



Universidade Federal de Santa Catarina

Universidade Regional de Blumenau

Curso de Pós-Graduação em Química

Mestrado Interinstitucional em Química – UFSC/FURB

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM GEL DE PECTINA

Mestranda: Rosemi dos Santos

Orientadora: Prof. Dr. Maria da Graça Nascimento

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo César de Jesus

**Florianópolis e Blumenau – SC
Junho 2003**

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM GEL DE PECTINA

Rosemi dos Santos

Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Maria da graça Nascimento
Orientador

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Coordenador do Programa de Pós- graduação em Química

Banca examinadora:

Prof. Dr. Maria da graça Nascimento
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Paulo César de Jesus
Universidade Regional de Blumenau – FURB

Prof. Dr. Tereza Cristina Rozone de Souza
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Marina Uieara
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Florianópolis, 27 de junho de 2004.

Rosemi dos Santos

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM GEL DE
PECTINA**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Florianópolis e Blumenau- SC

Junho 2003

Dedico

Aos meus pais

Pedro B. dos Santos,

Almirena B. dos Santos, e

Horácio Vieira da Costa Jr.

AGRADECIMENTOS

A Deus e minha família.

À professora Dra. Maria da Graça do Nascimento, e ao professor Dr. Paulo César de Jesus pela orientação e incentivo, amizade e contribuição de seus conhecimentos necessários à realização deste trabalho.

Aos professores e demais funcionários do Departamento de Química da UFSC e FURB, em especial aos professores Dr. Ricardo Andrade Rebelo e Dr. Mauro Scharf, que colaboraram para a realização deste trabalho.

A CAPES, FUNCITEC, pelo apoio ao programa de Mestrado Interinstitucional UFSC-FURB.

Aos colegas dos Laboratórios de Pesquisas da FURB e a Central de análises do DQ-UFSC.

A empresa Marvale Comércio e Indústria Ltda (Encasa).

As amigas Márcia e Mirele.

RESUMO

Neste trabalho o gel de pectina foi utilizado como suporte para imobilização de lipases com aplicação na síntese de esteres alquílicos. Inicialmente foi realizado um estudo para verificar o efeito da concentração de pectina cítrica e cloreto de cálcio na formação de um gel rígido e estável. As concentrações de íons cálcio utilizadas foram de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,8 e 1M. O gel mais rígido foi formado com a solução de 0,3M de CaCl_2 . Foi avaliada a estabilidade do gel de pectina em diferentes solventes, álcoois e ácidos alifáticos, e diferentes lipases. As lipases utilizadas foram as de *Candida rugosa* (Amano e Sigma) *Rhizopus Oryzae*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor Javanicus*, Pâncreas de Porco e lipozyme RM IM Palatase M, Lipolase. Após terem sido avaliados os parâmetros citados acima, as lipases da *Candida rugosa* (CRL 30U/mg de sólido Amano) e (CRL, 746U/mg de sólido da Sigma) foram imobilizadas e utilizadas em reações de esterificações dos ácidos hexanóico, decanóico e láurico com butanol-1, pentanol-1, octanol-1 e decanol-1. Foi avaliado também a influência do tempo, quantidade de lipase e concentração dos reagentes na obtenção do laurato n-pentila. A melhor concentração do ácido láurico e pentanol-1 foi de 0,01M para ambos os reagentes, e 100mg CRL / 10g gel sendo que o éster foi obtido, com 60% de rendimento após 5dias de reação. A utilização do gel de pectina com CRL imobilizada para repetidas preparações do laurato n-pentila foi estudada, a fim de estabelecer a eficiência e estabilidade da CRL imobilizada neste gel. O gel de pectina pode ser utilizado até cinco vezes, Os produtos foram caracterizados por ccd e por análises espectroscópicas de IV e RMN de ^1H .

ABSTRACT

In this work the pectin gel was used as support for immobilization of lipases with application in the aliphatic ester synthesis. Initially a study was carried through to verify the effect of the concentration of citric pectin and calcium chloride in the formation of a rigid and steady gel. The concentrations of ions calcium had been of 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,8 e 1M. The gel mais rigid was formed with the solution 0,3 M of CaCl_2 . The stability of the gel of pectin in different solvent alcohol was evaluated and acid aliphatic and different lipases. Lipases of *Candida rugosa* (Amano and Sigma) *Rhizopus Oryzae*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor Javanicus*, Pancreas de Porcine e lipozyme RM IM Palatase M, Lipolase. After to have been evaluated the cited parameters above lipases da *Candida rugosa* (CRL 30U/mg de sólido Amano) e (CRL, 746U/mg de sólido da Sigma) had been immobilized in reactions of esterification of esters of acid hexanoic, decanoic and lauric with butanol-1 pentanol-1 octanol-1 and decanol-1. It was also evaluated the influence of the time amount of lipase and concentration of the reagents in the attainment of the laurate n-pentil. The best concentration of the acid lauric and pentanol-1 was of 0,01M For the reagents and 100mg CRL gel being that the ester was gotten with 60% of income after 5days of reaction. The use of gel of pectin with immobilized CRL for repeated preparations of the laurate n-pentil was studied in order to establish the efficiency and stability of the immobilized CRL in this gel. The pectin gel can be used up to five times. The products had been characterized by IR and spectroscopic analyses IR and RMN ^1H .

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Classificação das Enzimas	05
1.1.1 Aplicações de Lipases em Síntese Orgânica	06
1.2 Mecanismo das Hidrolases.....	11
1.3 Imobilização de Enzimas.....	15
1.3.1 Características Gerais dos Suportes para Imobilização	15
1.3.2 Classificação dos Métodos de Imobilização	17
1.4 Imobilização em Gel de Pectina Cítrica.....	20
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. PARTE EXPERIMENTAL	27
4.1 Materiais e Métodos	27
4.2 Caracterização dos Compostos	28
4.3 Preparação e Imobilização de Lipases em Gel de Pectina	28
4.4 Preparação do Meio Reacional	30
4.5. Influência de Diferentes Lipases, Álcoois e Ácidos, Tempo e Concentração dos Reagentes na Reação de Esterificação.....	31

4.6 Reutilização do Suporte de Gel de Pectina	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1 Efeito da Concentração de Pectina Cítrica e Cloreto de Cálcio	34
5.2 Estabilidade do Gel em Diferentes Solventes Orgânicos, Ácidos e Álcoois Alifáticos	36
5.3 Avaliação da Estabilidade do Gel de Pectina com Diferentes Lipases.....	39
5.4 Aplicação do Gel de Pectina contendo Diferentes Lipases Imobilizadas na Síntese de Ésteres	41
5.5 Efeito da Concentração da Lipase de <i>Candida Rugosa</i> na Reação de Esterificação do Ácido Láurico com n-pentanol.....	43
5.6 Efeito da Concentração do Ácido Láurico e n-Pentanol.	44
5.7 Influência do Tempo na Percentagem de Conversão Laurato de n-pentila.	46
5.8 Influência da Cadeia Hidrocarbônica dos Substratos nas Reações de Esterificação	47
5.9 Reutilização do Suporte de Gel de Pectina	50
5.10 Géis Utilizados para Imobilização de Lípases	51
5.11 Caracterização dos Produtos	53
6. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação Esquemática de uma Lipase	04
Figura 2. Acilação do DOX Catalisada por Lipase de <i>Mucor Javanicus</i>	07
Figura 3. Hidrólise Enantiosseletiva de Alquilésteres de 1-fenil etanol	08
Figura 4. Esterificação Regiosseletiva de Compostos Polihidroxilados.....	09
Figura 5. Comportamento Catalítico das Lipases e Esterases	12
Figura 6. Modelo Chave-fechadura do Sítio de Ligação da Enzima.....	13
Figura 7. Modelo de um Encaixe Induzido e Tensão no Substratos.....	14
Figura 8. Representação da Ligação de um Substrato por 3 Pontos a um Centro Ativo Enzimático Puro.....	14
Figura 9. Principais Métodos de Imobilização de Enzimas.....	17
Figura 10. Tipos de Suportes Utilizados na Imobilização das Enzimas por Envolvimento ou Oclusão	19
Figura 11. Representação da Estrutura da Pectina.....	22
Figura 12. Estrutura da Rede Tridimensional da Gelificação da Pectina...	23
Figura 13. Preparação do Gel de Pectina	29
Figura 14. Adaptação da Cromatografia de Sistema a Vácuo.....	31
Figura 15. Modo de Ação das Enzimas Depolimerizantes na Pectina	41
Figura 16. Reação de Esterificação do Ácido Láurico com n-Pentanol	42
Figura 17. Efeito de Concentração de Lipases de <i>Candida Rugosa</i> na Obtenção de Laurato de n- Pentila.....	43

Figura 18. Conversão em Laurato de n-Pentila em Função da Concentração dos Substratos [1:1].....	45
Figura 19. Influência do Tempo na Conversão em Laurato de n-pentila	46
Figura 20. Conversão (%) em Alcanoatos de Pentila em Função do Número de Carbonos na Cadeia Alquílica dos Ácidos com Pentanol-1....	48
Figura 21. Conversão(%) em Lauratos de Alquila em Função do Número de Carbono na Cadeia Alquilica do Álcool.....	49
Figura 22. Conversão(%) em Laurato de n- Pentila em Função do Número de Reutilizações do Suporte.....	50
Figura 23. Espectro IV para Laurato de n-Pentila.....	54
Figura 24. Espectro RMN de ^1H do Laurato de n-Pentila.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das Enzimas Segundo IUBMB.....	05
Tabela 2 – Utilização de Enzimas na Indústria Alimentícia.....	10
Tabela 3 – Comparação de Suportes para Imobilização de Biocatalisadores Quanto à Porosidade	16
Tabela 4 – Trabalhos Utilizando Pectina como Suporte para Imobilização de Microorganismo	24
Tabela 5 – Enzimas Utilizadas no Trabalho.....	27
Tabela 6 – Estabilidade do Gel de Pectina em Diferentes Solventes Orgânicos, Ácidos e Álcoois	38
Tabela 7 – Avaliação da Estabilidade do Gel com Diferentes Lipases	39

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas parcialmente purificadas como catalisadores específicos se tornou muito importante para um grande número de indústrias. Na última década, as reações catalisadas por enzimas aumentaram dentro da química orgânica sintética. Estima-se que das 25.000 enzimas presentes na natureza, cerca de 2.800 foram classificadas e perto de 400 são comercializadas de uma forma pura.^{1,2}

A eficiência catalítica das enzimas, em geral, é muito maior do que a dos catalisadores sintéticos, devido ao seu alto grau de especificidade tanto para o substrato quanto para as reações que catalisam.²

A produção de compostos enantiomericamente puros tem crescido nos últimos anos porque os catalisadores quirais estão sendo comercialmente mais úteis, onde somente um dos enantiômeros é biologicamente ativo. Enzimas como catalisadores tem notáveis propriedades, mas uma característica faz delas especialmente valiosas para síntese orgânica, elas são seletivas.³

Por definição, enzimas são catalisadores que se formam nas células vivas dos vegetais, animais e microorganismos, e são agentes essenciais para a realização de reações bioquímicas com alta especificidade.^{2,3}

Geralmente são de natureza proteica, altamente específicas e apresentam grande poder catalítico. São proteínas de alto peso molecular, formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. Possuem em suas estruturas grupos polares, tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂ que atuam como catalisadores. Sua atividade e

estrutura mais estável são mantidas em meio aquoso.^{4,5} Embora não sejam proteínas, certos ácidos ribonucléicos (RNAs) exibem atividade catalítica. Estes RNAs, que satisfazem todos os critérios para definição como enzimas, são denominados ribozimas. Embora os substratos sobre os quais agem as riboenzimas sejam limitados às ligações fosfodiéster dos RNAs, a especificidade da sua ação é inteiramente comparável à das enzimas clássicas.^{2,5}

As enzimas vêm sendo utilizadas por vários séculos. Apesar de sua verdadeira natureza ter sido conhecida apenas recentemente, elas apresentam cada vez mais uma grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria. O interesse em utilizar enzimas como catalisadores tem aumentado devido a sua alta versatilidade e às condições suaves de temperatura e pH em que se realizam as reações. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização, rearranjos, etc.^{2,3,4,6}

As enzimas possuem estruturas complexas de cadeias polipeptídicas, sendo que algumas têm sua estrutura tridimensional descrita na literatura.⁷

Na **Figura 1**, pode se observar a tríade catalítica formada pelo resíduos de aminoácidos Ser105, His244, Asp187 da lipase de *Candida antarctica B*. A representação da estrutura tridimensional, foi obtida por cristalografia de raio - X e retirada da "Protein Data Bank (PDB)"⁷ tendo seu sítio catalítico ampliado com auxílio do programa Swiss PDB Viewer⁸

Em geral todas as lipases cujas estruturas têm sido elucidadas são membros da família α, β -hidrolases pregueada com uma arquitetura comum composta de uma seqüência de fitas α e β . Hidrolisam as ligações de

ésteres e/ou amidas através de uma tríade catalítica composta de um resíduo ativado de serina nucleofílica por ligação de hidrogênio, em conjunto com histidina, ácido aspartico ou ácido glutâmico (Ser-His-Asp/Glu).⁹ O mecanismo de ação catalítica de uma lipase na aminólise de um éster consiste em cinco etapas:^{2,3,4}

1. Ligação ao substrato éster
2. Formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica, com oxiânion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio, a chamada “cavidade oxiânion”.
3. Quebra da ligação éster
4. Saída da porção alcoólica
5. Aminólise do intermediário acil-enzima

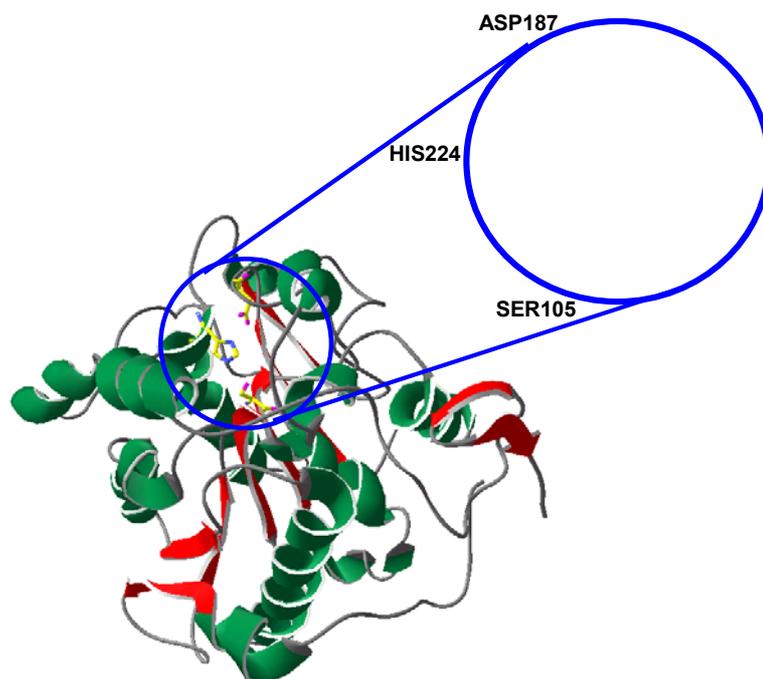


Figura 1. Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica B* ^{7,8}

A lipase do fungo da *Rhizomucor (mucor) miehei* foi uma das primeiras a ter a estrutura desvendada, através das técnicas de cristalografia de raio-X. É conhecida comercialmente como lipase de *Mucor miehei*, e sua estrutura é composta de 269 resíduos de aminoácidos, sendo que seu sítio ativo é constituído pelos resíduos Asp.203, His.257 e Ser.144. A lipase Pancreática possui resíduos de serina, histidina e um aminoácido com grupo carboxilato na cadeia lateral para sua atividade catalítica. A lipase da *Humicola Lamuginosa* requer histidina, tirosina e um grupo carboxilato na cadeia lateral para a sua atividade, e a lipase de *Geontrium candidum* não apresenta nenhum resíduo de serina reativo.^{3,5}

1.1. Classificação das Enzimas

Existem catalogadas mais de 2.000 enzimas, sendo que cada uma aceita um certo substrato e catalisa uma reação em particular. Elas podem ser classificadas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), em seis grupos conforme mostra a **Tabela 1**:

Tabela 1 - Classificação das enzimas segundo IUBMB. ^{2,10}

	CLASSES	FUNÇÃO CATALÍTICA	EXEMPLOS
1	Oxidoredutases	Catalisam reações de oxidação-redução envolvendo oxigenações e remoção ou adição de átomos de hidrogênio	Desidrogenase Oxidase
2	Transferases	Intermediam a transferência de vários grupos, tais como aldeídos, cetonas, etc...	Metiltransferase Transaminase
3	Hidrolases	Clivam ligações ésteres e catalisam a hidrólise de ésteres, amidos, glicosídeos, etc...	Carboidrase Esterase Lipase Fosfatase Protease
4	Liasas	Catalisam a quebra de ligações duplas pela adição de HX	Descarboxilase
5	Isomerases	Catalisam processos de isomerização, tais como racemização	Cis-Trans Isomerase Mutase
6	Ligases	Catalisam a formação de ligações	Sintetase Carboxilase

Na classe das hidrolases destacam-se as lipases que são glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. Elas têm sido isoladas de uma variedade de tecidos de animais e plantas, e podem ser também

produzidas por processos de fermentação usando várias espécies de microorganismos (fungos e bactérias).

