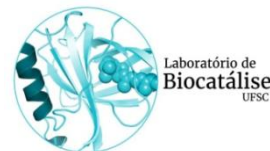




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
QMC 5512 - ESTÁGIO II



**Lipases imobilizadas em filmes de amido  
de *Hedychium coronarium* e proteína isolada de  
soja: Aplicação na síntese de ésteres**

Aluno: Leandro Alves dos Santos

Orientadora: Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, dezembro de 2017

Leandro Alves dos Santos

**Lipases imobilizadas em filmes de amido  
de *Hedychium coronarium* e proteína isolada de  
soja: Aplicação na síntese de ésteres**

Relatório de Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Realizado no Laboratório de Biocatálise, sob orientação

da Prof<sup>a</sup> Dra Maria da Graça Nascimento

e apresentado ao Departamento de Química

da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, dezembro de 2017

Leandro Alves dos Santos

**Lipases imobilizadas em filmes de amido  
de *Hedychium coronarium* e proteína isolada de  
soja: Aplicação na síntese de ésteres**

---

Prof. Dr. Luciano Vitali

Coordenador de Estágio do curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Profª Dra. Maria da Graça Nascimento

Orientadora

---

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

---

Prof. Dr. Fábio Zazyki Galetto

Florianópolis

Dezembro/2017

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio institucional e espaço físico fornecido.

Ao CNPq, INCT-Catálise e Capes pelo suporte financeiro.

A Amano Enzymes Inc, pela doação das lipases.

A Central de Análises pelas numerosas análises realizadas.

Um agradecimento especial à minha Prof<sup>a</sup> e Orientadora Dra Maria da Graça Nascimento, por todo apoio e incentivo neste trabalho, companheira de tantas histórias, e em alguns momentos conselheira, mãe e amiga.

Aos professores do Departamento de Química que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Biocatálise Douglas, Gabriela, Juana e Pamela.

Aos meus amigos da graduação, pelos momentos divididos juntos, especialmente Eduardo, Mariane, Carina, Roberta, Bárbara e Driélle.

Aos meus Pais pelo amor, e pelo apoio na minha aventura pela ciência.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ÍNDICE DE TABELAS.....	VII
RESUMO .....	VIII
1 - INTRODUÇÃO.....	10
1.1 - Enzimas .....	10
1.2 - Nomenclatura e Classificação das Enzimas .....	12
1.3 - Lipases.....	13
1.4 - Coquetel Enzimático .....	17
1.5 - Imobilização de Enzimas .....	18
1.6 - Método da oclusão em matriz polimérica .....	19
1.7 - Amido.....	19
1.8 - Lírio-do-brejo ( <i>Hedychium coronarium</i> ) .....	21
1.9 - Proteína Isolada de Soja .....	22
1.10 - Ésteres de aroma.....	23
2 - OBJETIVOS .....	25
2.1 - Objetivo geral .....	25
2.2- Objetivos específicos .....	25
3 - PARTE EXPERIMENTAL .....	26
3.1 - Materiais .....	26
3.2 - Equipamentos .....	27
3.3 - Caracterização dos compostos .....	27
3.4 - Determinação do teor de água nos filmes pelo método de Karl-Fischer .....	27
3.5 - Procedimentos experimentais .....	28
3.5.1 - Extração do amido .....	28
3.5.2 - Preparação dos filmes e imobilização das lipases .....	28
3.5.3 - Preparação do meio reacional .....	29
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1- Preparação do filme de amido de lírio-do-brejo/proteína isolada de soja.....	31
4.2 - Determinação do teor de água .....	32
4.3 - Preparação <i>via</i> enzimática do <i>n</i> -propionato de benzila.....	33
4.3.1 - Uso de lipases de diversas procedências .....	33
4.3.2 - Caracterização do éster (7) por IV .....	35
4.3.3 - Influência do suporte na imobilização das lipases.....	36

