizada por titulação pelo método de Karl Fischer. As análises foram feitas em triplicata e os resultados obtidos apresentados como média dos valores.

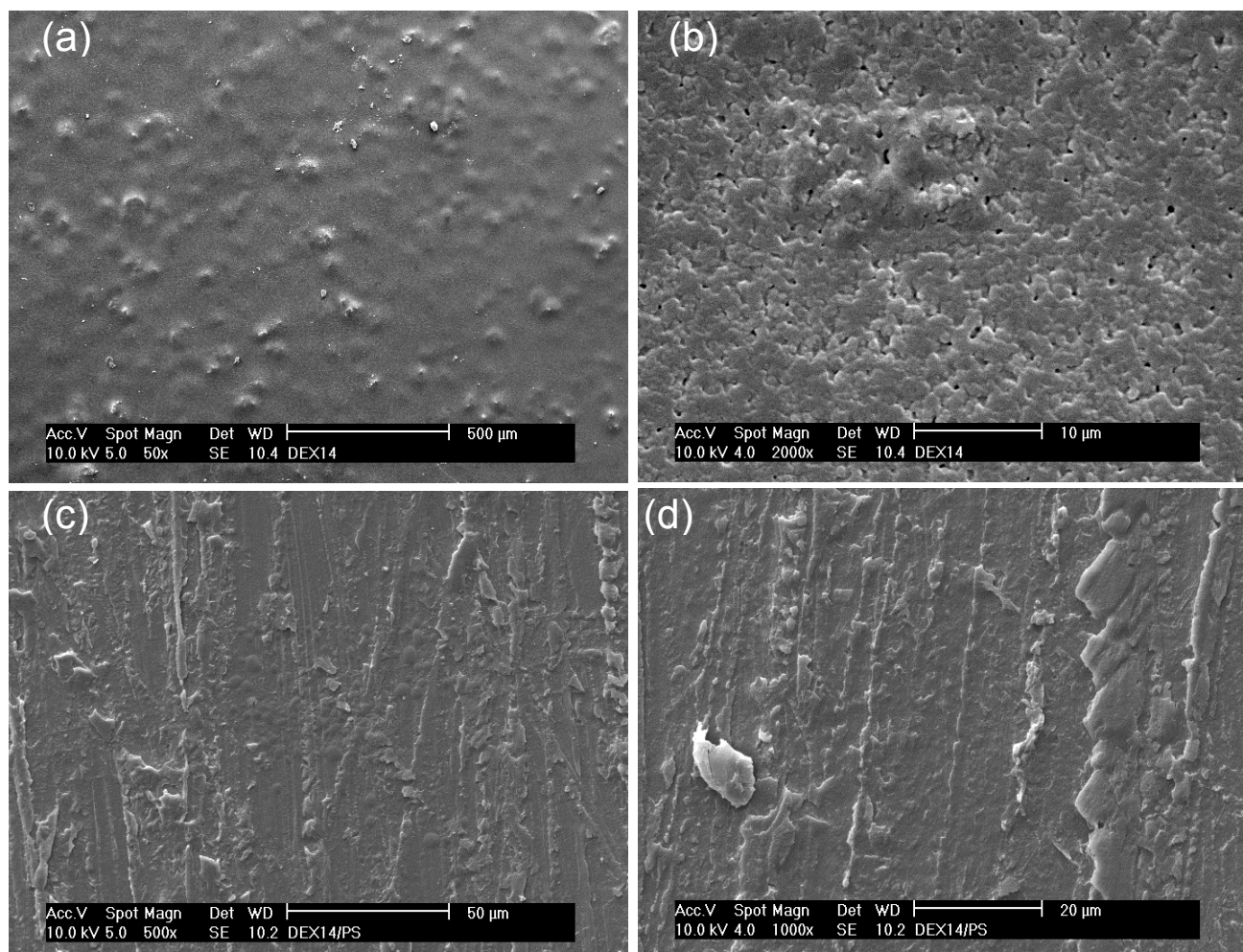
Os filmes sem e com a LPS imobilizada, apresentaram 12-15% de água. A presença de água nos filmes é bem relevante, pois garante que a conformação

nativa da enzima seja preservada, assegurando a atividade e integridade do biocatalisador em solventes orgânicos.

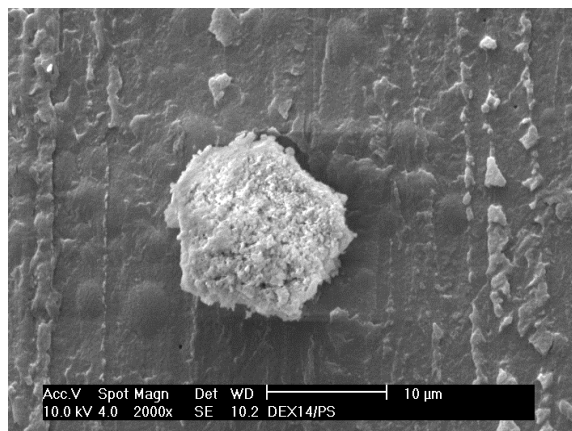
#### 4.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para verificar a homogeneidade e a morfologia dos suportes na ausência e presença de lipases.

As **Figuras 14 e 15**, mostram as micrografias da superfície dos polímeros puros e com a LPS immobilizada.