As lipases (triglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) hidrolisam triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol.^{2,5,6}

Devido a grande aplicabilidade das hidrolases em síntese orgânica, especialmente as lipases, torna-se necessário explanar sobre a sua importância e usos recentes.

1.1.1. Aplicações de lipases em síntese orgânica

As vantagens de se utilizar lipases em meio orgânico deve-se principalmente ao seu baixo custo, disponibilidade comercial, versatilidade catalítica, por não requererem cofatores, por serem regioespecíficas para posição 1,3 de triglicerídeos, por serem estereosseletivas e atuarem em uma ampla faixa de pH e temperatura. Muitos dos estudos para utilização de lipases em síntese orgânica têm chamado atenção por suas várias aplicações. As lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, transesterificação amidação, síntese de peptídeos, etc.^{2,11}

A Biocatálise surgiu como uma ferramenta poderosa e útil para desenvolver derivados originais de moléculas complexas. Alguns agentes ativos farmacêuticos são frequentemente utilizados, em quantidades limitadas devido ao seu alto valor agregado, como substratos em sínteses. Esta

propriedade necessita de procedimentos eficientes para que sejam desenvolvidos análogos melhorados.¹²

Altreuter e col.¹² utilizaram a lipase de *Mucor javanicus* para promover a acilação do álcool primário (C14-OH) da doxorubicina (DOX), um potente composto anticancerígeno. Os resultados mostraram a acilação do DOX com butirato de vinila e do tiofenoacetato de vinila em tolueno. A análise por HPLC confirmou a transformação do DOX, que produziu exclusivamente um único produto. A **Figura 2**, ilustra esta reação .

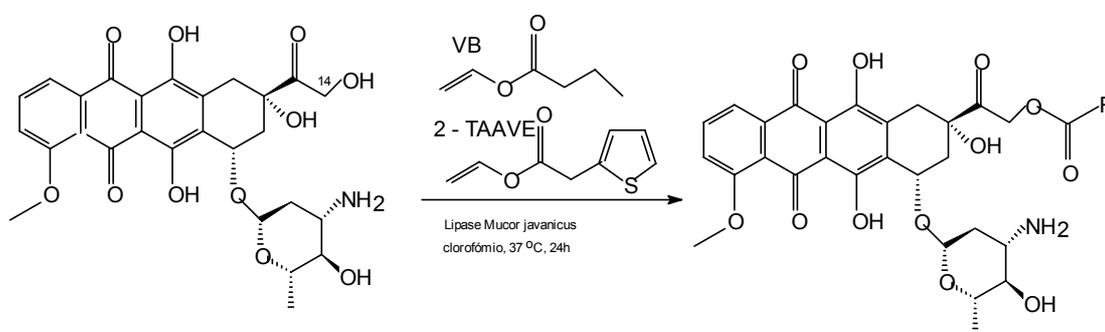


Figura 2. Acilação do DOX catalisada por lipase de *Mucor javanicus* no C14- OH com (a) butirato de vinila(VB) ou (b) éster vinílico 2-tiofenoacetato. (2-TAAVE)

Na Universidade de Virginia, pesquisadores sintetizaram através da imobilização da lipase de *Candida rugosa* em nylon em solventes apolares, o Lovostatim, que é um redutor de colesterol. Este composto, como outros dessa família, já vem sendo pesquisado desde 1980 por Yang e col.¹³

Koul e col. aplicaram as lipases do Pâncreas do porco (*PPL*), *Candida rugosa* (*CRL*) e *Pseudomonas* sp (*PSL*) na hidrólise enantiosseletiva de

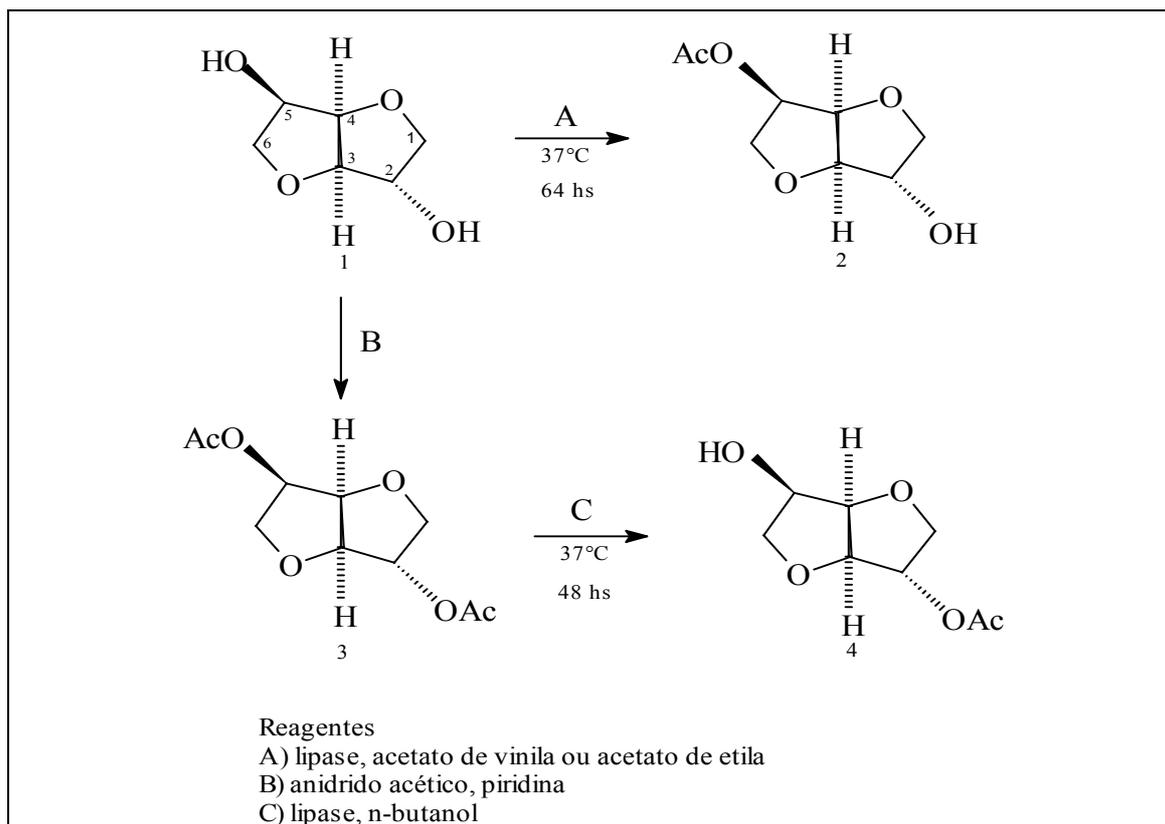


Figura 4. Esterificação regioseletiva de compostos polihidroxilados utilizando-se lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada em resina de amberlite.

As enzimas tornaram-se importantes ferramentas práticas, não apenas na medicina, mas também na indústria química, no processamento de alimentos e agricultura.

Na indústria alimentícia desempenham um papel importante, modificando suas características, tornando-os mais atraentes ao consumidor. Atuam na elaboração de produtos de elevado valor agregado e são responsáveis pelo aumento do rendimento de extração de sucos de frutas. Algumas atuam reduzindo a viscosidade, promovendo bioconversões, alterando sabor e aroma, sintetizando produtos químicos, e como auxiliar de

limpeza.¹⁶ A **Tabela 2** mostra a utilização de algumas enzimas na indústria alimentícia.

Tabela 2. Utilização de enzimas na indústria alimentícia.¹⁶

ENZIMAS	APLICAÇÕES
Proteases	Fabricação de queijos, amaciante de carne, cerveja a prova de congelamento, fabricação de xarope de cereais, fabricação de couro.
Carboidrases	Hidrólise de amido, inversão da sacarose, clarificação do suco de frutas e do vinagre.
Enzimas Hidrolíticas	Destruição de componentes tóxicos ou indesejáveis nos alimentos.

Como resultado na sua utilização, há economia de divisas e acréscimo no faturamento das indústrias de sucos, cervejarias, refrigerantes, panificação, laticínios, álcool, xarope de glicose e frutose.¹⁷

O trabalho de Yee e col. relatou a síntese de butirato de citroneíla e caproato de geranoíla por transesterificação usando lipase de *Pseudomonas* sp imobilizada em poli-vinilpirrolidona.¹⁸ A ocorrência de óleos essenciais e suas propriedades organolépticas fazem com que sejam usados como aromatizantes em produtos alimentícios, detergentes e perfumes.

A síntese do butirato de butila com rendimento de 90% usando lipase do pâncreas do porco, suportada em material poroso (celite) em hexano, relatada no trabalho de Castro e col. mostra a vantagem do uso de biocatalisadores na síntese de ésteres flavorizantes.¹⁹

A produção do acetato de isoamila, foi realizada por Guvenç e col.²⁰ em um sistema livre de solventes, utilizando-se duas lipases imobilizadas em resinas aniônicas e disponíveis comercialmente, *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica*. A lipase de *Candida antarctica* foi mais eficiente para a produção do

acetato de isoamila. Uma concentração do acetato de isoamila de 380gL^{-1} (conversão de 80%) foi produzida em 6h de reação, usando 5% (g enzima /g substrato) em um sistema livre de solvente com uma concentração ácida de 3,6M (relação molar do ácido/álcool de 1/2) a 30°C .

1.2. Mecanismo das Hidrolases

A diferença mais importante entre lipases e esterases é a interação físico-química com seus substratos. Em comparação com as esterases que mostram uma atividade “normal” segundo Michaelis-Menten, onde um aumento da concentração de substrato, [S] conduz um aumento na atividade, a lipase não mostra atividade quando a concentração de substrato é baixa. Quando a concentração é gradualmente aumentada acima de sua solubilidade limite, é observado um aumento brusco na atividade (**Figura 5**).^{2,3}

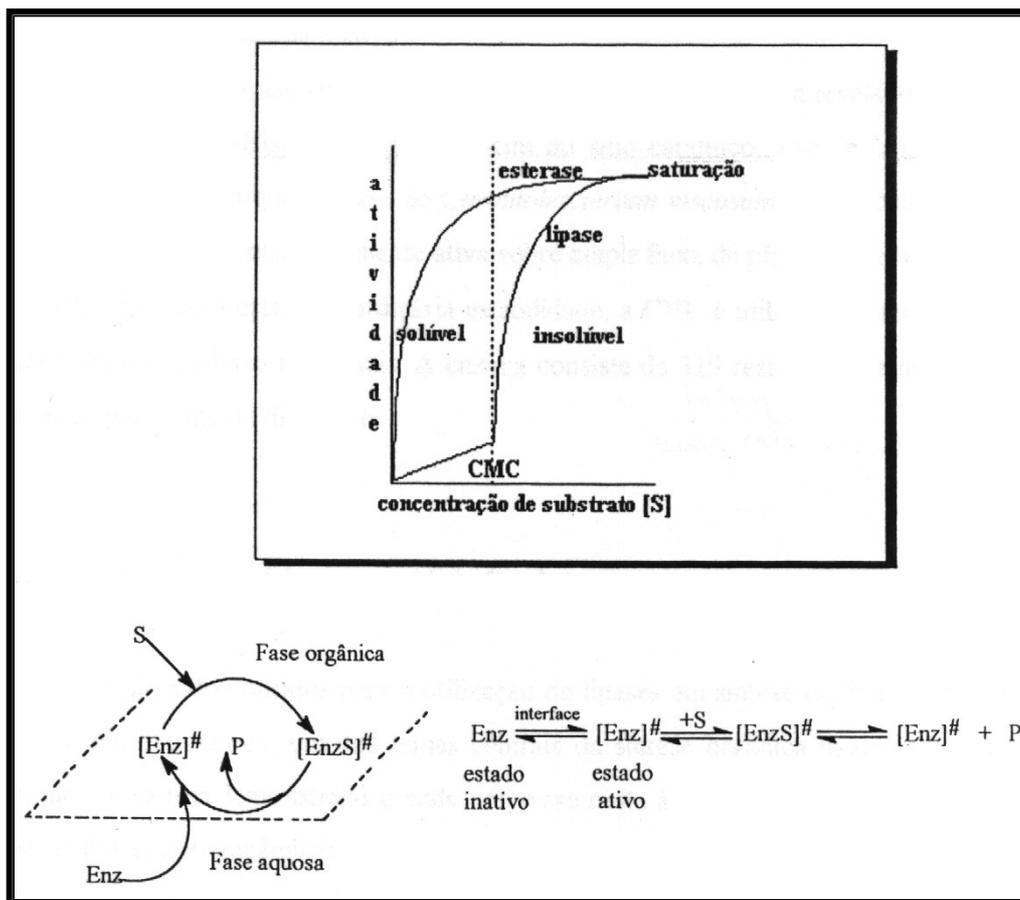
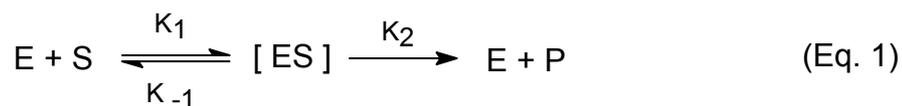


Figura 5. Comportamento cinético das lipases e esterases.^{2,3}

O fato de lipases não hidrolisarem substratos abaixo da concentração micelar crítica (CMC), mas exibirem uma atividade acima dela tem sido chamada de “ativação interfacial”.^{2,3,10}

As enzimas reagem via formação de um complexo enzima-substrato para posteriormente formar produtos (Equação 1).