4.3.4 - Efeito da temperatura .....	37
4.4 - Preparação do <i>n</i> -propionato de benzila com duas lipases imobilizadas .....	39
4.4.1 - Escolha do coquetel enzimático .....	39
4.4.2 - Efeito do solvente orgânico .....	40
4.4.3 - Efeito da razão molar do doador acila .....	43
4.4.4 - Efeito do tempo .....	44
4.4.5 - Reutilização e estocagem dos sistemas biocatalíticos .....	45
4.4.6 - Efeito de diferentes agentes acilantes .....	48
5 - CONCLUSÕES .....	49
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação gráfica das estruturas tridimensionais de uma enzima .....	10
<b>Figura 2</b> - Representação do modelo chave-fechadura e do modelo de ajuste induzido.....	11
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>C. antarctica</i> .....	13
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação catalisada pela lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	14
<b>Figura 5</b> - Transesterificação enantiosseletiva de ésteres derivados do ibuprofeno em meio orgânico .....	15
<b>Figura 6</b> - Classificação dos métodos de imobilização .....	18
<b>Figura 7</b> - Estruturas da amilose e amilopectina .....	20
<b>Figura 8</b> - <i>H. coronarium</i> flores, folhas e hastes, rizomas e frutos .....	21
<b>Figura 9a</b> - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de uma alíquota da reação de transesterificação do <i>n</i> -propionato de vinila com o álcool benzílico .....	30
<b>Figura 9b</b> - Ampliação do espectro de <sup>1</sup> H-RMN .....	30
<b>Figura 10</b> - Espectro de IV do <i>n</i> -propionato de benzila.....	35
<b>Figura 11</b> - Influência do suporte na imobilização das lipases .....	36
<b>Figura 12</b> - Influência da temperatura .....	38
<b>Figura 13</b> - Efeito da razão molar álcool:doador acila .....	43
<b>Figura 14</b> - Efeito do tempo .....	44

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Classificação das enzimas segundo a UIBBM .....	12
<b>Tabela 2-</b> Aplicações de lipases conforme o tipo de reação catalisada .....	16
<b>Tabela 3 -</b> Lipases de diferentes fontes usadas neste trabalho .....	26
<b>Tabela 4-</b> Aspectos macroscópicos dos filmes .....	31
<b>Tabela 5 -</b> Determinação do teor de água nos filmes .....	32
<b>Tabela 6 -</b> Influência do uso de diversas lipases.....	34
<b>Tabela 7 -</b> Conversão em <b>7</b> utilizando o coquetel enzimático .....	39
<b>Tabela 8 -</b> Conversão em <i>n</i> -propionato de benzila ( <b>7</b> ) utilizando o coquetel enzimático das lipases <i>B. cepacia</i> (LPS) e de <i>C. rugosa</i> (LCR) .....	40
<b>Tabela 9 -</b> Efeito do solvente orgânico .....	41
<b>Tabela 10 -</b> Estudo da reutilização do coquetel enzimático LPS/LCR imobilizado no suporte de ALB .....	45
<b>Tabela 11 -</b> Estudo da reutilização do coquetel enzimático imobilizado no suporte PIS .....	46
<b>Tabela 12 -</b> Estudo da reutilização do coquetel enzimático LPS/LCR imobilizado no suporte ALB/PIS .....	47
<b>Tabela 13 -</b> Influência do doador acila na obtenção de diferentes ésteres derivados do álcool benzílico .....	48



## RESUMO

Os ésteres de aromas são utilizados como ingredientes em vários produtos nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética, para conferir odores florais e frutados. A preparação em condições normais é lenta, sendo importante a presença de um catalisador. Nas últimas décadas, têm sido relatados métodos de esterificação com o uso de biocatalisadores, principalmente as lipases.

Quando utilizadas na forma livre, as lipases podem ser tornar instáveis e não suportar temperaturas elevadas ou solventes orgânicos. Estas desvantagens, podem ser superadas através da imobilização, e a escolha do suporte é de grande importância. O amido de lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*) (ALB) é uma excelente opção para a preparação dos filmes e/ou blendas para imobilizar enzimas, pois apresenta baixo custo, e é renovável. Nesse trabalho, foi realizada a extração do amido, preparação de filmes e/ou de blendas de ALB juntamente com proteína isolada de soja (PIS) e a imobilização de lipases nestes suportes para a preparação do *n*-propionato de benzila (**7**). A formação e a quantificação dos produtos foram determinadas por <sup>1</sup>H-RMN.