**Figura 14.** Fotomicrografia do filme de dextrana DEX/G (a) 50 x , (b) 2000X e filme de DEX/G/LPS (c) 500 X e (d) 1000X.

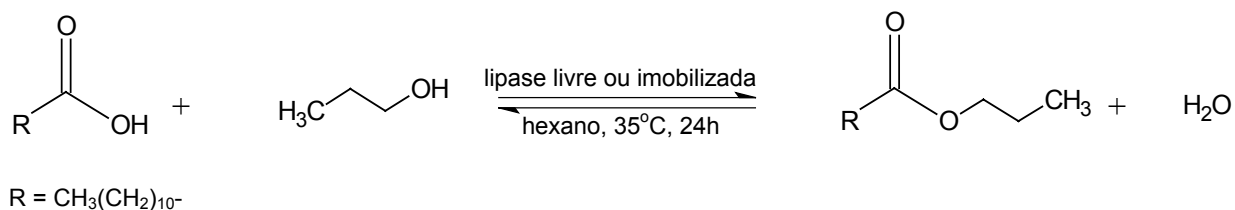


**Figura 15.** Fotomicrografia do filme de dextrana/glicerol com LPS, 2000X.

Analisando as **Figuras 14 e 15**, observou-se que o filme é homogêneo e que a LPS fica localizada preferencialmente na superfície. Portanto, através destas análises sugere-se que o processo de imobilização ocorreu por adsorção. Resultados similares foram obtidos recentemente na imobilização de lipases de *R. oryzae* e *M. javanicus* em filmes de carboximetilcelulose (CMC), poli(álcool vinílico) (PVA), poli(4-estirenosulfonato de sódio) (PSS) e xantana (XAN).<sup>55</sup>

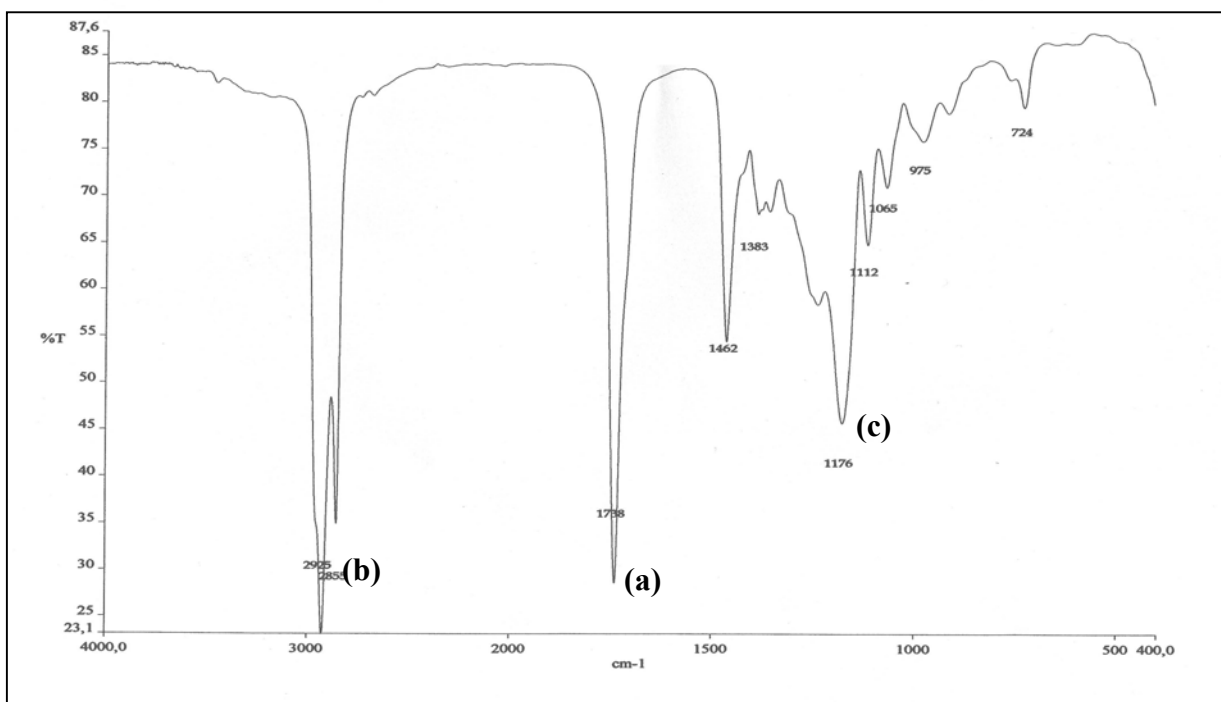
### 4.3. Síntese do laurato de *n*-propila catalisada por lipases

O laurato de *n*-propila, foi obtido via catálise enzimática, utilizando diversas lipases na forma livre ou imobilizada em filmes de dextrana/glicerol. As reações foram inicialmente realizadas com quantidades equimolares de substratos (5mmol) e 50mg de lipases livres ou imobilizadas a 35°C por 24 h em *n*-hexano. (**Figura 16**)