Como toda reação catalítica, uma enzima acelera a velocidade da reação diminuindo a barreira energética entre reagentes e produtos. Grande

parte de seu poder catalítico ocorre por elas aproximarem os substratos em orientações favoráveis no complexo enzima-substrato [ES].²

Entre as teorias e racionalizações que têm sido desenvolvidas para entender catálise enzimática, os modelos mais ilustrativos são o mecanismo da chave e fechadura desenvolvida por Emil Fischer e o do encaixe induzido de Koshland Jr. A regra de três pontos foi outra teoria criada por A. G. Ogston para explicar a enantiosseletividade das enzimas.² Essa “ligação por três pontos” pode conferir assimetria a uma molécula que, de outro modo seria simétrica. O modelo proposto por Emil Fischer visualizava a interação entre substrato e enzima em termos de analogia com um conjunto de “chave e fechadura” ou modelo de molde rígido (**Figura 6**).³

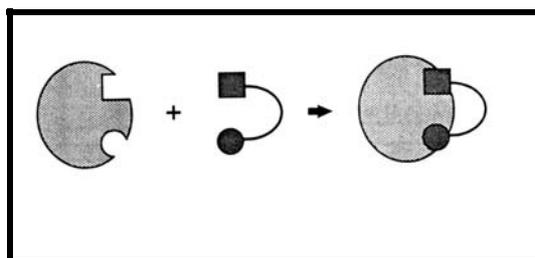


Figura 6. Modelo chave-fechadura do sítio de ligação da enzima.²

O modelo de Koshland Jr. é mais refinado e certamente mais útil para explicar as propriedades das enzimas. Uma característica essencial é a flexibilidade da região do sítio ativo. No modelo de Fischer, presume-se que o sítio ativo é formado para encaixar o substrato.²

No modelo de encaixe induzido, o substrato induz uma mudança de conformação na enzima, isto é posiciona resíduos de aminoácidos ou de outros grupos na orientação espacial correta para a ligação do substrato, para a catálise ou ambas.

No exemplo da **Figura 7**, modelo de Koshland, grupos hidrofóbicos (região hachurada) e dotados de carga (região pontilhada), estão envolvidos na ligação do substrato.²

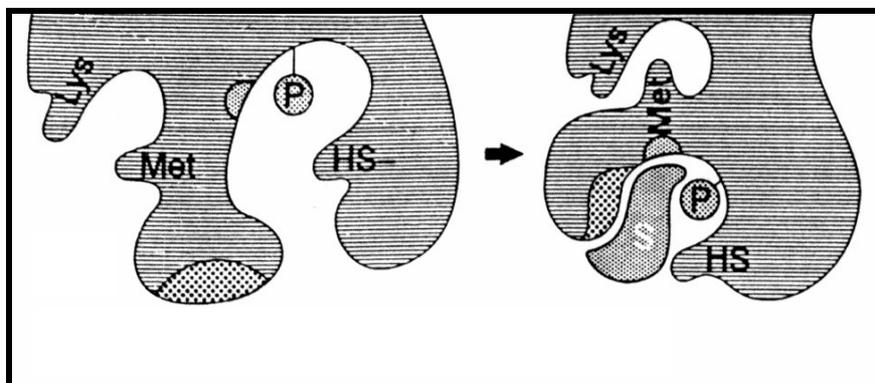


Figura 7. Modelo de um encaixe induzido e tensão no substrato. Uma fosfoserina (-P) e o -SH do resíduo de cistina estão envolvidos na catálise.

A **Figura 8** mostra uma molécula de um substrato, representada por um átomo de carbono ligado a três grupos diferentes, que estão disponíveis para se ligarem a três pontos, em um centro enzimático.²

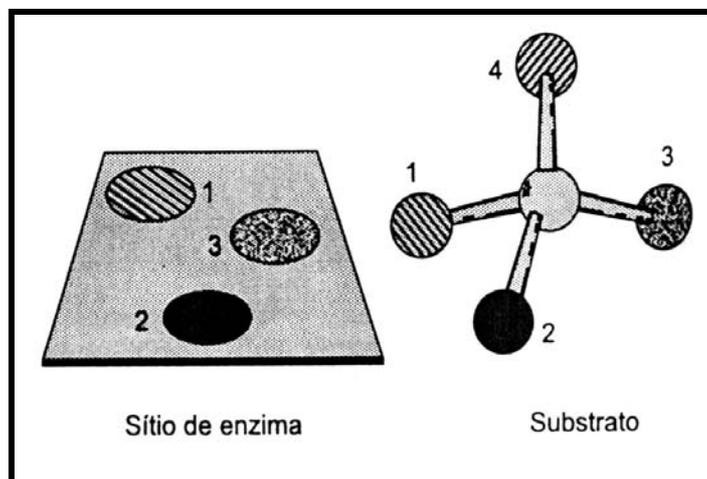


Figura 8. Representação da ligação de um substrato por 3 pontos a um centro ativo enzimático puro.²

1.3. Imobilização de Enzimas

As enzimas estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Há assim, uma necessidade de estabilizar a enzima contra inativação para utilizá-la em meio orgânico. Faz-se então necessário o emprego de um método para que a mesma não perca sua atividade catalítica e estereosseletividade. Frente a este problema, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar a sua recuperação e reutilização.^{21,22}

A imobilização de enzimas em diferentes suportes é uma das técnicas mais importantes que vem sendo utilizada na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos. Por razões práticas e econômicas, é muitas vezes vantajoso usar enzimas imobilizadas visto que, com poucas exceções, elas são insolúveis em solventes orgânicos. A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo possibilitar o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais .^{22 23,24,25}

1.3.1. Características gerais dos suportes para imobilização

A natureza do suporte é muito importante para a eficiência da imobilização. Geralmente materiais hidrofóbicos são melhores comparados aos suportes hidrofílicos. A quantidade de enzimas adsorvidas nos suportes hidrofóbicos é maior, e com isso a atividade da enzima é preservada. Suportes

hidrofílicos tendem a competir com a enzima pela água que está disponível para a reação. Quando a enzima e o suporte estão totalmente hidratados, o suporte hidrofílico conduz a uma maior concentração de água no ambiente da enzima favorecendo reações hidrolíticas.²¹

O suporte pode ser dividido em duas regiões, a de macroporos (> 100 nm) e a de microporos (< 100 nm). Na região de microporos a adsorção é considerada reduzida.²¹ Morfologicamente, as matrizes para imobilização podem ser classificadas em porosas e não porosas.

A **Tabela 3** compara as vantagens e desvantagens dos suportes, quanto a porosidade.

Tabela 3. Comparação de suportes para a imobilização de biocatalisadores quanto à porosidade.^{22,26}

Classificação Morfológica	Vantagens	Desvantagens
Matrizes não porosas	Pequenas limitações difusionais	Pequena área de superfície Baixo teor em biocatalisadores Uso de partículas finas <ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade para remover • Dificuldade para uso contínuo • Elevada pressão osmótica • Velocidade de fluxo limitada
Matrizes porosas	Elevada área de superfície Elevado teor em biocatalisadores Proteção ao ambiente externo	Elevada área de superfície interna Elevadas limitações difusionais Elevado custo Elevada pressão osmótica (géis) Pequena área de superfície útil

1.3.2. Classificação dos métodos de imobilização

A **Figura 9**, ilustra os diversos métodos de imobilização de enzimas.^{21,27}

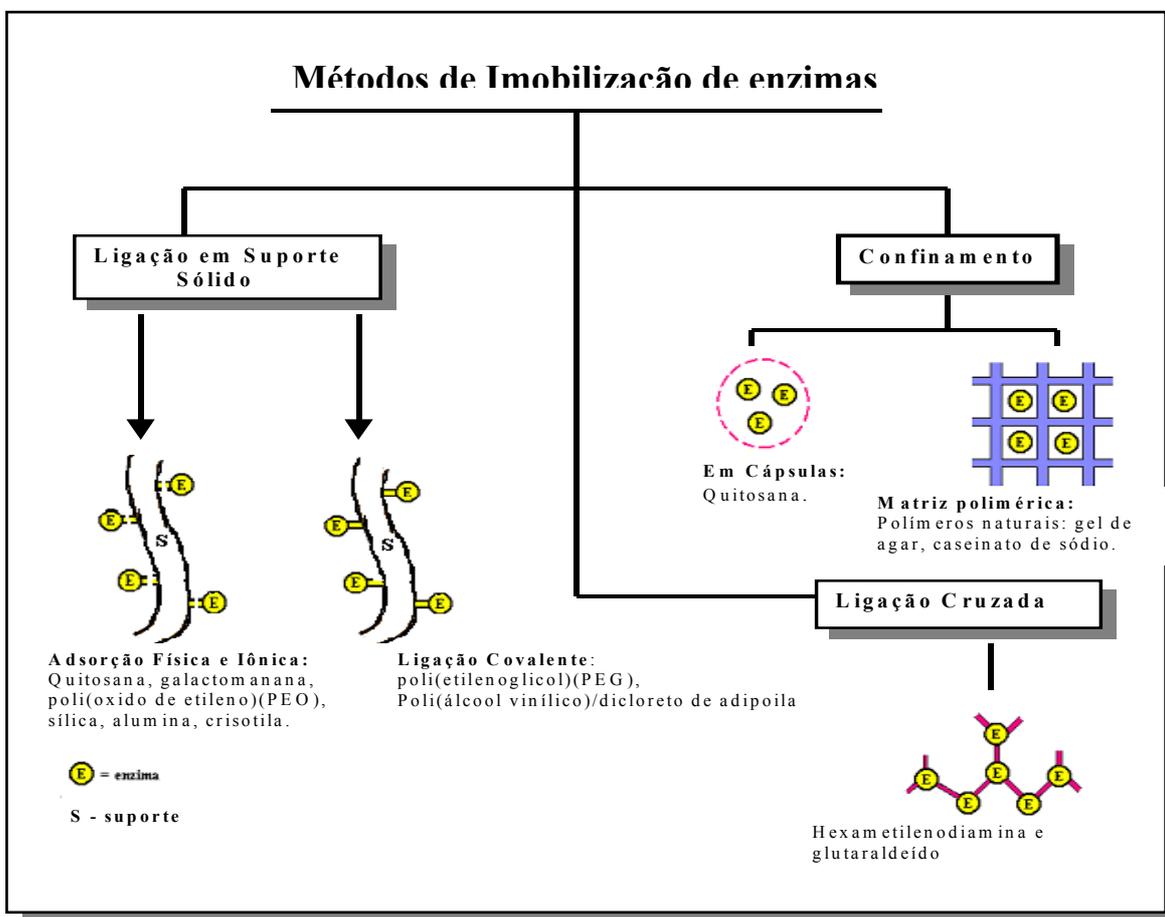


Figura 9. Principais métodos de imobilização de enzimas.^{21,27}

Os métodos são classificados em três categorias estabelecidas na tentativa de combinar o tipo de interação responsável pela imobilização e a natureza do suporte, são eles:^{2,21}

- **Método de adesão ao suporte:** Consiste na fixação do biocatalisador a um suporte insolúvel em água, por adsorção física, por ligação iônica ou covalente. Os materiais utilizados como suporte podem ser orgânicos ou inorgânicos sendo que os mais comuns são a sílica, alumina, carvão ativado, e vários

polissacarídeos, além de polímeros que podem ser naturais, como ágar, ou sintéticos, como o poli-óxido de etileno (PEO).

- **Método de ligação covalente cruzada** : As enzimas com ligações cruzadas são macromoléculas insolúveis em água produzidas pela reação de enzimas com reagentes bifuncionais, sendo o glutaraldeído o mais popular e usado. Os dois grupos aldeídicos do glutaraldeído formam bases de Schiff com resíduos de aminoácidos livres da enzima formando uma rede de ligação cruzada. Este processo é também conhecido como reticulação.
- **Método de imobilização por aprisionamento ou oclusão**: Baseia-se fundamentalmente na retenção de enzimas no interior de uma matriz polimérica de modo a impedir a sua liberação para o meio, permitindo apenas difusão do substrato e produtos. Neste método, nenhuma reação ocorre sendo um processo de retenção física da enzima. Este procedimento tem a vantagem de que o biocatalisador não é submetido a uma modificação estrutural, e é protegido por substâncias de alto peso molecular.

A **Figura 10** mostra a classificação do método de aprisionamento ou oclusão de enzimas.

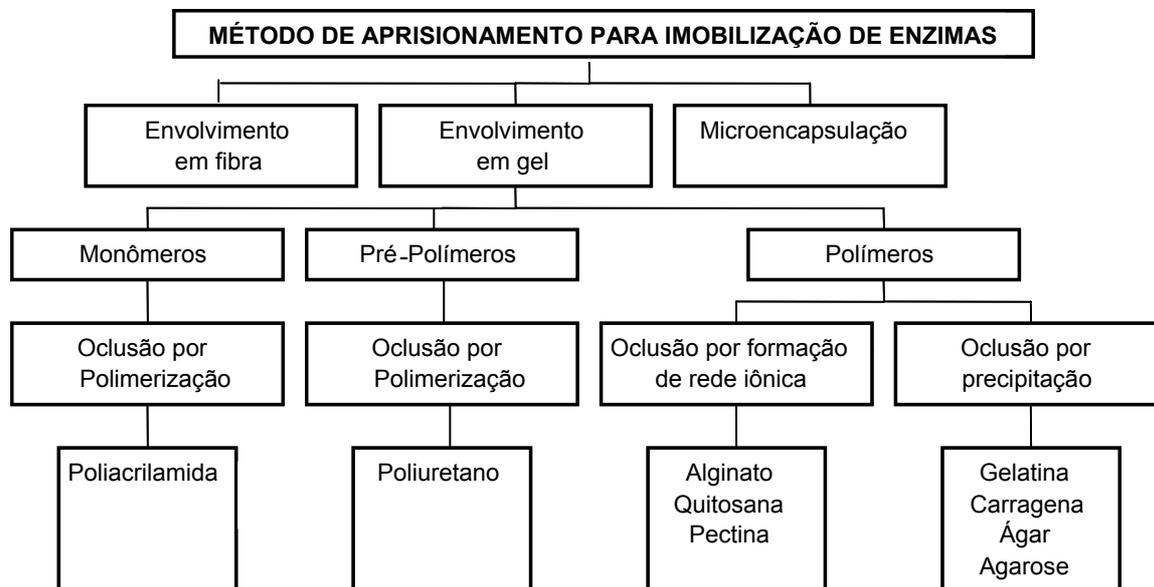


Figura 10. Tipos de suportes utilizados na imobilização das enzimas por envolvimento ou oclusão.

Jesus e col. obtiveram bons resultados nos estudos sobre imobilização de lipases em suportes como organo-gel, bagaço de cana-de-açúcar, crisotila e gel de agar na obtenção de álcoois opticamente ativos e aromas para a indústria de alimentos^{28, 29, 30}.

O efeito no rendimento na reação de esterificação do ácido láurico com 1-pentanol em n-hexano, catalisada por lipases de diferentes fontes frente a variação de temperatura, utilizando dois sistemas diferentes de proteção da enzima, por encapsulamento e incorporação em polímeros foi estudado no trabalho de Dalla Vecchia e col.³¹ Muitos sistemas estudados demonstraram boa atuação para interação com diversos substratos.

Shaw e col. avaliaram a eficiência da imobilização de lipases em diferentes suportes: PVC (poli-cloreto vinila), quitosana, quitina, agarose, sepharose e trisacril.³² Muitas publicações descrevem a investigação de outros suportes para imobilização de enzimas.

Ruckenstein e Wang. estudaram a imobilização da lipase de *Candida cylindracea* em poliestireno divinilbenzeno como suporte. O material poroso foi preparado pela co-polimerização, através de ligações cruzadas do estireno com divinilbenzeno, e o efeito da razão entre as proporções divinilbenzeno/estireno foi estudado. Este parâmetro determina a ligação cruzada e conseqüentemente a difusão do substrato e produtos através do biocatalisador.³³ Os autores verificaram que o aumento dessa razão leva a um aumento da área superficial no número de poros pequenos, mas neste caso a adsorção da lipase é pequena devido o tamanho do poro ser inacessível para a enzima.

A cinza de casca de arroz foi usada para imobilização da lipase de *Candida rugosa*, mostrando boa estabilidade térmica, apesar de que neste suporte sua atividade ter sido apenas 30% durante o processo.^{21, 33}

1.4. Imobilização em Gel de Pectina Cítrica

O estudo desenvolvido neste trabalho trata-se da imobilização por aprisionamento, de lipases em gel de pectina. Portanto, descreve-se em seguida alguns aspectos estruturais deste gel, evidenciando as principais características do suporte.

As substâncias pécticas encontram-se difundidas na natureza, fazendo parte dos tecidos das plantas, juntamente com outros componentes como o amido, celulose e lignina. Estas substâncias são classificadas em três grupos:³⁰

- protopectinas;
- ácidos pectínicos ou pectina;
- ácidos pécticos.