Usando as lipases FAP-15 e LAY-30, as conversões ao éster **7** foram moderadas (15-30%). Quando as lipases, LCR, LAK20, LAK, LAYS, LAN12 foram utilizadas o éster foi obtido com conversões de 53-66%. Os melhores resultados foram obtidos com a lipase LPS-SD (77%). Os valores de conversão foram de 22, 50 e 56% utilizando as lipases LAY-30, LCR e LPS-SD imobilizadas em filme de ALB, respectivamente.

Ao utilizar a blenda ALB/PIS (50:50) para imobilizar estas mesmas lipases, os valores conversão foram de 47, 53 e 88%, respectivamente, e ao usar o sistema LPS/PIS as conversões foram de 30, 66 e 77%, respectivamente. Ao variar as temperaturas de 25°- 45° C, as conversões em **7** foram de 28-88%.

Ao usar o coquetel LPS/LCR na proporção 15:15 m/m, o valor de conversão foi de 77%. O éster **7** foi obtido com conversões de 32-88% na presença de acetona, acetonitrila, ciclohexano, diclorometano, DMF, etanol, éter etílico, éter diisopropílico, *n*-hexano, *iso*-octano, MTBE e THF. O estudo da reutilização do suporte com as lipases LPS/LCR imobilizadas mostrou que o sistema pode ser armazenado em *n*-hexano a temperatura ambiente, por 60 dias sem perder sua atividade catalítica, formando o éster com até 80% de conversão. Salienta-se que este suporte (ALB/PIS) é barato e de fonte renovável, sendo, portanto, uma das vantagens deste método.

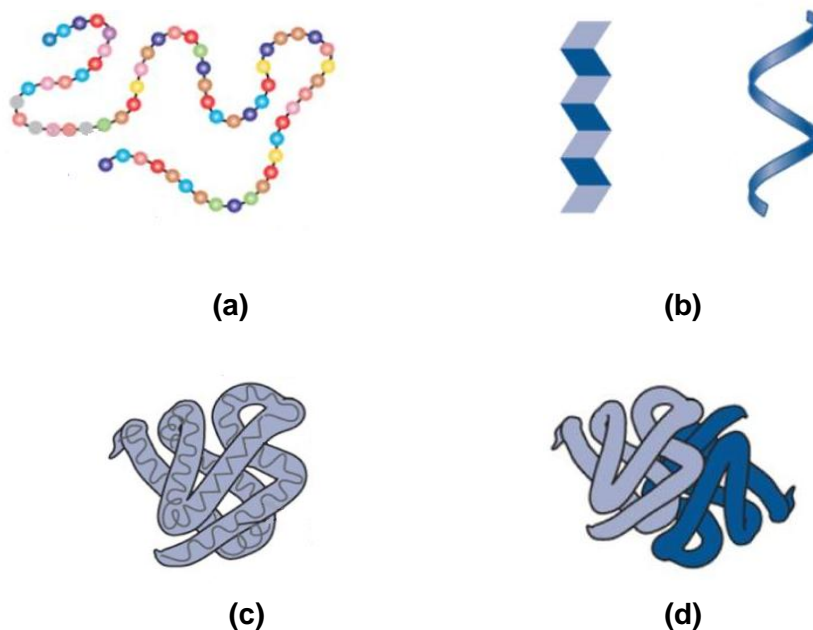
**Palavras-chave:** lipases, imobilização, *Hedychium coronarium*.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Enzimas

Enzimas são, em geral, proteínas de estrutura complexa, que atuam como biocatalisadores versáteis e aumentam a velocidade das reações químicas sob condições suaves de temperatura e pH.<sup>1</sup> Quase sempre as reações catalisadas por enzimas atingem velocidades de reação bastante superiores às obtidas por catalisadores químicos convencionais.<sup>2</sup>