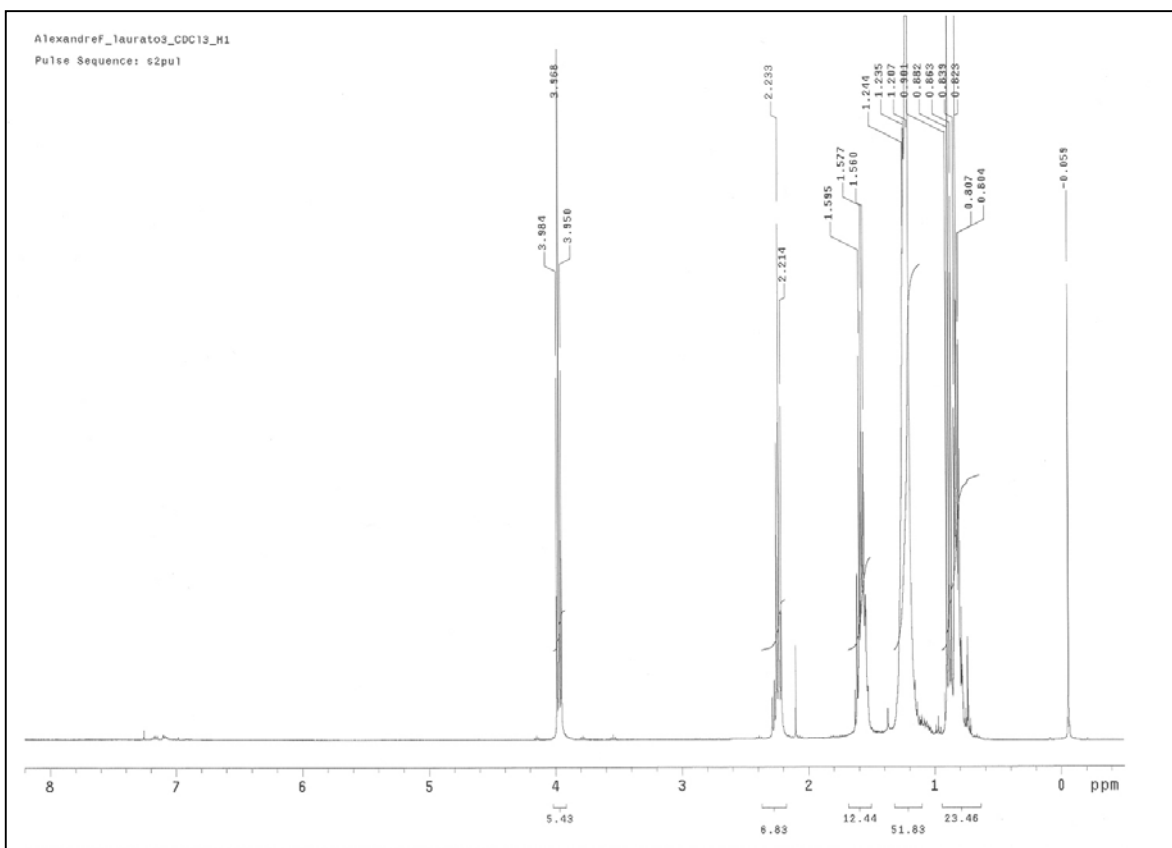
**Figura 16.** Reação de esterificação do ácido láurico com *n*-propanol mediada por lipases livres ou imobilizadas.

A percentagem de conversão em éster foi determinada, através de análises dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H, por comparação das integrais dos sinais dos hidrogênios metilênicos do álcool e do éster em 3,4 e 4,1 ppm, respectivamente, conforme descrito na Seção 3.3.2. O éster obtido foi também isolado e caracterizado por IV e RMN-H<sup>1</sup>. (**Figuras 17 e 18 respectivamente**).



**Figura 17.** Espectro de infravermelho do laurato de *n*-propila (filme).

Pela análise do espectro de infravermelho, observaram-se bandas características de estiramento da carbonila (C=O) do éster em  $1738\text{cm}^{-1}$  (**a**); estiramentos da ligação C-H dos carbonos alifáticos na região de  $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  (**b**); e estiramento do grupo  $-\text{CH}_2\text{-CO-OR}$  em  $1176\text{ cm}^{-1}$  (**c**). Estes dados confirmam a formação do produto desejado.



**Figura 18.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do laurato de *n*-propila (400MHz, CDCl<sub>3</sub>).

No espectro de RMN-<sup>1</sup> apresentado na **Figura 18**, observa-se que o produto desejado foi formado. Em 3,95 ppm tem-se o triplete característico dos hidrogênios metilênicos do grupo -C-O-CH<sub>2</sub>-, do éster.

A análise de ccd utilizando-se como eluente a mistura de *n*-hexano:acetato de etila (9:1 v/v), apresentou duas manchas com R<sub>f</sub>s de 0,6 e 0,3 correspondendo respectivamente ao laurato de *n*-propila e ácido láurico comparado com padrões.