As protopectinas são insolúveis em água e, por hidrólise, originam os ácidos pectínicos ou pectina. Sua maior concentração é observada nos tecidos vegetais no período de crescimento e, portanto são as substâncias pécticas do fruto verde. Já os ácidos pécticos são compostos de ácido poligalacturônico sem metilação. São produzidos durante a supermaturação dos frutos e não apresentam capacidade de formar gel.^{34,35}

Quimicamente, a pectina é um heteropolissacarídeo que apresenta reconhecida capacidade de formar géis na presença de cátions bivalentes (Mg^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} , Mg^{+2}), e com Na^+ e K^+ não há formação de gel.³⁶

É constituída de cadeias lineares de ácido galacturônico, com os grupos carboxílicos parcialmente esterificados com o álcool metílico. A ligação entre as unidades de ácido galacturônico são do tipo α 1-4, sendo que o tamanho da cadeia é variável podendo incluir desde algumas unidades a várias centenas de ácido galacturônico, com um peso molecular que varia de 1.000 a 100.000.³⁶

A molécula da pectina pode ser ilustrada como uma cadeia de ácido poligalacturônico, com grau variável de grupos carboxilas metilados não mostrados. (**Figura 11**).³⁶

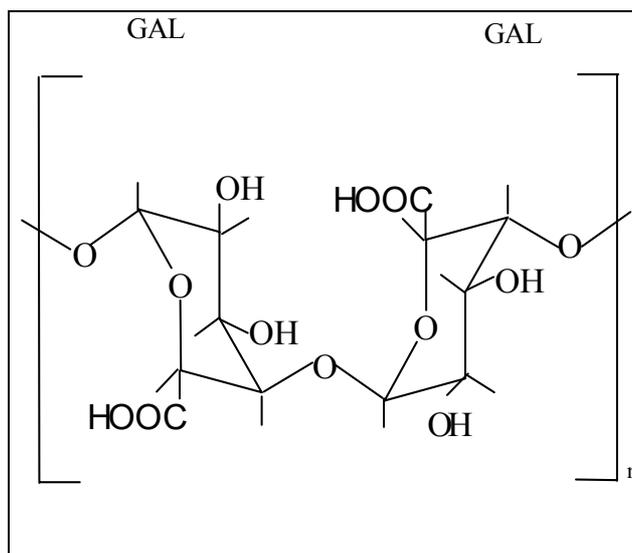


Figura 11. Representação da estrutura da pectina.

A pectina é solúvel em água, tem como funções espessar, estabilizar e especialmente, gelificar substâncias. A formação de gel é a principal propriedade da pectina, e dependente essencialmente das características do meio (pH, teor de sólidos solúveis, conteúdo de cálcio) e do tipo de pectina usada.^{34,36} A pectina com alto grau de metilação (ATM) contém micelas altamente hidratadas e com cargas negativas devidas aos grupos $[-COO^-]$. Para a passagem de sol a gel, deve-se efetuar a aproximação das micelas pela eliminação das suas cargas, diminuindo o pH até 2,8 – 3,5 e retirando parcialmente a água de hidratação. Por resfriamento forma-se o gel que é termoreversível.

O mecanismo de interação do cálcio na formação do gel está diretamente relacionado com a estrutura da pectina. Quando a proporção de grupos carboxilas metilados da pectina é reduzida é chamada de pectina com baixo teor de metoxilação (BTM) e, portanto a proporção de grupos $[-COO^-]$

disponíveis é elevada, as ligações que se estabelecem entre as moléculas pecticas são iônicas e asseguradas por cátions bivalentes.^{32,34} Estas ligações levam ao estabelecimento de uma rede tridimensional com boas propriedades mecânicas (**Figura 12**).

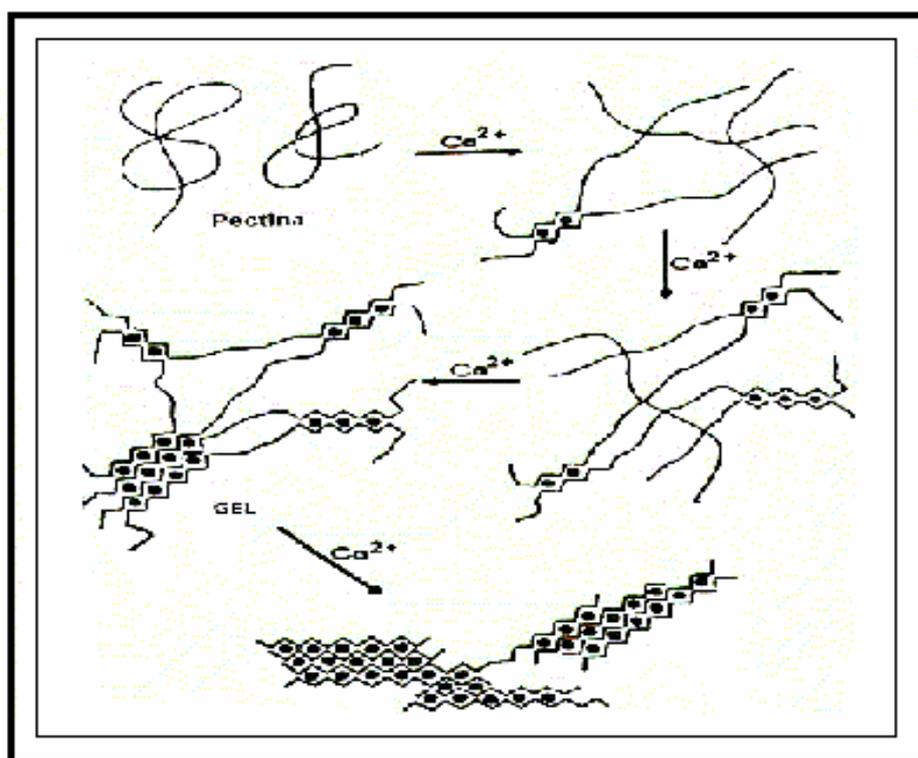


Figura 12. Estrutura da rede tridimensional da gelificação da pectina.³⁷

O gel de pectina também tem sido utilizado para imobilizar microrganismos.

A **Tabela 4**, mostra alguns trabalhos que utilizaram a pectina como suporte de alguns microrganismos.

Tabela 4. Trabalhos utilizando pectina como suporte para imobilização de microrganismos.

Biocatalisador	Objetivo	Referências
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de etanol	38
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Produção de hidrogênio molecular	39
<i>Lactobacillus sp. e Streptococcus thermophilus</i>	Produção de lactato de sódio	40
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Determinação das propriedades físicas do suporte	41
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Produção de lactose	42
<i>Amiloglicosidase</i>	Hidrólise da maltose	43

O uso de sistemas imobilizados para produção de álcool por fermentação, tem recebido considerável atenção nos últimos 15 anos. Em muitas áreas, enzimas ou células imobilizadas tem aplicações com sucesso, por exemplo na biotecnologia de alimentos como os fermentados na indústria de vinho, laticínios, produção de álcool, antibióticos, ácidos orgânicos e amino ácidos. Portanto, a implantação de sistemas de imobilização é uma ferramenta excelente para os processos biotecnológicos.

2. JUSTIFICATIVA

A imobilização de enzimas em diferentes suportes é uma das técnicas mais importantes que vem sendo utilizada na aplicação de catálise enzimática, para reações sintéticas em solventes orgânicos. A exploração de suportes que ofereçam vantagens como a preservação da atividade catalítica e seletividade, reutilização do biocatalisador e fácil separação do meio reacional vêm sendo atualmente objeto de estudo para aplicação de enzimas em meio orgânico.

Entre os processos químicos de maior interesse industrial estão as reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente.

Um grande número de trabalhos nesta área pode ser encontrado na literatura especializada, tendo em vista o interesse científico demonstrado por diversos grupos de pesquisa, no sentido de elucidar as propriedades e o comportamento de enzimas em meios não aquosos. Conseqüentemente, o número de rotas de síntese que incorporam um passo enzimático torna-se cada vez maior.

Um suporte para imobilização de enzimas e microrganismos que começou a ser explorado mais recentemente, é o gel de pectina. O gel de pectina pode ser mais uma alternativa útil para os químicos sintéticos.

Portanto, neste trabalho, e em contribuição aos já citados em literatura foi estudada a formação do gel de pectina sob diversas condições, e o seu uso como suporte para lipases de diversas procedências, bem como a sua aplicação na síntese de esteres alquílicos alifáticos em meio orgânico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Utilizar o gel de pectina como suporte para imobilização de lipases com aplicações na síntese de ésteres, em meio orgânico.

3.2. Objetivos Específicos

- Preparar o gel de pectina e avaliar a influência da concentração de cloreto de cálcio, na preparação, obtenção e estabilidade .
- Avaliar a estabilidade do gel com diversas lipases.
- Avaliar a estabilidade do gel frente aos seguintes solventes orgânicos: acetona, acetonitrila, 1,4 dioxano, acetato de etila, éter etílico, clorofórmio, hexano e diclorometano, bem como os seguintes substratos; etanol, butanol, pentanol, octanol e os ácidos hexanóico, decanóico e ácido dodecanóico (láurico) .
- Imobilizar quantidades variáveis de lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, Pâncreas do porco e *Pseudomonas cepacia*; Lipozyme, Palatase M, e Lipolase no gel de pectina com maior estabilidade, e verificar a eficiência e estabilidade em reações de esterificação em meio orgânico com os substratos citados no ítem anterior;
- Avaliar a influência do tempo, quantidade de lipase e concentração dos reagentes na obtenção do laurato de n-pentila
- Estudar a possibilidade de reutilização do suporte;

4. Parte Experimental

4.1. Materiais e Métodos

As enzimas utilizadas no desenvolvimento do trabalho com suas atividades específicas e procedências, estão relacionados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Enzimas utilizadas no trabalho.

Lipases	Atividades Específicas ^(a)	Procedências
<i>Rhizopus oryzae</i> (F-AP15)	150 U/mg	Amano Pharmaceutical Co
<i>Candida rugosa</i> (CRL)	30 U/mg	
<i>Aspergillus niger</i> (ANL)	120 U/mg	
<i>Pseudomonas cepacia</i> (PCL)	30 U/mg	
Pâncreas do porco (PPL)	135 U/mg	
<i>Mucor javanicus</i> (MJL)	10 U/mg	
<i>Candida rugosa</i> (CRL)	746 U/mg	Sigma Chemical Co
Lipolase	100.000 u/mg	Novozymes
Palatase M	100 U/mg	
Lipozyme RM IM	5-6 Baun/g	

(a) Atividade catalítica por grama de sólido A atividade catalítica, obtida pelos fornecedores das lipases de procedência da Amano, é definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto (u/g). Para a Lipolase a unidade de atividade catalítica obtida pelo fornecedor (Novozymes), é a mesma utilizada pelas lipases acima citadas. Para a Lipozyme é baseada em experimento de acidólise, e para a Palatase M, LU é a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido butírico por minuto a partir de tributina,

Os álcoois pentanol-1, butanol-1, octanol-1 e octanol-2; e os ácidos hexanóico, decanóico e laúrico, bem como cloreto de sódio e pectina cítrica, foram de procedência da Vetec . Os solventes orgânicos acetona, acetonitrila, 1,4 dioxano, acetato de etila, éter etílico, clorofórmio, hexano e diclorometano também foram de procedência da Vetec.

A sílica gel 60 para cromatografia em coluna (70 –230 mesh) foi de procedência da Merck, e as vidrarias da Pyrex.

O pHmetro utilizado foi da Micronal B-374, e as reações foram realizadas em uma incubadora termostaticada com agitação orbital modelo TE-420 da Tecnal.

4.2. Caracterização dos Compostos

Os compostos foram analisados e caracterizados por técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV), e ressonância magnética de hidrogênio (RMN ^1H), UV e por cromatografia de camada delgada (ccd) durante o decorrer da reação. Utilizou-se sílica gel(60HF 254 da Merck) e uma mistura de n-hexano/acetato de etila (15:1), como eluente. Os espectros de infravermelho foram feitos utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo FT-IR 16PC. Os espectros de RMN - ^1H foram feitos em um espectrômetro Bruker AC 200 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e CDCl_3 como solvente.

4.3. Preparação e Imobilização de Lipases em Gel de Pectina

Géis com quantidades de 0,6g - 1,0g de pectina foram preparados, usando solução tampão de fosfato de sódio pH 7,2 (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 0,1M) e soluções de cloreto de cálcio com concentrações de 0,2; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 M.

O estudo da variação na concentração de cloreto de cálcio foi necessário para investigar a influência deste íon na preparação, obtenção e estabilidade do gel para posteriormente ser usado como suporte para imobilização de lipases.

A preparação do gel de pectina foi realizada em um béquer de 50 mL, onde foram adicionados 0,8 g de pectina cítrica e 9,0 mL de solução tampão de fosfato de sódio, e aquecida a uma temperatura de aproximadamente 100°C. A mistura foi agitada rigorosa e manualmente, e deixada esfriar a temperatura ambiente (25°C). A seguir, adicionou-se ao gel 20-100 mg de lipases dissolvidas em 1,0 mL de água destilada.

A solução viscosa de pectina e enzima foi adicionada a uma solução de cloreto de cálcio para obtenção de um gel mais rígido. O gel foi separado da solução de cloreto de cálcio, cortado e armazenado em hexano. (**Figura 13**).

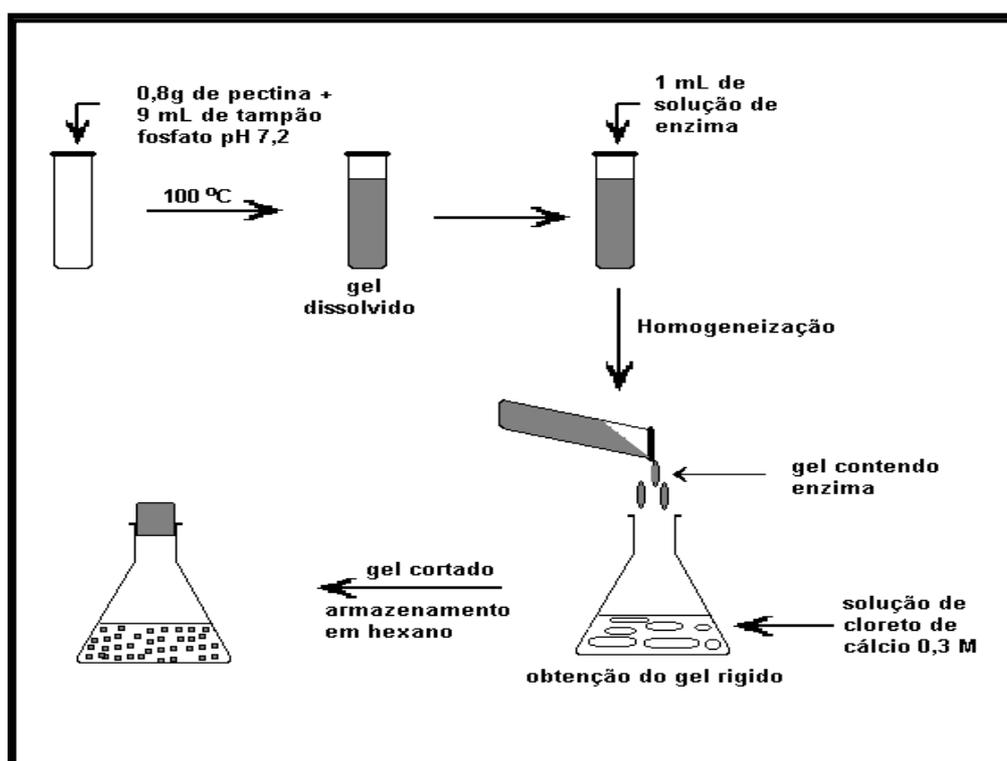


Figura 13. Preparação do gel de pectina.