Assim como as outras proteínas as enzimas são formadas por subunidades de  $\alpha$ -aminoácidos ligados entre si através de ligações peptídicas formando uma extensa cadeia (estrutura primária) **Figura 1a**, com a torção resultante das cadeias polipeptídicas (estrutura secundária) **Figura 1b**, se enovela (estrutura terciária) **Figura 1c**, resultando na formação de arranjos estruturais. Caso a enzima contenha mais de uma unidade polipeptídica, a estrutura quaternária **Figura 1d** será a responsável pela relação espacial entre as subunidades.<sup>1,3</sup>

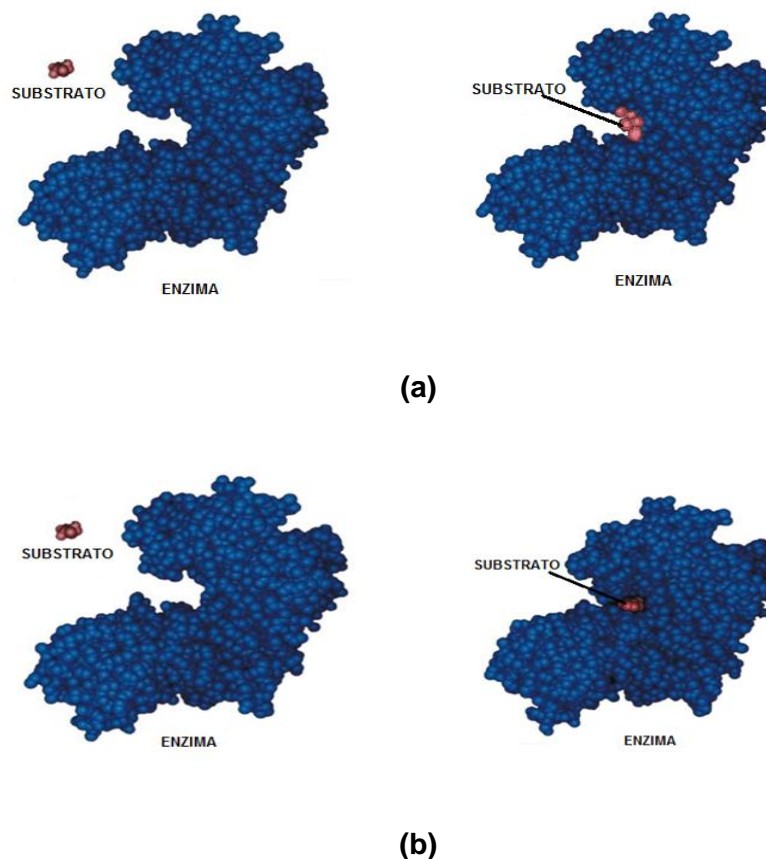


**Figura 1.** Representação gráfica das estruturas tridimensionais de uma enzima. (Adaptado da referência 1)

Os reagentes que participam nas reações catalisadas por enzimas são chamados de substratos, e cada enzima tem um caráter específico, atuando sobre um determinado substrato convertendo-o em um determinado produto. Sendo assim, a atividade enzimática depende de diversos fatores, tais como a estrutura do substrato, podendo este ser substituído por outros similares.

Apenas uma região restrita da estrutura tridimensional da enzima está envolvida no processo de catálise, que é denominada sítio ativo. O sítio ativo constitui uma parte relativamente pequena da estrutura e está, em geral, situado numa cavidade na superfície, na qual o substrato interage com determinados resíduos de aminoácidos carregados. Esta fenda deve possuir um formato definido para aceitar apenas algumas moléculas específicas como os substratos e inibidores<sup>1</sup>.

A especificidade de uma enzima por seu substrato é descrita através de dois modelos<sup>2</sup>. O primeiro foi proposto por Emil Fischer em 1894, é o modelo “chave-fechadura” (**Figura 2a**). Neste modelo, considera-se que o substrato encaixa na enzima exatamente como uma chave em uma fechadura. Um modelo mais refinado para explicar as propriedades das enzimas é o modelo do “ajuste induzido” (**Figura 2b**) proposto por Koshland em 1958, que propõe que o sítio ativo é uma região flexível cuja forma pode ser induzida para alojar compostos estruturalmente semelhantes. No entanto, somente o substrato capaz do alinhamento correto com o grupo catalítico, é que sofre a ação da enzima<sup>2</sup>.