A conversão em laurato de *n*-propila, utilizando *n*-hexano como solvente no meio reacional, foi dependente da fonte de lipase e se é utilizada na forma livre ou imobilizada. Os resultados estão descritos na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Conversão em laurato de *n*-propila utilizando lipases livres e imobilizadas.

lipase	fonte	Conversão (%) <sup>a</sup>	
		livre	imobilizada
LPS	<i>Pseudomonas sp.</i>	70	96
LAY	<i>Candida rugosa</i>	10	37
LAN	<i>Aspergillus niger</i>	<5	7
LMJ	<i>Mucor javanicus</i>	50	62
LRO	<i>Rhizopus oryzae</i>	<5	91
LPP	Pancreática de porco	7	37

(a) obtida por RMN<sup>1</sup>H, [lipase]: 50mg, 24h, 35°C, *n*-hexano,

De modo geral, a análise dos resultados apresentados na **Tabela 7** mostra que a conversão em laurato de *n*-propila variou com a fonte da lipase utilizada. A conversão em éster foi maior após a imobilização dos biocatalisadores em filme de DEX/G com todas as lipases testadas. Estes resultados mostraram o efeito benéfico da imobilização das lipases neste suporte, protegendo-as do solvente orgânico, além de permitir a reutilização

Com a LPS imobilizada, a conversão foi de 96%. Com as lipases LRO, LAN e LPP imobilizadas em DEX/G as conversões em lauratos de *n*-propila também foram superiores a forma livre. Por exemplo, utilizando a LRO a conversão em éster aumentou de >5% para 91%, após a imobilização. Utilizando as lipases de *Candida rugosa* e Pancreática do porco, as conversões em produto não ultrapassaram 40% em 24h de reação.

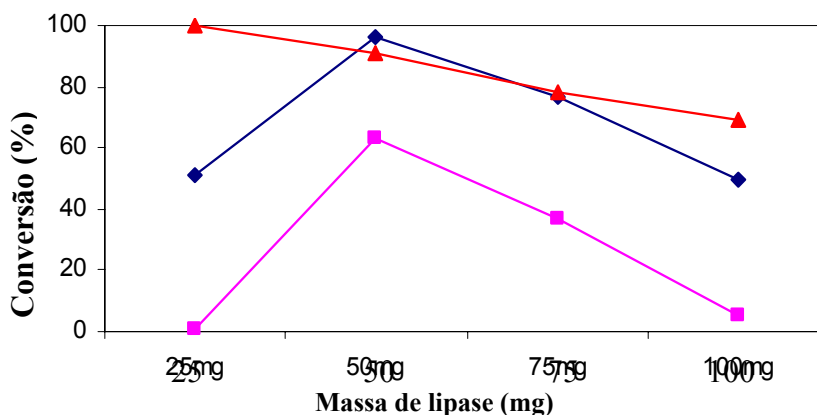
Resultados similares foram obtidos na obtenção do laurato de *n*-pentila com lipases de várias procedências imobilizadas em filme de caseinato de sódio, e em filmes de PVA, CMC e blendas de PVA/CMC.<sup>56</sup>

#### 4.4. Influência da massa de lipase

Foi realizado um estudo sobre a influência da massa de lipase a ser utilizada nos filmes de dextrana/glicerol na conversão em lauratos de *n*-propila. Foram utilizadas 25, 50, 75 e 100 mg das lipases de LPS, LMJ, e LRO.



Os resultados de conversão em éster obtidos em função da massa de lipase, estão demonstrados na **Figura 19**.



**Figura 19.** Efeito da massa de lipases imobilizadas em filme de DEX/G na esterificação do ácido láurico com *n*-propanol. [ácido] e [álcool] = 5mmol, 24h, 35°C, *n*-hexano. ( ■ LRO ■ LPS ■ LMJ)

Os maiores valores de conversão em éster foram obtidas utilizando 50 mg do biocatalisador imobilizado no filme. Com a LRO, a conversão em éster foi quantitativa (>99%) com apenas 25mg de lipase, apresentando uma diminuição com o aumento da massa de enzima, sendo de 75% com 100mg de lipase.

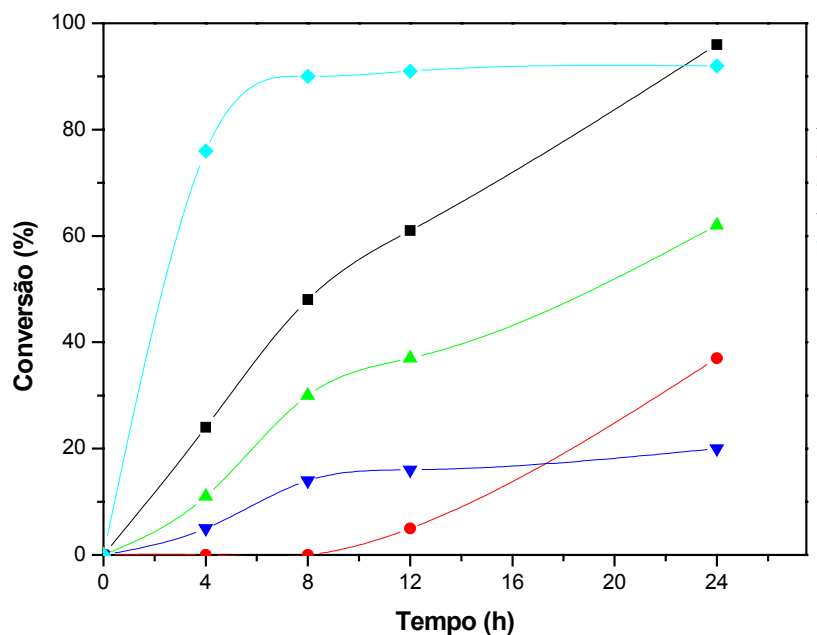
Utilizando as lipases LMJ e LPS, as conversões em ésteres diminuíram consideravelmente a partir de 50mg. Portanto, esta massa foi selecionada nos estudos posteriores.