4.4. Preparação do Meio Reacional

Os géis contendo as lipases imobilizadas, anteriormente cortados, foram removidos para um erlenmeyer contendo 25 mL de hexano e quantidades conhecidas de ácido e álcool, que serão especificadas no decorrer dos resultados e discussões. As reações de esterificação foram realizadas em uma incubadora termostaticada com agitação orbital por um período de 5 dias a 25°C.

As reações foram acompanhadas em cromatografia de camada delgada (ccd) utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (15:1).

O meio reacional foi separado do gel e o solvente evaporado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (70 – 230 mesh) e por cromatografia em sistema à vácuo adaptado, utilizando sílica para cromatografia em camada delgada. (**Figura 14**).

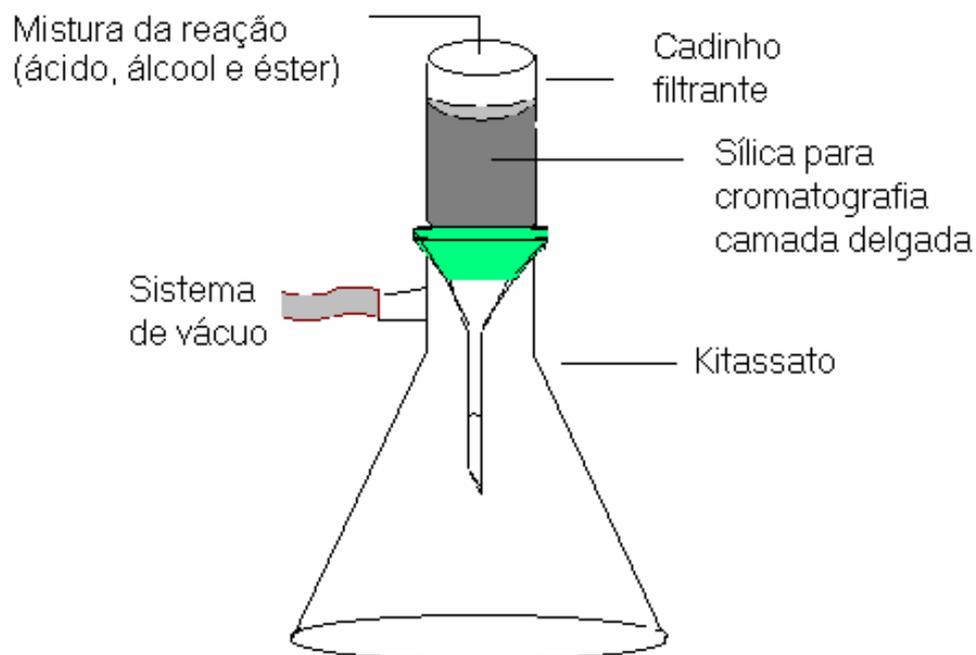


Figura 14 – Adaptação da Cromatografia de Sistema a Vácuo.

4.5. Influência de Diferentes Lipases, Álcoois e Ácidos, Tempo e Concentração dos Reagentes na Reação de Esterificação

Estes experimentos foram realizados utilizando quantidades variáveis de lipases de diversas procedências imobilizadas em 10g de gel de pectina. Os substratos (álcool e ácido) foram inicialmente usados em quantidades equimolares (0,01mol). Os substratos e a lipase imobilizada em gel de pectina foram adicionados em um erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de hexano a 25°C.

As reações controle, isto é sem enzima imobilizada, e as com as lipases imobilizadas foram acompanhadas por ccd e o rendimento dos ésteres quantificados por RMN - ^1H . A percentagem de conversão foi calculada

por RMN - ^1H , comparando a integração do triplete em 3,2ppm correspondendo ao $-\text{CH}_2$ do álcool com a do triplete em 4,1ppm correspondendo ao $-\text{CH}_2$ do éster obtido como produto.

Na ausência do biocatalisador, não houve a formação de produto (éster) nas mesmas condições experimentais citadas no decorrer do trabalho.

Os detalhes de cada experimento serão apresentados no decorrer dos resultados e discussão.

4.6. Reutilização do Suporte de Gel de Pectina

Para avaliar a possível reutilização do gel de pectina, foi estudada a reação do ácido láurico e o pentanol-1, catalisada pela lipase de *Candida rugosa*. Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 25 mL de hexano, e quantidades equimolares de pentanol-1 e ácido láurico (0,01M), a 25°C por 5 dias.

Após este período a reação foi interrompida, separando os reagentes e o produto. O gel foi lavado com o solvente, e a reação repetida por 5 vezes. Em cada experimento foi determinado, o rendimento do laurato de n-pentila por RMN - ^1H .

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O trabalho utilizando o gel de pectina como suporte para imobilização de lipases, foi realizado dando ênfase inicialmente na sua preparação e estabilidade em meio orgânico, avaliando assim as possíveis variáveis que podem afetar a estrutura macroscópica. Posteriormente, este sistema foi utilizado para a preparação de ésteres em meio orgânico.

Os resultados serão apresentados e discutidos na seguinte seqüência:

- efeito da concentração de pectina cítrica e cloreto de cálcio utilizados na preparação do gel;
- estabilidade do gel de pectina em diferentes solventes orgânicos, ácidos e álcoois alifáticos;
- avaliação da estabilidade do gel de pectina com as diferentes lipases imobilizadas;
- aplicação do gel de pectina contendo diferentes lipases imobilizadas na síntese de ésteres;
- efeito da concentração da lipase de *Candida rugosa* (CRL) imobilizada em gel de pectina na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol;
- estudos de variação da concentração de ácido láurico e pentanol-1 na formação de laurato de n-pentila;
- influência do tempo no rendimento do laurato de n-pentila;
- influência da cadeia hidrocarbônica dos substratos (álcool e ácido) nas reações de esterificação;
- reutilização do gel de pectina;
- caracterização dos produtos.

5.1 Efeito da Concentração de Pectina Cítrica e Cloreto de Cálcio na Preparação do Gel

A consistência do gel de pectina está relacionada com a interação de cloreto de cálcio. Com base nestas informações, foram realizados estudos para verificar qual é a melhor concentração de cloreto de cálcio e pectina cítrica que deverão ser usados na formação de um gel rígido e que possa ser utilizado na imobilização de lipases com aplicação em meio orgânico.

Em um primeiro experimento, variou-se a quantidade de pectina de 0,6 - 1,0 g, fixando a concentração de cloreto de cálcio em 0,3 M em 9 mL de solução tampão de fosfato de sódio, pH 7,2. O uso de tampão fosfato, bem como o volume da solução usada foram baseados nos trabalhos com gel de ágar e no pH ótimo para a atividade catalítica de lipases. O valor da concentração de íons cálcio está de acordo com o trabalho de Tavares²⁶.

As soluções gelatinosas de pectina com as quantidades citadas acima, foram adicionadas nas soluções de cloreto de cálcio 0,3 M previamente preparadas, e deixadas por um período de 15 minutos para que os íons cálcio participem da formação do gel. Após esse tempo, os géis formados foram separados das soluções de cloreto de cálcio por filtração simples.

Tavares utilizou 0,1g/mL de pectina para 0,3 M de CaCl_2 na preparação do gel de pectina para imobilização de leveduras, sendo que o gel formado foi enrijecido, após 24hs em contato com a solução salina. Este tempo é bem maior do utilizado neste trabalho (15 minutos).²⁶

Postula-se que deve haver uma concentração ótima de pectina cítrica para a formação de um gel resistente e de boa difusibilidade dos substratos do meio reacional, uma vez que a idéia é reter a enzima no meio aquoso adequado.²⁶

Nawawi e col. mostraram que a estabilidade e rigidez do gel está relacionada diretamente com a concentração pectina e de CaCl_2 . É provável que existam mais grupos carboxílicos livres na pectina para os íons cálcio ligarem-se, agrupando assim as cadeias poliméricas e formando um gel rígido.⁴⁴

Pela consistência observada, o melhor gel foi formado com com 0,8 g de pectina cítrica e 9,0 mL de solução tampão de fosfato de sódio e 0,3M de CaCl_2 . Com quantidades inferiores e superiores a 0,8 g de pectina, o gel não apresentou boa consistência macroscópica.

A seguir, foram realizados estudos para verificar a melhor concentração de cloreto de cálcio, considerando que a concentração de 0,3 M foi usada baseando-se em trabalhos anteriores. Para efeito de padronização do procedimento experimental, foi estabelecido a concentração de pectina em 0,8 g em 9,0 mL de solução tampão fosfato de sódio. As concentrações de cloreto de cálcio utilizadas foram de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 M.

Este estudo comprovou que a consistência do gel deixado por 15 minutos em contato com solução de concentração de cloreto de cálcio 0,3 M, apresentou aspecto macroscópico mais rígido quando comparado aos formados com as outras concentrações. Géis obtidos com concentração abaixo de 0,3M apresentaram-se muito maleáveis, enquanto que acima deste valor

ficaram muito rígidos. Fica evidente que a textura de gel é dependente da concentração de íons cálcio em pH 7,2.

Nawawi e col . também demonstraram que a textura do gel não é dependente da concentração de íons cálcio a pH 3,0, e que com o aumento do pH é possível obter um gel com textura e propriedades desejáveis para imobilização de biocatalisadores. ⁴⁴

A consistência e estabilidade do gel é um fator importante, pois provavelmente o processo reacional é controlado por difusão, e um gel muito rígido provocaria um aumento na barreira difusional o que afetaria o rendimento das reações. ⁴⁸

O gel de pectina de melhor consistência (0,8g pectina / 9,0 mL sol. tampão fosfato e concentração CaCl_2 0,3M) foi utilizado nos experimentos posteriores.

5.2. Estabilidade do Gel de Pectina em Diferentes Solventes Orgânicos, Ácidos e Álcoois Alifáticos

Após obter as melhores condições experimentais para a obtenção de um gel rígido, estes foram testados quanto a estabilidade com solventes, álcoois e ácidos orgânicos de diferentes polaridades. Postula-se que a lipase estará em contato com o meio aquoso tamponado na rede tridimensional do gel e, que durante a reação reagentes e produto deverão difundir-se do solvente para o gel e vice-versa.

Este estudo é necessário para poder prever quais serão os solventes e substratos que não destruirão o gel. Deve-se considerar que o gel é formado

por um polímero de pectina reticulado pelos íons de cálcio e estabilizado por moléculas de água.³⁵

Os resultados obtidos podem estar relacionados com parâmetros que medem a polaridade dos solventes tais como constante dielétrica (ϵ) e coeficiente de Partição, $\log P$.

Solvente polares como a água solvatam bem os íons. A constante dielétrica mede a capacidade do solvente em atuar como isolante de carga elétrica. Solventes com baixa constante dielétrica são considerados apolares, e solventes com constante dielétrica elevada são polares.⁴⁵

O $\log P$ é definido como o logaritmo do coeficiente de partição de um sistema bifásico padrão. Octanol-1 / água, e foi introduzido como uma medida quantitativa da polaridade do solvente. Quanto maior o $\log P$, mais apolar é o solvente.⁴⁷

Nestes testes, o gel foi colocado em contato com diferentes solventes orgânicos, ácidos e álcoois por um período de até cinco dias a temperatura de 25°C. Após esse tempo, a estabilidade macroscópica do gel foi avaliada visualmente. Os resultados estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Estabilidade do gel pectina em diferentes solventes orgânicos, ácidos e álcoois

Solventes Orgânicos	Coefficiente de part. (Log P)	Constante Dielétrica	Aparência Macroscópica Gel ^(a)
1,4 Dioxano	-1,10		Destruiu o gel
Acetonitrila	-0,33	37,50	Destruiu o gel
Acetona	-0,23	20,70	Destruiu o gel
Acetato de etila	0,68		Boa
Éter etílico	0,85		Boa
Diclorometano	0,93	9,08	Boa
Clorofórmio	2,00	2,24	Boa
Hexano	3,50	1,84	Boa
Álcoois			
Etanol	-0,24		Boa
Butanol	0,80		Boa
Pentanol	1,30		Boa
Octanol	2,90		Boa
Ácidos			
Ácido Hexanóico ^(b)	1,90		Boa
Ácido Decanóico ^(b)	-		Boa
Ácido Láurico ^(b)	4,95		Boa

(a) tempo: 5 dias; (b) 0,02 mg de ácidos foram dissolvidos em 25mL de hexano.

Os resultados da Tabela 6 mostram que solventes polares com log P menores e constante dielétrica altas, como 1,4- dioxano, acetonitrila e acetona, provocaram alterações na estabilidade do gel levando a sua destruição.

O hexano, com alto log P é um dos solventes mais apolar dos solventes testados é dos mais utilizados. Neste solvente, o gel manteve suas características físico-químicas aparentemente íntegras.

Os ácidos e os álcoois testados não destruíram o gel incluindo os compostos que apresentam valores menores de log P (-0,24). No caso do etanol, esse resultado não pode ser explicado somente pelo log de P, pois provavelmente este solvente deve estar competindo com as moléculas de água para manter a estrutura do gel.⁴⁷

Estes resultados são coerentes com trabalhos da literatura, mostrando que os solventes apolares são os mais adequados para a biocatálise.^{47, 51}

5.3. Avaliação da Estabilidade do Gel de Pectina com Diferentes Lipases

Após ter sido verificada a estabilidade do gel nos diversos solventes orgânicos, ácidos e álcoois, foi observado o comportamento de lipases de diversas procedências. Os resultados são apresentados na **Tabela 7**

Tabela 7– Avaliação da estabilidade do gel com diferentes lipases. ^(a)

Lipases	Aparência Macroscópica do gel
<i>Rhizopus oryzae</i>	Destruiu
<i>Aspergillus niger</i>	Destruiu
Lipozyme IM	Destruiu
Palatase M	Destruiu
<i>Lipolase</i>	Parcialmente Destruída ^(b)
<i>Mucor javanicus</i>	Parcialmente Destruída
<i>Candida rugosa</i>	Boa ^c
Pâncreas de porco	Boa
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Boa

(a) tempo: 5 dias; (b) após 3 dias ;hexano (25 mL); 100 mg de enzima 0,8g/ de gel. 25°C
(c) CRL da Sigma e Amano

Os resultados obtidos mostraram que após cinco dias, os géis contendo as lipases de *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, Lipozyme IM , Palatase M e Lipolase, não permaneceram estáveis e foram total ou parcialmente destruídos.

A causa provável desta destruição é o fato dessas enzimas possuírem resíduos de impurezas que provavelmente provocam a desmetoxilação das pectinas muito rapidamente mesmo a baixas temperaturas, degradando a

cadeia de ácidos galacturônicos, com formação de produtos finais de viscosidade muito baixas.^{46, 50}

Outro fator importante está nas preparações comerciais das enzimas, sendo que a pureza depende das cepas usadas, meio de cultura e fatores ambientais.^{17, 50}

Na pectina dois terços dos grupos carboxílicos estão esterificados. O número e a distribuição dos grupos esterificados ao longo da molécula polimérica tem papel importante na determinação do grau de gelificação.³⁴⁻³⁶

As substâncias pécticas são de estruturas bastante complexas e a sua degradação ocorre na presença de enzimas pécticas ou pectinolíticas. As enzimas com propriedades de pectina esterase, removem resíduos metoxílicos de pectina com liberação de metanol. As enzimas despolimerizantes atuam em ligações glicosídicas. Algumas hidrolases (esterases) podem também atuar na despolimerização da pectina. **(Figura 15)**.⁴⁶

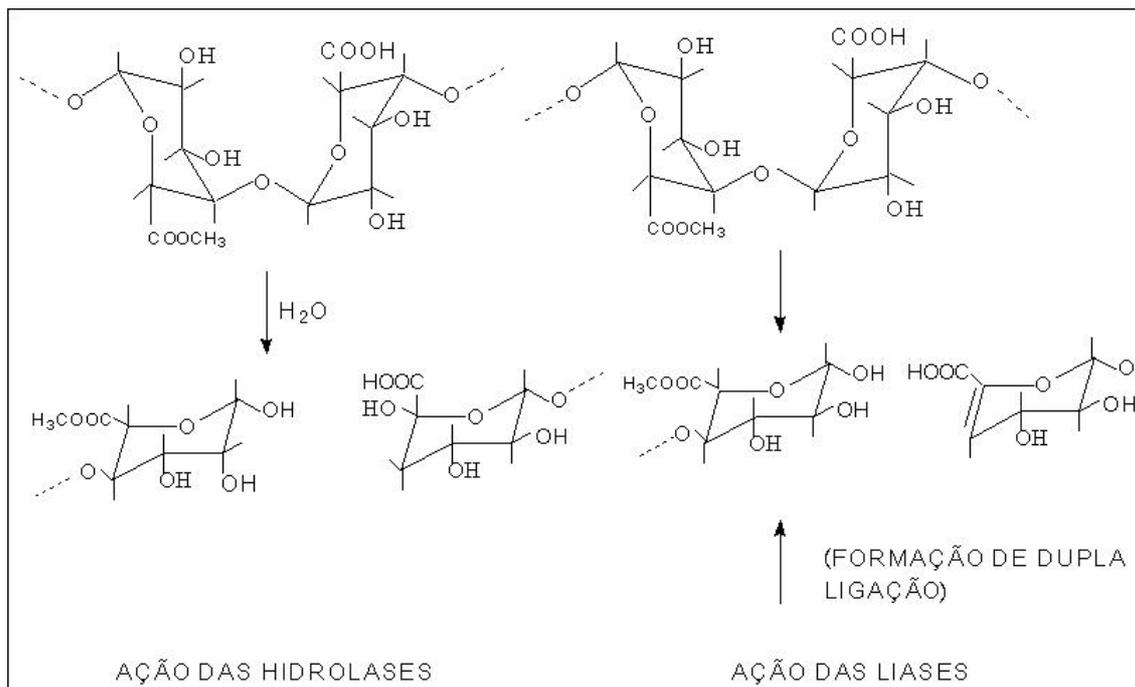


Figura15. Modo de ação das enzimas depolimerizantes na pectina.⁴⁶

5.4. Aplicação do Gel de Pectina Contendo Diferentes Lipases Imobilizadas na Síntese de Ésteres

Após ter sido realizado o teste para verificar qual é o gel mais estável para imobilizar as lipases, iniciou-se a sua aplicação na síntese de ésteres. Para isso, foram imobilizadas as lipases de *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor Javanicus* e *Lipolase* e aplicadas na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol. (**Figura 16**)

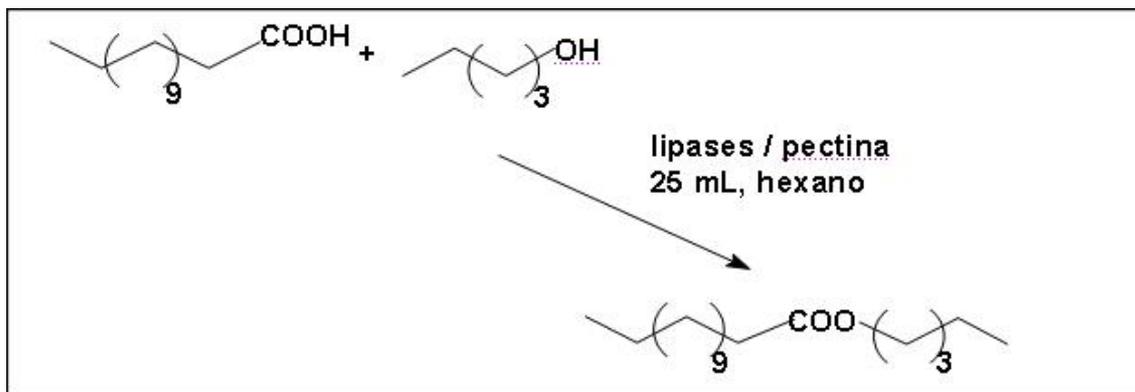


Figura 16. Reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol com lipases imobilizadas em gel de pectina.

As reações foram monitoradas durante 120 h por cromatografia em camada delgada (ccd) utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (15:1) como eluente. O valor de Rf do éster foi de 0,58,0,46; e 0,46 para os ésteres derivados dos ácidos láurico, hexanóico e decanóico. Após o período de 5 dias, o éster foi isolado e quantificado por RMN-¹H.

O melhor rendimento do éster foi observado utilizando a Lipolase, (96%), seguido da lipase de *Candida rugosa Sigma* (40%), de *Mucor javanicus* e de *Pseudomonas cepacea* (9%).

A Lipolase com atividade específica de 100.000 u/mg, é que formou o laurato de n-pentila com maior rendimento, demonstrando assim que a atividade específica da enzima é um fator importante na obtenção do produto. Apesar do laurato de n-pentila ter sido obtido com bom rendimento, o gel com a Lipolase foi parcialmente destruído após o terceiro dia de reação. A Lipolase, que é fornecida na forma líquida, pode conter substâncias que proporcionam a destruição do gel.⁵⁰

Trabalhos anteriores demonstraram que lipases imobilizadas em outros géis como o organo-gel e o de agar, também formaram os ésteres alquílicos incluindo o laurato de n-pentila com ótimos rendimentos (> 99%).^{24,29}

Assim, no desenvolvimento deste trabalho a lipase de *Candida rugosa* foi a escolhida para prosseguir com os experimentos. Mesmo ela tendo sua atividade específica inferior quando comparada com a Lipolase, o gel com esta lipase imobilizada apresentou maior estabilidade em hexano durante o processo (5 dias, 25°C).

5.5. Efeito da Concentração da Lipase de *Candida rugosa* na Reação de Esterificação do Ácido Láurico com n-pentanol.

A lipase de *Candida rugosa* (CRL), com diferentes atividades específicas e procedências (Amano, 30u/mg e Sigma,746u/mg) foi imobilizada no gel de pectina nas mesmas condições descritas anteriormente e aplicadas na reação de esterificação do ácido láurico com o n-pentanol, variando-se a concentração. Os resultados são mostrados na **Figura 17**.

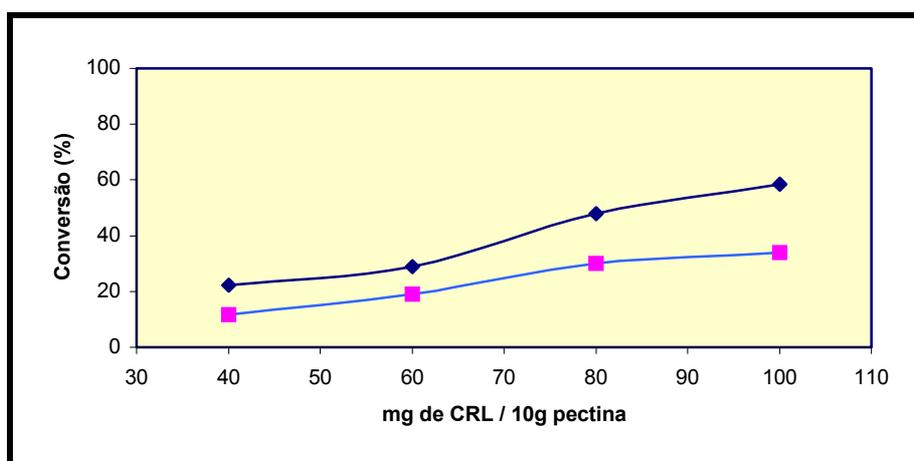


Figura 17. Efeito de concentração de lipases de *Candida rugosa* na obtenção de laurato de n-pentila, a 25°C. ◆ CRL/Sigma ■ CRL/ Amano

O aumento na concentração de enzima foi da ordem de 20 mg (40, 60, 80 e 100 mg) em cada experimento, porém o aumento do rendimento de laurato n-pentila não foi linear. Observou-se que os rendimentos dos ésteres aumentaram com a concentração de *CRL*, independente de sua procedência. Com ambas lipases estes valores não aumentaram substancialmente a partir 80 mg / 10g de gel.

Com a lipase da Sigma os rendimentos de éster foram um pouco superiores em relação aos da Amano. Este resultado pode estar relacionado com a atividade da lipase da Sigma (746u/mg) que é muito superior a da Amano (30u/mg).

5.6. Efeito da Concentração do Ácido Láurico e n-Pentanol

Este estudo foi realizado para verificar qual é a influência da variação da concentração dos substratos (razão molar 1:1) para a formação do laurato de n-pentila.

As seguintes quantidades de substratos foram usadas: 0,005, 0,01, 0,02 e 0,03 M de cada um dos reagentes, e 100 mg de *CRL*(Sigma) imobilizada em 10,0 g de gel de pectina e [CaCl_2] 0,3M. As reações foram realizadas a 25°C por 5 dias. Os resultados obtidos em termos de conversão em éster são apresentados na **Figura 18**.

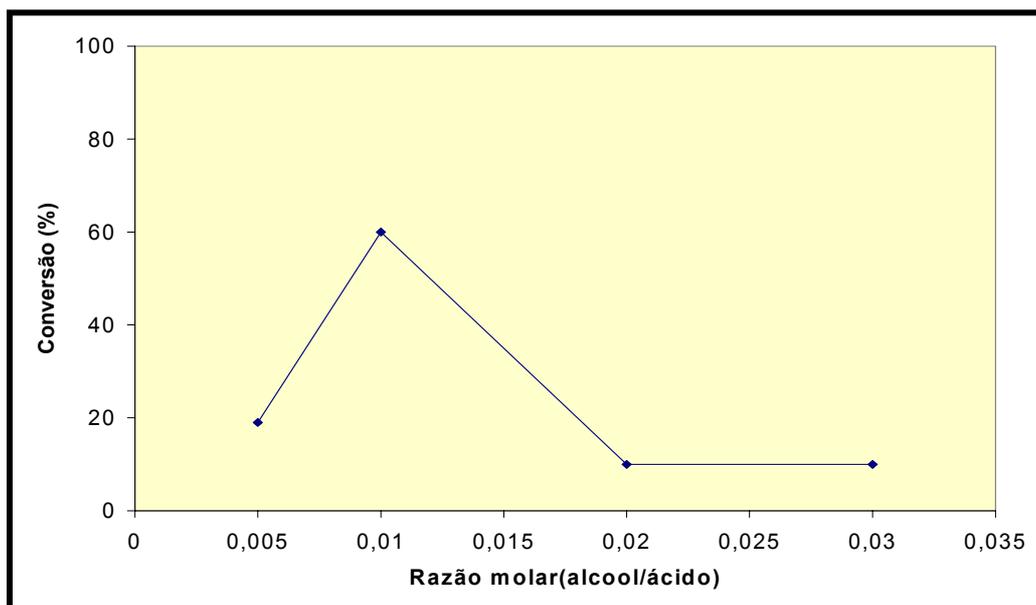


Figura 18. Conversão em laurato de n-pentila em função da concentração dos substratos [1:1] catalisada pela CRL(100mg) imobilizada em gel de pectina a 25°C.

Pela **Figura 18**, observa-se que com 0,01 M de pentanol-1 e de ácido láurico, a conversão em éster foi de 60%. A conversão diminuiu para 10% com 0,02 e 0,03M de reagentes e a partir deste valor permaneceu constante. Concentrações molares inferiores a 0,01M de substratos, também levaram a formação do produto com baixa conversão (< 20%).

Estes resultados podem estar associados ao fato de que os substratos polares podem se acumular no microambiente aquoso da enzima, e que o acúmulo da concentração pode causar a desnaturação da proteína diminuindo assim sua atividade. Resultados semelhantes foram obtidos por Krishna e col. na obtenção do acetato de iso-amila catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei*.⁵²

5.7. Influência do Tempo na Percentagem de Conversão do Laurato de n-Pentila

Neste estudo foi avaliado a influência do tempo na reação de esterificação do ácido láurico e 1-pentanol catalisada pela CRL(Sigma). Os resultados obtidos podem ser observados na **Figura 19**.

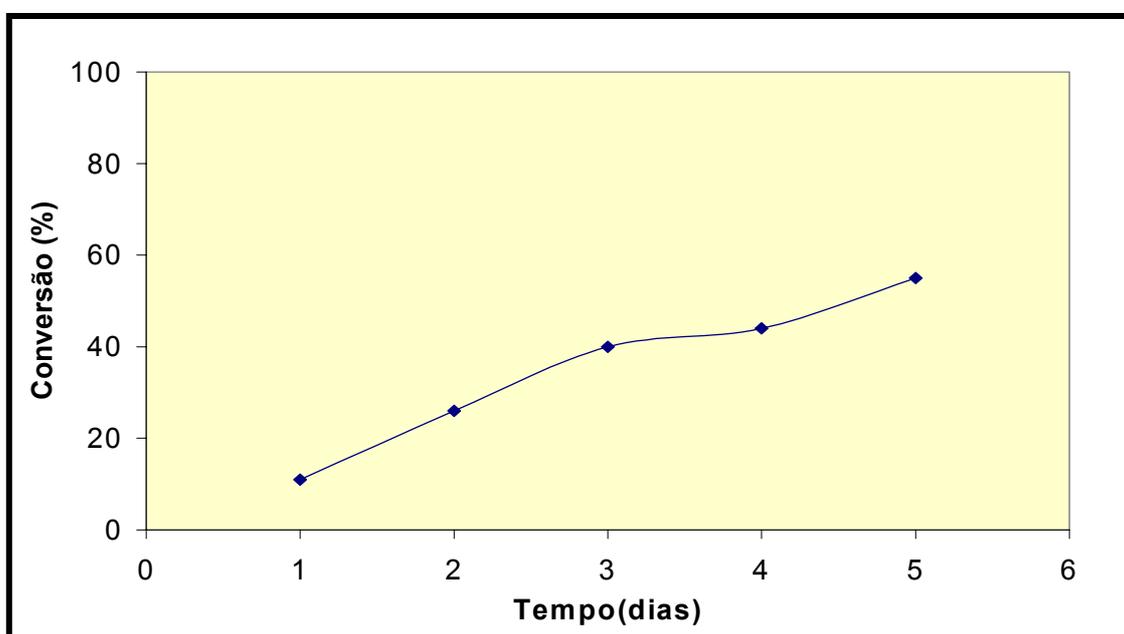


Figura 19. Influência do tempo na conversão em laurato de n-pentila, catalisada pela CRL [100mg/10g do gel] a 25°C, [substratos] = 0,01M

Observa-se, um aumento na conversão em éster no decorrer dos 5 dias, porém a taxa deste aumento não é constante, Provavelmente, se o tempo de reação for maior, deverá também ser observado uma percentagem de conversão maior em éster.

Uma outra maneira de melhorar o rendimento do produto, seria aumentar a temperatura. Porém, acima 30° C o gel de pectina torna-se muito maleável o

que dificultaria o isolamento do produto e, portanto estes experimentos não foram realizados.

Outra questão a ser avaliada é como a variação na estrutura dos substratos influencia no rendimento dos ésteres formados por este processo biocatalítico.

5.8 Influência da Cadeia Hidrocarbônica dos Substratos nas Reações de Esterificação

Este estudo teve como objetivo verificar a influência do tamanho da cadeia alquílica dos ácidos e álcoois na catálise pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada no gel de pectina.

Inicialmente avaliou-se a influência do tamanho da cadeia do ácido. Foram utilizados os ácidos hexanóico, decanóico e o láurico (dodecanóico) na reação de esterificação com o 1-pentanol. Os resultados podem ser observados na **Figura 20**.