Estes dados podem estar relacionados com a própria formação do filme que se apresenta mais quebradiço quando se aumenta a quantidade de lipase na sua composição. Outras substâncias presentes podem também interferir nos resultados uma vez que as lípases usadas não são totalmente puras. Alguns autores se referem a “preparado enzimático”.<sup>16</sup>

#### 4.5. Influência do tempo de reação

Um outro estudo realizado foi o da influência do tempo na obtenção do laurato de *n*-propila em conversão máxima. Foram utilizados os sistemas DEX/G/LPS, DEX/G/LRO, DEX/G/LAY, DEX/G/LMJ e DEX/G/LAN, e feitas análises nos tempos de 4, 8, 12 e 24 h.

Os valores de conversão obtidos em função do tempo, estão apresentados na **Figura 20**.



**Figura 20.** Percentagem de conversão em laurato de *n*-propila em função do tempo catalisada por lípases imobilizadas em filmes de DEX/G. [ácido] e [álcool] = 5mmol, 24h, 35°C, *n*-hexano. (■ LRO ■ LPS ■ LAY ■ LMJ ■ LAN)

Ao utilizar a LRO como biocatalisador, observou-se que o éster foi formado com 90% após 8 h de reação. Com os sistemas DEX/G/LPS e DEX/G/LRO observou-se que após 24 h de reação, as porcentagens de conversão foram de 96 e 91%, respectivamente. Com o sistema DEX/LAY, a reação inicia-se após 8 h, e após 24h a conversão foi de apenas 36%. Com os sistemas DEX/G/LAY,

DEX/G/LAN e DEX/G/LMJ e DEX/G/LPS após 12 h de reação, as conversões em éster foram o de 8, 15, 37 e 60%, respectivamente.

Estes resultados mostram que a conversão máxima ao produto é dependente da fonte do biocatalisador e do tempo de reação.

#### 4.6. Influência do solvente no meio reacional

Em reações catalisadas por enzimas um dos principais critérios a ser considerado é a escolha do solvente mais adequado para o sistema biocatalítico. O efeito tóxico do solvente pode ser devido a dois processos principais:<sup>57</sup>

- por difusão de moléculas de solvente através da membrana citoplasmática no caso de microorganismos (toxicidade molecular);
- por contato direto entre o biocatalisador e o solvente orgânico, (toxicidade de fase).

Comumente a polaridade do solvente é avaliada pelo logaritmo do coeficiente de partição do solvente em um sistema padrão *n*-octanol/água ( $\log P$ ), parâmetro que indica o grau de hidrofobicidade do solvente.<sup>57</sup>

A fim de verificar os efeitos causados pelos solventes com diferentes  $\log P$ , foi selecionado o sistema DEX/G/LPS como biocatalisador na reação de esterificação do ácido láurico com *n*-propanol.

Os solventes utilizados com os respectivos  $\log P$  foram; acetona (-0,23), éter etílico (0,85), clorofórmio (2,0), tolueno (2,5), cicloexano (3,2), *n*-hexano (3,5) e *n*-heptano (4,0). As conversões em éster em função do solvente empregado estão mostradas na **Tabela 8**.

**Tabela 8.** Efeito da variação da polaridade do solvente na reação de esterificação do ácido láurico com *n*-propanol com o sistema DEX/G/LPS.

Entrada	Solvente	Log P <sup>b</sup>	Conversão (%) <sup>a</sup>
1	acetona	-0,23	5
2	éter etílico	0,85	15
3	clorofórmio	2,0	32
4	tolueno	2,5	36
5	cicloexano	3,2	61
6	<i>n</i> -hexano	3,5	96
7	<i>n</i> -heptano	4,0	64

<sup>a</sup>-determinada por RMN-H<sup>1</sup> [ácido] e [álcool] = 5mmol, [enzima] = 50mg, 24h, 35°C.

<sup>b</sup>-dados da ref.57

As percentagens de conversão foram dependentes do tipo de solvente utilizado, ou seja, variou conforme o log P. Em geral ocorreu um aumento da percentagem de conversão com a hidrofobicidade do solvente, expressa pelo valor log P.

Os dados apresentados na **Tabela 8**, mostram que solventes com log P acima de 2,5 são excelentes em meio reacional, pois formaram o éster com altos valores de conversão, sendo 61, 96 e 64% com o cicloexano, *n*-hexano e *n*-heptano. Quando foram usados solventes com log P menores (mais polares), as conversões em éster foram de 36, 32, 15 e 5% com tolueno, clorofórmio, éter etílico e acetona, respectivamente.

Estes dados estão de acordo com os de Laane e col., onde foi verificado que existe tendência generalizada da relação entre atividade catalítica e a hidrofobicidade do solvente. Recomenda-se utilizar solventes com log P  $\geq$  4,0 para obter altas taxas de conversão em produtos. Solventes com log de P menores ( $\leq$  2,5), não são os mais adequados para a biocatálise, pois provavelmente retiram a camada de água ao redor da enzima, causando distorção na conformação cataliticamente ativa da enzima.<sup>38, 57</sup>

Com esses resultados ficou evidenciado a importância da escolha do solvente nas biotransformações para obtenção de produtos com altas percentagens de conversão.