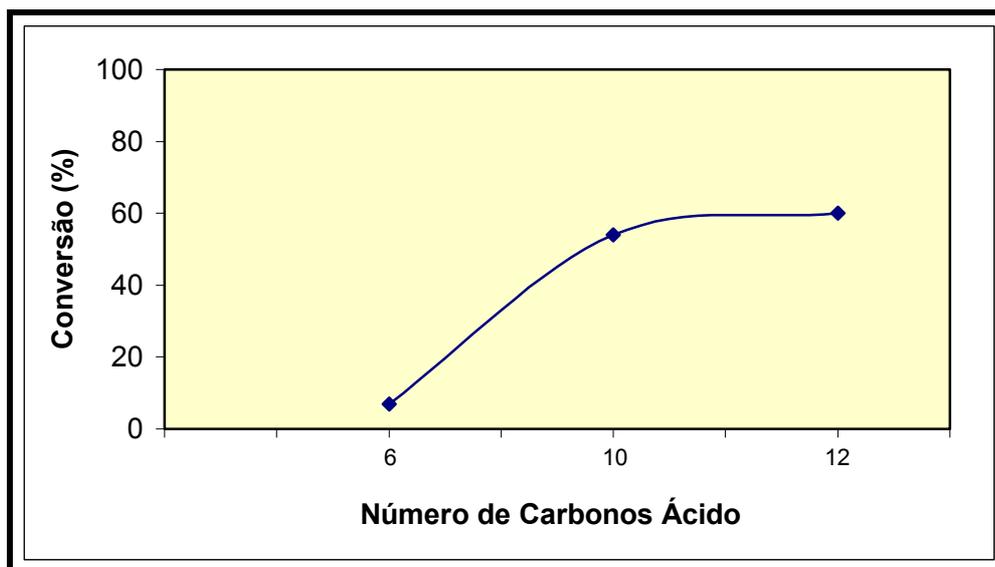


Figura 20. Conversão (%) em alcenoatos de pentila em função do número de carbonos na cadeia alquílica dos ácidos com pentanol-1. CRL 100mg/10g de gel, 25°C, 5 dias, [substratos] 0,01M.

Sabe-se que para ocorrer a catálise, a enzima forma inicialmente o complexo “enzima substrato” (ES), para depois formar os produtos. Estes resultados demonstram um favorecimento do ácido láurico na formação do complexo acil-enzima em relação aos ácidos hexanóicos e decanóicos. Nestas condições, a conversão em ester com ácido láurico foi de 60%, com o decanóico 54%, e com o hexanóico de apenas 7%.

Estudos feitos anteriormente, demonstraram que os substratos devem “difundir-se” pelo gel, onde se localiza a enzima e após a reação, os produtos devem retornar ao meio externo, ou seja, para fase orgânica.⁴⁸ O ácido láurico possui log de P superior a 4, indicando que não há perturbação na camada de água deixando o biocatalisador no seu estado ativo.⁴⁸

A influência da cadeia alquílica dos álcoois na obtenção de laurato n-alquílicas também foi avaliada para a reação catalisada pela lipase *Candida rugosa* (Sigma) imobilizada em gel de pectina. Os álcoois usados foram

butanol-1, pentanol-1, octanol-1 e decanol-1. Os resultados são apresentados na

Figura 21.

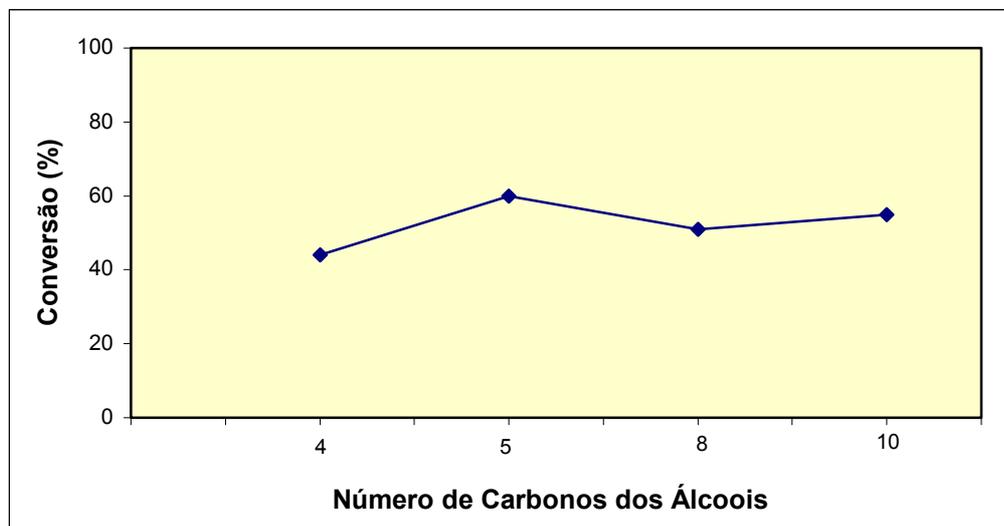


Figura 21. Conversão(%) em lauratos de alquila em função do número de carbono na cadeia alquímica do álcool. a 25°C por 5 dias. CRL 100mg/10g de gel 25°C, 5dias

Este estudo demonstrou que a maior conversão foi obtida na formação do laurato de n-pentila (60%). Os outros ésteres derivados do n-butanol, n-octanol, e n-decanol apresentaram conversões de 44, 51 e 55%, respectivamente não significando uma diferença substancial, sendo que foi observado um aumento na conversão utilizando álcool de cinco átomos de carbono, e este aumento pode ser atribuído a uma melhor interação deste substratos com o sítio ativo da enzima.⁴⁹

O efeito da pequena diminuição na conversão em produto causado pelo aumento da cadeia carbônica do álcool (acima de cinco átomos de carbono), pode ser atribuído à dificuldade de reconhecimento do substrato (álcool) pela enzima, ou seja os de cadeia carbônica maiores são estericamente mais impedidos e não se alojam eficientemente no sítio ativo da enzima para que possa ocorrer catálise.

5.9. Reutilização do Suporte de Gel de Pectina

O gel de pectina foi usado por 5 vezes em reações de esterificação do ácido láurico com pentanol-1 utilizando a lipase de *Candida rugosa*. Este procedimento teve como objetivo verificar a eficiência e estabilidade da enzima imobilizada neste gel, após sucessivas reutilizações. Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 22**.

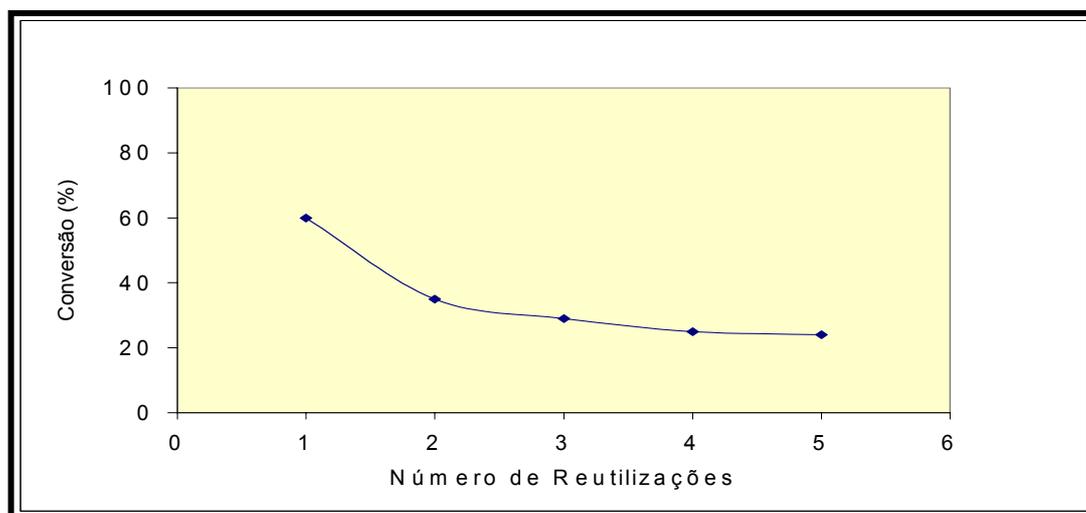


Figura 22. Conversão(%) em laurato de n- pentila em função do número de reutilizações do suporte, [substratos] = 0,01M; [CRL] =100mg / 10g gel; 25°C, 5 dias

Observa-se na **Figura 22**, que ocorreu uma queda brusca na conversão, indo de 60% para 35% após a primeira reutilização, e depois manteve-se praticamente constante sendo de 29%, 24%, 25% respectivamente após a quinta reutilização.

Após a terceira reutilização houve uma mudança na cor do gel, ficando opaco o que pode estar associada à modificação estrutural.³⁵ Este resultado pode também ser devido a dessorção de enzima do gel para o meio orgânico. Para comprovar esta hipótese, deve-se efetuar análises do solvente orgânico

que ficou em contato com o gel através da espectroscopia de UV (λ max $CRL= 266\text{nm}$).

5.10 . Géis Utilizados para a Imobilização de Lipases

A preparação do gel de pectina é fácil, não tóxico e estável em diversos solventes e substratos orgânicos. As reações de esterificações utilizando lipases imobilizadas em gel de ágar foram realizadas em 12 dias para obter éster alifáticos, enquanto que em organo-gel a reação foi feita em 2 dias.²⁸

Em gel de pectina as reações foram realizadas em 5 dias com conversões máximas de 60% com a CRL da Sigma.

A capacidade de reutilizar um catalisador imobilizado ou não, é um fator importante quando se considera a aplicação prática do método de síntese. O gel de pectina no qual as lipases foram imobilizadas mostrou ser um suporte importante para obtenção de produtos quando comparado com os outros citados na literatura.^{21,28}

Neste caso, também foi possível reutilizar o sistema, porém a partir da terceira reutilização as conversões em ésteres foram menores.

Na literatura, vários materiais poliméricos que formam géis foram utilizados para a imobilização de lipases e/ou outros biocatalisadores. Entre eles, cita-se o gel de ágar, agar-galactomanana, hidro-géis, organo-gel e quitosana.^{21,24,31}

Neste trabalho, foi usado o gel de pectina estabilizado por íons Ca^{+2} . É difícil fazer uma comparação direta entre este sistema com os descritos na literatura, pois cada suporte é formado por materiais diferenciados, e

apresentam características próprias de estabilidade e rigidez em relação a solventes, substratos orgânicos e a temperatura.

Sabe-se que através da imobilização de lipases em hidro-gel, gel de ágar-galactomanona, organo-gel, quitosana, gel de carragenana foi possível preparar vários ésteres alifáticos, como propanoato, butanoato, acetato de 2-metilbutila e outros, sendo estes compostos de grande aplicação industrial como flavorizantes ou aromatizantes na indústria alimentícia.^{29,53}

5.11 Caracterização dos Produtos

As análises espectroscópicas de IV e RMN de ^1H foram realizados para todos os produtos obtidos nas reações de esterificação.

A **Figura 23** mostra o espectro de IV para o laurato de n-pentila, obtidos na reação utilizando 100mg de enzima CRL/10g de gel.

São observadas as bandas características de estiramento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$); do éster em 1730 cm^{-1} , as de estiramento da ligação C-H dos carbonos alifáticos na região de $2980\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$; a de estiramento do grupo $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{OR}$ em 1200 cm^{-1} , e as de deformação das ligações C-H dos carbonos alifático na região de 1000 cm^{-1} .

A **Figura 24** mostra o espectro RMN ^1H para laurato de n-pentila. Observa-se em (a) 4,1ppm um triplete referente a 2H de CH_2OOC -; em (b) 2,3 ppm um triplete referente a 2H do grupo $\text{R}-\text{CH}_2-\text{COO}$ - (prótons vizinhos a carboxila); em (c) 1,0-1,5 ppm um multiplete referente a 24H dos grupos $-\text{CH}_2-$ da cadeia alquílica do éster, e em (d) 0,9 ppm um triplete referente aos 6H dos grupos CH_3 terminais.

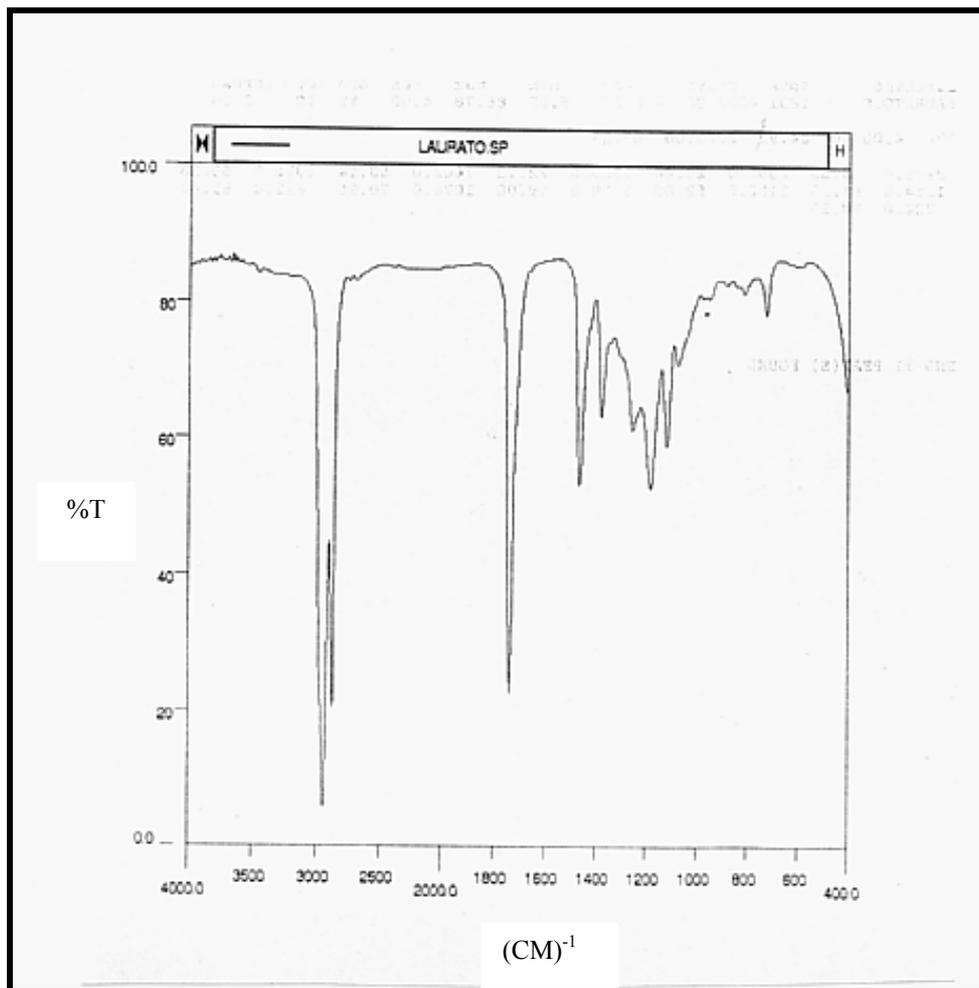


Figura 23. Espectro de IV para o laurato de n-pentila, em filme.