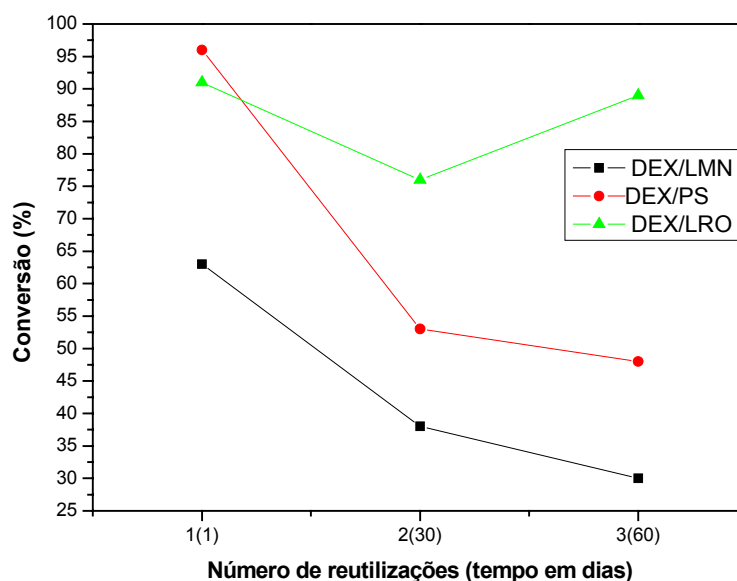
#### 4.7 Reutilização dos filmes de dextrana/glicerol com lipases imobilizadas.

A reutilização do biocatalisador é um fator importante quando se considera a aplicação prática de um determinado método sintético, especialmente quando o catalisador é de alto custo. Para tal, a estabilidade e estocagem de um biocatalisador imobilizado são parâmetros importantes que determinam a viabilidade econômica do processo.<sup>2,44</sup>

Foram utilizados os sistemas DEX/G/LPS, DEX/G/LLM e DEX/G/LRO nos testes de reutilização nas reações de esterificação do ácido láurico e *n*-propanol, e nas mesmas condições experimentais da primeira utilização.

Ao final de cada reação, os filmes com lipases imobilizadas foram retirados do meio reacional, lavados com *n*-hexano várias vezes a fim de remover os substratos e produtos remanescentes e estocados neste solvente por um período de 30 dias à temperatura ambiente.

A **Figura 21**, apresenta os valores de conversão em laurato de *n*-propila em função do número de reutilizações e tempo de estocagem.



**Figura 21.** Conversão em laurato de *n*-propila em função do número de reutilização e tempo de estocagem, com os suportes DEX/G/LPS, DEX/G/LLM e DEX/G/LRO. [ácido] e [álcool] = 5mmol, 24h, 35°C, *n*-hexano.

Com os sistemas DEX/G/LPS, DEX/G/LMJ, após 30 e 60 dias de armazenamento em solvente orgânico houve perda da atividade catalítica quando comparada à primeira utilização. A diminuição na conversão pode estar associada à perda de massa de enzima a cada ciclo, pois os filmes eram lavados sucessivamente com solvente (*n*-hexano). Com os sistemas DEX/G/LPS e DEX/G/LMJ, após 30 dias de estocagem, e na primeira reutilização, as conversões diminuíram de 96 para 53%, e de 63 para 38%, respectivamente. Após mais trinta dias de estocagem as conversões em produto, também diminuíram.

Resultados bem interessantes foram observados no sistema DEX/G/LRO onde as porcentagens em éster diminuíram apenas de 91 a 76%, após a primeira utilização, e aumentou de 76 para 89%, na segunda reutilização (60 dias de armazenamento). Esta variação na porcentagem de conversão provavelmente deve-se à presença de reagentes remanescentes e produtos no suporte polimérico, após a segunda utilização do suporte.

Durante o período de duração do experimento não foram observadas mudanças na aparência macroscópica dos filmes, salientando novamente o efeito positivo da imobilização e a possibilidade de reutilização do suporte e em especial da lipase de *R.oryzae*.

O processo de imobilização de enzimas é de grande importância, pois visa a utilização de biocatalisadores sem relativa perda de atividade, além da diminuição do custo do processo, através de sucessivas reutilizações.

## 5. Conclusões finais

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- √ O filme que apresentou melhores características macroscópicas foi com, 0,7g de dextrana dissolvidos em 0,2g de glicerol e 15ml de água;
- √ Os filmes de dextrana/glicerol mostraram-se estáveis em diversos solventes orgânicos;
- √ Os filmes contém ~13% de água, o que garante a estabilidade da lipase no meio reacional;
- √ Através dos resultados de MEV observa-se a presença de lipases na superfície do polímero;
- √ Com a LPS imobilizada, as conversões foram de 96%. Com as lipases LRO, LAN e LPP imobilizadas, as conversões em ésteres foram superiores a forma livre;
- √ Utilizando a LRO a conversão em éster aumentou de <5% para 91%, após a imobilização;
- √ Utilizando as lipases de *Candida rugosa* e Pancreática do porco, as conversões em produto foram < 40%, em 24h;
- √ No estudo de massa de lipase os maiores valores de conversão em éster foram obtidas utilizando 50 mg do biocatalisador. Com 25mg de LRO, a conversão em éster foi quantitativa (>99%);
- √ Em relação ao tempo de reação a LRO foi a enzima mais eficiente na síntese do laurato de *n*-propila, obtendo-se o produto com 91% após 8h;

- √ Com os sistemas DEX/G/LAY, DEX/G/LAN e DEX/G/LMJ e DEX/G/LPS as conversões em éster foram de 8, 15, 37 e 60%, respectivamente após 12h;
- √ Solventes com log P acima de 2,5 são excelentes como meio reacional, pois formaram o éster com altos valores de conversão, sendo 61,96 e 64% com cicloexano, *n*-hexano e *n*-heptano, respectivamente.
- √ Quando foram usados solventes com log P menores que 2,5 as conversões em éster foram de 36, 32, 15 e 5% com tolueno, clorofórmio, éter etílico e acetona, respectivamente.
- √ Os sistemas DEX/G/LPS, DEX/G/LMJ e DEX/G/LRO foram usados por três vezes, após 60 dias de armazenamento. A conversão em éster foi dependente da fonte de lipase. Os melhores resultados foram obtidos com o sistema DEX/G/LRO (96-89%);
- √ Os filmes de dextrana podem ser usados como suporte para imobilização de lipases e/ou de outras enzimas hidrolíticas (ex. papaína, quimiotripsina, tripsina).



## 6. Perspectivas

Dando continuidade a este trabalho, pretende-se:

- √ Estudar a influência da temperatura em reações de esterificação;
- √ Reutilizar as lípases na forma livre e comparar com os resultados obtidos;
- √ Utilizar outros substratos nas reações de esterificação, ex.: ácido oléico, ácido esteárico, ácido palmítico, etanol, *n*-pentanol, etc...
- √ Utilizar lipases de outras procedências no processo de imobilização e comparar com a forma livre;
- √ Utilizar os filmes de dextrana para imobilização de microorganismos, tal como o fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*), e aplicar este sistema em reações de redução de compostos carbonílicos (ex.: acetoacetato de etila, acetofenonas *p*-substituídas, etc.);
- √ Comparar os resultados obtidos com os outros suportes já descritos na literatura.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Murray, R. K., Granner, D. K.; Harper, Bioquímica, Atheneus SP, 6<sup>a</sup> Ed. Cap. 7. **1990.**
2. Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, New York, **1997.**
3. Nelson, D. L., Cox, M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed., Worth Publishers, Cap.5, 113-152, **2000.**
4. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E.; The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242, 2000. (b) Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/>>. Acessado em: 09 de julho de **2006.**
5. Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W.; Fundamentos de Bioquímica. Ed. Artmed, Porto Alegre, **2000.**
6. University of London – International Union of Biochemistry and Molecular Biology. *Enzyme Nomenclature* (desenvolvida por G. P. Moss). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: junho de **2006.**
7. Haki, G. D.; Rakshit, S. K.; *Bioresour. Technol.*, 89, 17-34, **2003.**
8. Faber, K., Kroutil, W.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, (2): 181-187, **2005.**
9. La Salle Santo Antônio. Disponível em:  
[www.lssa.com.br/saladeaula/eros/bio\\_2004/bio\\_1/1\\_trim/ENZ\\_CHFE.jpg](http://www.lssa.com.br/saladeaula/eros/bio_2004/bio_1/1_trim/ENZ_CHFE.jpg)  
acessado em 30 de junho de **2006.**
10. Loughlin, W.; *Bioresour. Technol.* 74, 49-62, **2000.**
11. Whitesides, G. M., Wong, C. H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24, 617-625, **1995.**

12. Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., Haas, M.J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 9 (4-6), 113-148, **2000**.
13. Zhao, H. M.; Chockalingam, K.; Chen, Z. L.; *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 2, 104-110, **2002**.
14. Serra, S.; Fuganti C.; Brenna E.; *Trends Biotechnol.* 23,193-198, **2005**.
15. Yee, L.N.; Akoh, C. C.; Phillips, R. S.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 3, 255-260, **1997**.
16. (a) Lima, V. M. G., Krieger, N.; Mitechell, D. A.; Fontana, J. D.; *Biochem. Eng. J.*, 18 (1), 65-71, **2004**. (b) Lima, V. M. G., Krieger, N., Mitechell, D. A., Fontana, J. D.; Baratti, J. C.; Filippis, I.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 31 (1-3), 53-61, **2004**.
17. Queiroz, N., Nascimento, M. G.; *Tetrahedron Lett.*, 43, 5225-5227, **2002**.
18. Nascimento, M.G., Neto, P.R.C.; Mazzuco, L.M., *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*, ano III, 19, 28-31, **2001**.
19. de Castro, H. F.; Mendes. A. A.; dos Santos, J. C.; de Aguiar, C. L. *Quim. Nova* 27, **2004**.
20. Wooley, P., Petersen, S. B.; *Lipases, their Structure, Biochemistry and Application*, Univ. Cambridge, **1994**.
21. Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A. N., Gupta, A. K.; *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 3180-3186, **1994**.
22. Wong & Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, 12, Ed. Pergamon. p. 22-25, **2002**.
23. Athawale, V., Manjrekar, N., Athawale, M.; *Tetrahedron Lett.*, 43, 4797-4800, **2002**.