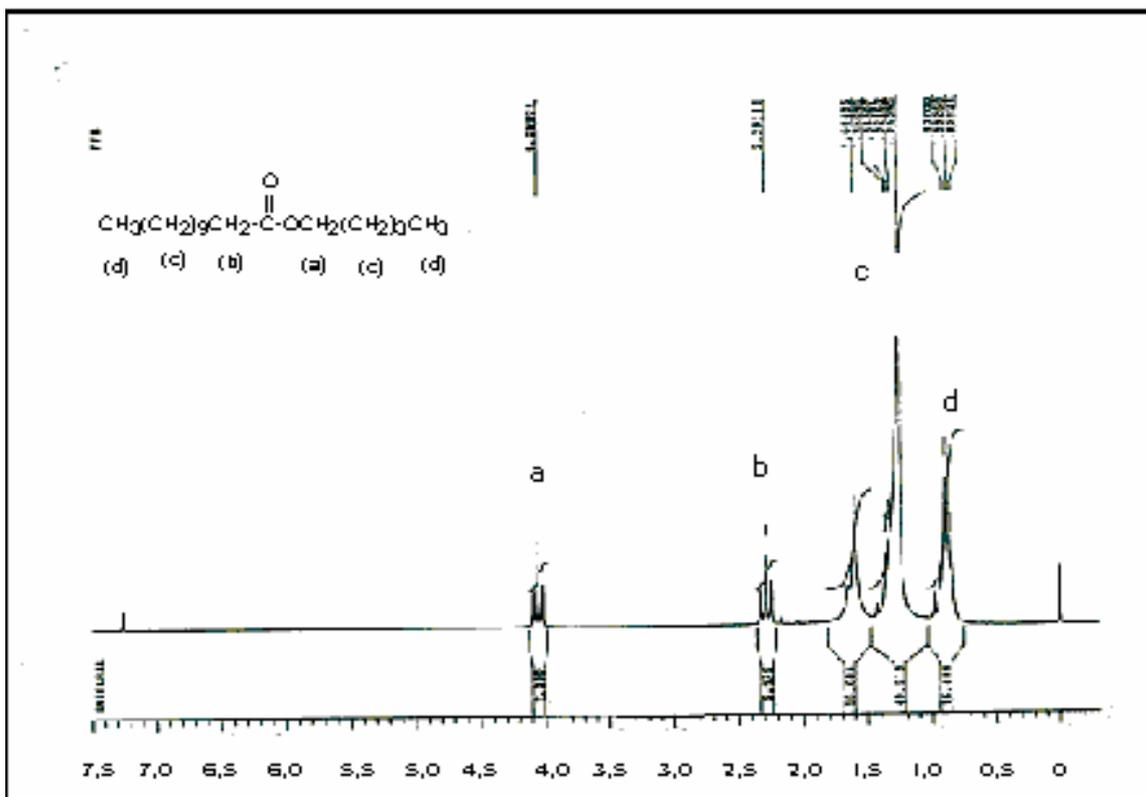


Figura 24 Espectro de RMN - ^1H do laurato de n-pentila, CDCl_3 (200 MHz)

Os demais ésteres, também foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de IV e RMN, e os dados são apresentados a seguir.

Laurato de n-butila; RMN de ^1H (δ ppm, CDCl_3 , TMS) 4,0 (t, 2H, CH_2OO), 2,2 (t, 2H, CH_2COO), 1,3-1,6 (m, 22H, CH_2), 0,9 (t, 6H, CH_3); IV (Filme) 1735 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{O}$, éster).

Laurato de n-pentila; RMN de ^1H (δ ppm, CDCl_3 , TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 2,3 (t, 2H, CH_2OO), 1,2 - 1,8 (m, 24H, CH_2), 0,8 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{O}$, éster).

Laurato de n-octila; RMN de ^1H (δ ppm, CDCl_3 , TMS) 4,1 (t, 2H, CH_2OOC), 1,2-1,7 (m, 30 H, CH_2), 0,9 (t, 6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{O}$, éster).

Laurato de n-decila ; RMN de ^1H (δ ppm, CDCl_3 , TMS) 4,1 (t,2H, CH_2OOC), 2,3 (t,2H, CH_2OOC), 1,2-1,8(m,34H, CH_2), 0,9 (t,6H, CH_3); IV (filme) 1736 cm^{-1} (estiramento C = O, éster).

Hexanoato de n- pentila; RMN de ^1H (δ ppm, CDCl_3 , TMS) 4,1 (t,2H, CH_2OOC), 2,3 (t,2H, CH_2OOC), 1,3 –1,8(m, 12H, CH_2), 0,9 (t,6H, CH_3); IV (filme) 1735 cm^{-1} (estiramento C = O, éster).

Decanoato de n-pentila; RMN de ^1H (δ ppm, CDCl_3 , TMS) 4,0 (t,2H, CH_2OOC), 2,2 (t,2H, CH_2COO), 1,2-1,7(m,30H, CH_2), 0,8 (t,6H, CH_3);IV (filme) 1736 cm^{-1} (estiramento C = O, éster).

6. CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados pode-se concluir que :

- Para a preparação do gel de pectina há uma relação direta com a concentração de cloreto de cálcio para se obter um gel com boas características macroscópicas para imobilização de lipases, sendo que o mais rígido foi obtido com 0,8g de pectina/9,0mL tampão fosfato de sódio e $[CaCl_2]$ 0,3M.
- O gel de pectina mostrou boa estabilidade em diversos solventes orgânicos, ácidos e álcoois de baixa polaridade. Substratos e/ou solventes mais hidrofílicos (por ex. acetona), destruíram o gel.
- A estabilidade do gel de pectina com diferentes lipases imobilizadas, depende da procedência das mesmas sendo que os mais estáveis foram com as lipases de *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas cepacea* e *Pancreática do porco*.
- A atividade específica da enzima é um fator determinante no rendimento do produto. A maior conversão em produto foi observada com a *Lipolase* sendo de 96%, seguido da lipase de *Candida rugosa* (40%), e de *Mucor javanicus* e *Pseudomonas cepacea* (9%).
- As conversões em laurato de n-pentila foram maiores utilizando a CRL da Sigma(60%) imobilizada neste gel.

- A melhor concentração dos substratos ácido láurico e n-pentanol para a obtenção do éster foi 0,01M. Concentrações inferiores e superiores a este valor formaram éster em menores conversões
- A conversão em laurato de n-pentila aumentou com o tempo de reação, o que é um resultado esperado.
- Foi observado a influência do tamanho da cadeia alquílica dos ácidos e álcoois na obtenção dos ésteres alquílicos. A maior conversão foi obtida para o laurato de n-pentila (60%).
- O gel de pectina pode ser reutilizado por cinco vezes, sendo que após a primeira reutilização o rendimento do éster foi de 35%. Após a terceira reutilização observou uma modificação na estrutura macroscópica do gel (tornou-se opaco).
- As análises espectroscópicas de infravermelho e RMN de ^1H confirmaram a obtenção dos ésteres.
- Finalmente, pode-se concluir, que os resultados apresentados neste trabalho indicam que a metodologia utilizada é mais uma alternativa viável para imobilização de lipases e obtenção de ésteres em condições brandas de reação.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.pasteur.fr> acessada em 07/09/2001.
2. FABER, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, **Springer- Verlag**, New York Inc., 1997.
3. MURRAY, R. K.; HARPER: Bioquímica, **ATHENEUS**. SP, cap.7 6° ed., 1990.
4. Nelson, D. L.; Cox M.M. Leningher; Principles of Biochemistry, **Worth Publishers**, cap.8, 2000.
5. VOET, D.; VOET.J.G; Biochemistry **Jonh Wiley & Sons Inc.**, New York, p.332, 1994.
6. STRYER, L. Bioquímica. 3 ed., **Guanabara Koogan S.A**, RJ 1992.
7. BERSTEIN, F. C.; KOETZLE,T. F.; WILLIAMS, G .J.; MEYER Jr, ; E. E.; BRICE, M. D.; ROGERS, J. R; KENNARD, O.; T. SHIMANOUSHI, Tasumi, M. **J. Mol. Biol.** v.112, p. 535-542, 1977. (www.rcsb.org/pdb/).
8. Swiss Protein Data Bank Viewer, (www.expasy.ch/spdbv/text/getpc.htm), acessada em 07/09/2001.
9. WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B.; Lipases: Their Struture, Biochemistry and Application, **Cambridge University Press**, p.139-180, 1994.
10. WONG, C.; WHITESIDES, M.; Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, **Pergamon**, v.12, cap. 1-2, p. 1-130, 1994.

11. CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A.; Fine chemicals by biotransformations using lipases, **Quím. Nova**, v.18, p.544, 1995.
12. ALTREUTER, D.H.; DORDICK, J. S.; CLARK, D. S.; Optimization of ion-paired lipase or non-aqueous media: acylation of doxorubicin based on surface models of fatty acid esterification, **Enzy. Microb. Technol.** v.31, p. 10-19, 2002.
13. YANG, F.; WEBER, W. T.; GAINER, L.; JOHN, C.G.; Synthesis of lovastatin with immobilized *Candida rugosa* lipase in organic solvents: effects of reaction conditions on initial rates. **Biotechnol. Bioeng.** v. 56, p.671-679 n. 6, 1997.
14. KOUL, S. T; S.C,PARSHAD ORAZI,G. N; Enantioselective hydrolysis of alkyl esters of substituted 1-phenyl ethanols using newly isolated strain of *Arthrobacter sp*: a comparative study with known commercial lipases. **Tetrahedron: Asymmetry** v. 9, p.3395 -3397, 1998.
15. CHAWLA, H. P.; ROY, S.; Biocatalysis in organic solvents: a process for multigram synthesis of 1,4: 3,6 -dianhydro-D-glucitol 2-acetate and its isomeric 5-acetate using immobilized lipase from *Pseudomonas sp*. **Enzy. Microb. Techn.** v.29, p. 490-493, 2002.
16. (<http://www.geocite.com.br/capesuniversal/cokkpit/1457>.), acessada em 10/11/2001.
17. Biotimes- Revista Bioindustrial Trimestral da Novozymes 2000-2002
www.novozymes.com
18. YEE, L. N.; AKOH, C. C.; PHILLIPS, R. S.; Lipase PS-catalyzed transesterification of citronellyl butyrate and geranyl caproate: effect of reaction parameters. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v.74, n.3, p.255-259 1997.

19. CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P.C.; PEREIRA, E. B.; Influence of substrate partition coefficient on the performance of lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate by alcoholysis. **J. Braz. Chem Eng.** v.17,n.4 p 860-865, 2000.
20. GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOLU, U.; The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system, **Process Biochem**, v.38, p. 379-386, 2002.
21. VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.; GRAILLE, M.; Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, **J.Mol. Catal. B: Enzym** v.9, p. 133-148, 2000.
22. KILINC, A.; ONAL S.; TELEFONÇU A.; Chemical attachment of porcine pancreatic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride. **Process Biochem** v.38, p.641-647, 2002.
23. NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.;MELEGARI, S.P.; Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces Cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio Orgânico. **Quim.Nova**.v.25,n.4 p.567-571, 2002.
24. JESUS, P.C.; SILVA, P.L.F.; JUAREZ, J. J.; NASCIMENTO, M.G.; Enantioselective esterification of 2-methylpentanoic acid catalysed via immobilized lipases in chrysotile and microemulsion-based gels. **Synth. Commun**.v, 28 n.15. p. 2893-2901. 1998.
25. NASCIMENTO, M. G.; QUEIROZ, N.; *Pseudomonas* sp. lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (*R,S*) - methyl mandelate. **Tetrahedron Lett.** v.43, p.5225-5227, 2002.

26. TAVARES, B. B.L.; "Fermentação alcoólica de material amiláceo por levedura amilolítica recombinante em reator com células imobilizadas". Tese de Doutorado. **Unicamp**, São Paulo: 1998.
27. PEREIRA, M. E. G. G.; SHIMABUKURO, O.H.; MARIANO, E. T.; ROBIN, A. R. M. M.; Torres, B. P. C. ;Biotecnologia, **Editora Manole LTDA**, São Paulo, p. 220-236, 1985.
28. JESUS, P.C.; Enzimas imobilizadas em organo-gel e crisotila: Aplicação na resolução de ácidos racêmicos e reações de amidação. (Tese de Doutorado), **UFSC**.1998.
29. MOREIRA, M.A ; QUEIROZ, N.; VIEIRA, M.A. ; Nascimento, M. G.; Palatase M imobilizada em gel de ágar e organo-gel. "Livro de resumos do XIX ENEQUI, **UFPA**, 2001.
30. LOEWEN, J.C.; " Lipases imobilizadas no bagaço de cana-de-açúcar aplicadas na preparação de ésteres para a produção de aromas" (Trabalho de Iniciação Científica) **FURB**, 2001.
31. RAMOS, C. ; DALLA VECCHIA, R.; RODRIGUES, C. A.; Esterificação do ácido láurico catalisada por diferentes lipases frente a variação de temperatura, utilizando dois sistemas diferentes de proteção da enzima. **Livro de Resumos**, QO-016, Reunião Anual da S. B. Q, Poços de Caldas, 2000.
32. SHAW, J.F.; CHANG, R.; WANG, F.F.; & WANG, Y. J.; Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. **Biotechnol. Bioeng.** P.35-132, 1990.

33. RUCKENSTEIN, E.; WANG, X.; A novel support for the immobilization of lipase and the effects of the details in preparation on the hydrolysis of triacylglycerides. **Biotechnol. Technol.**, v.7, p. 111-120, 1993.
34. BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O.; Introdução a Química de Alimentos. Campinas: **Fundação Cargil**, 71, 1985.
35. CLARK, A.; ROSS-MURPHY, S.B.; Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Ad. Polym. Sci.** v. 83, p. 115-123, 1987.
36. <http://www.sbu.ac.uk/water/hypec.html> (acessada em 07/12/2002).
37. KURILLOVÁ, L .; Calcium pectate gel beads cell entrapment: properties of stabilized and hardened calcium pectate gel beads with and without cells. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 16, p. 236-251, 1992.
38. PULITANO,V.M.S.; SUAZO, C. A. T.;" Avaliação de um reator contínuo de alta produtividade para produção de etanol com levedura imobilizada em pectina cítrica". Dissertação de Mestrado, **São Carlos**, 1990.
39. VAN FEETEN, P.; ZÜRRER, H.; Bachofen, R.; Production of molecular hydrogen with immobilized cells of *Rhodospirillum rubrum* **Appl. Biochem.Biotechnol.** v.38 p. 467-472 1993.
40. RICHTER, K. RÜHLEMANN, I.; BERGER, R. High performance fermentation with lactic acid bacterial entrapped in pectate gel. **Acta Biotechnol**, v.11, p. 229-341, 1991.
41. BEGIN, A.; BEAULIEU, G. J.; CASTAIGNE, F. Whey fermentation by *Propionibacterium Shermani* immobilized in different gels. **Michwissenschaff.** v. 47, p.411- 415, 1992.

42. TOMASKA, M. et al. G. Calcium pectate gel beads for cells entrapment: a study on the stability of *Kluyveromyces marxianus* whole-cell lactase entrapped in hardened calcium pectate and alginate gels. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 21, p. 347-356, 1995.
43. GONÇALVES, L. R. B; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. Hidrólise de maltose por amiloglucosase imobilizada em sílica envolvida por gel de pectina. In: **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, RJ p.1496-1501. 1996.
44. NAWAWI. E. A. S ; HEIKAL Y. A. Factors affecting the production of low - ester pectin gels. **Carbohydr. Polym.** n.26. p.189-193 ,1996.
45. CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P.C.; PEREIRA, E. B.; Influence of substrate partition coefficient on the performance of lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate by alcoholysis . **J. Chem. Eng.** v.17.n 4-7. p. 859-865, 2000.
46. LUNARDI, V. R.; Uso de pectinas e enzimas pectonolíticas na indústria alimentícia. **Higiene alimentar.** v. 1, n. 3, 1982.
47. LAANE,C.; BOEREN,S.; VOS,K. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.** v.30,p.81-87, 1987.
48. JUAREZ, J.J.; JESUS, P.C. ; NASCIMENTO, M. G.; "Diffusion coefficient measurements of alkyl benzoates in organo gel". **Atualidades de Físico - Química Orgânica**, p. 519-533,1998.
49. PLEISS, J ; FISCHER, M.; SCHMID, R. D.; Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site **Chem. Phys. Lipids.**v.93. p. 67-80,1998.
50. Fichas técnicas das lipases fornecidas pela Novozymes e Amano, 2002.

51. MOREIRA, M.A. "Utilização de lipases em reação de epoxidação quimio-enzimática." Dissertação de Mestrado, Departamento de Química-**UFSC**,2003.

52. KRISHNA, S. H; DIVAKAR.S; PRAPULLA.S.G.;KARANTH. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* . **J. Biotechnol.** v.87. p.193-201. 2000