24. Montalbetti, C. A. G. N., Falque, V.; *Tetrahedron*, 61, 10827-10852, **2005**.
25. Moreira, M. A., Bitencourt, T. B., Nascimento, M. G.; *Synth. Commun.*, 35, 2107, **2005**.
26. Pavia, D. L., Lampamamn and G.S. Kriz, "Introduction to Organic Laboratory Techniques", 3<sup>o</sup> ed, Saunders Golden Sunberst Series, pp. 86-88, **1988**.
27. Berger, R.G.; *Aroma Biotechnology*. Hannover, Springer. **1995**.
28. Ciência Hoje, disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/51503> acessado em 27de junho de **2006**.
29. Long, W. S., Kamaruddin, A. H., Bhatia S.; *Chem. Eng. Sci.*, 59, 22-23, **2004**.
30. Lohith, K., Divakar, S.; *J. Biotechnol*, 117, 49-56, **2005**.
31. Vecchia, R. D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quím. Nova*, 27, 4, 623-630, **2004**.
32. Zacks, A., Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.*, 263, 3194-3201, **1988**.
33. Klibanov, A. M., *Nature*, 409, 11, 241-246, **2001**.
34. Rocha, J.M.S., Gil, M.H., Garcia, F. A. P.; *J. Biotechnol.*, v.66, pág 61-67, **1998**.
35. Lortie, R.; *Bitechnol. Advances*, v.15, n.1, p.1-15, **1997**.
36. de Maria, P.D, Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B, et al. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 37 (1-6): 36-46, **2005**.
37. Celia, E. C., Cernia, E., D'Acquarica, I., Palocci, C., Soro, S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 6(5), 495-503, **1999**.
38. Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Nascimento, M.G.; *Process Biochem.*, 40 (8): 2677-2682, **2005**.

39. Rejasse, B., Mougard, T., Legoy, D. M.; *Enzyme Microb. Technol.*, 32, 312-320, **2003**.
40. Sivalingam, G., Chattopadhyay, S., Madras, G.; *Polym. Degrad. Stab.*, 79, 413-418, **2003**.
41. Kiliñç, A., Önal, S., Telefoncu, A.; *Process Biochem.*, 38, 641-647, **2002**.
42. Amorim, R.V.S., Melo, E.S., Carneiro-da-Cunha, M.G., Ledingham, W.M., Campos-Takaki, G. M.; *Bioresour. Technol.*, 89, 1, 35-39, **2003**.
43. Darder, M., Aranda, P., Hernández-Vélez, M., Manóvaa, E., Ruiz-Hitzky, E.; *Thin Solid Films*, 495, 1-2, 321-326, **2005**.
44. Du, W., Xu, Y., Liu, D., Zeng, J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 30, 3-4, **2004**.
45. Pandey, A. Benjamin, S. Soccol, C. R., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29; 119-131; **1999**.
46. Taqieddin, E., Amiji, M.; *Biomaterials*, 25 (10): 1937-1945, **2004**.
47. Teodor, E.; Rugina, A.; Radu, G. L.; *Rev. Chim.*, 56 (12): 1211-1213, **2005**.
48. Bobbio, F.O., Bobbio, P.A.; *Introdução à Química de Alimentos*, Fundação Cargill, 50-60, 81-82, **1985**.
49. Ferreira, L., Gil, M.H., Dordick, J.S.; *Biomaterials*, 23, 3957-3967, **2002**.
50. Zhang, J., Pelton, R., Wagberg, L., *Colloid & Polym. Sci*, 276, 476-482, **1998**.
51. Lu, M.; Tjerneld, F.; *J. Chromatogr. A*, 766(1-2), 99, **1997**.
52. Barbani, N., Bertoni, F., Ciardelli, G., Cristallini, C., Silvestri, D., Coluccio, M.L., Giusti, P.; *Eur. Polym. J.*, 41, 3004-3010, **2005**.

53. Casa, R.M., Guisán, J.M., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V; *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 30-40, **2002**.
54. UNESP, disponível em: [www.rc.unesp.br/ib/bioquimica/apre.html](http://www.rc.unesp.br/ib/bioquimica/apre.html), acessado em 10 de maio de **2006**.
55. DALLA-VECHIA, R., Imobilização de Lípases em Materiais Poliméricos: aplicações na Síntese de Ésteres. Tese de Doutorado, UFSC, **2005**.
- 56 Sebrão, D., Silva, V. D., Nascimento, M. G., Moreira, M. A., *Quím. Nova*, Submetido **2006**.
57. Laane, C., Boeren, S.; Veeger, C.; *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81, **1987**.

## **8. Participação em Congressos e eventos científicos**

Participação em eventos:

III Workshop de Biocatálise/II Encuentro Regional de Biocatalisis y Biotransformaciones. 2006.

11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis. 2005.

3º Encontro de Química da Região Sul. 2005.

XXVI Congresso Latinoamericano de Química/27º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Salvador, BA, 2004.

XII Encontro de Química da Região Sul. 2004.

### **Produção bibliográfica**

FERRAZ, A. M.; BITENCOURT, T. B.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. . Lipases Imobilizadas em Filmes de Dextranas na Formação de Oleatos de Etila. In: III Workshop de Biocatálise/II Encuentro Regional de Biocatalisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo. Livro de Resumos, 2006. v. Único.

FERRAZ, A. M.; BITENCOURT, T. B.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. . Utilização de Filmes de Dextrana/Glicerol na imobilização de Lipases. In: 3 Encontro de Química da Região Sul, 2005, Florianópolis. Livro de Resumos, 2005. v. Único.

FERRAZ, A. M.; BITENCOURT, T. B.; NASCIMENTO, M. G. . Esterificação do ácido láurico catalisada por lípases imobilizadas em filmes de dextrana. In: 29º Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2006. v. único.