**Figura 2.** Representação do modelo chave-fechadura (a), e do modelo de ajuste induzido(b).

## 1.2 - Nomenclatura e Classificação das Enzimas

Para padronizar a nomenclatura das enzimas, a *Enzyme Comimission* (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) adotou um sistema de classificação. O sistema UIBBM designa um nome sistemático para cada enzima, definindo o substrato no qual a enzima irá atuar e a reação catalisada. Além de nomear as enzimas, este mesmo sistema identifica cada enzima por um código numérico EC contendo quatro algarismos separados por pontos decimais. O primeiro algarismo situa a enzima em uma das seis classes observadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1** - Classificação das enzimas segundo a UIBBM.<sup>4,5</sup>

Classe da Enzima	Tipo de reação catalisada	Exemplos de enzimas
1. Oxido-redutases	Oxidação-redução	Lactato desidrogenase
2. Transferases	Transfêrencia de grupos (ex. aldeídos, cetonas, metilas)	Homocisteína metiltransferase
<b>3. Hidrolases</b>	Hidrólise/formação de ésteres, amidas, lactonas etc.	Quimotripsina, papaína, <b>lipases</b> , esterases
4. Liases	Adição ou remoção de grupos pequenos em C=C, C=N, C=O	Fumarase
5. Isomerases	Isomerização	Mandelato racemase
6. Ligases	Ligação de dois substratos	Asparagina sintetase

O segundo algarismo do código EC representa a subclasse e o terceiro é referente ao substrato catalisado e o último dígito é o número específico para cada enzima. Um exemplo é a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO), a enzima mais abundante no planeta, responsável pela incorporação de CO<sub>2</sub> nas moléculas orgânicas, esta enzima é catalogada como 4.1.1.39.<sup>6</sup>

As enzimas são muito úteis para a realização de reações químicas importantes devido a sua alta seletividade (químio-, regio- e enantiosseletividade) e em geral por serem muito específicas, formam os produtos com boas conversões ao final do processo, não havendo formação de reações paralelas. Um exemplo de aplicação das enzimas, onde estas necessitam ser seletivas é na síntese de produtos farmacêuticos de alto valor agregado, pois estas conseguem promover a transformação de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis.<sup>7</sup> Dentre as enzimas mais versáteis quanto à especificidade

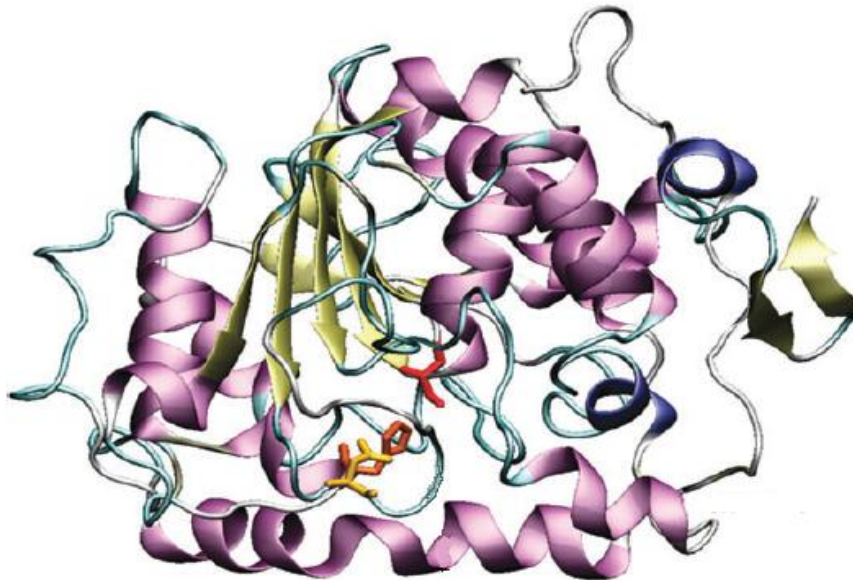
pelo substrato, e de maior disponibilidade comercial estão as lipases, juntamente com as proteases e amilases, sendo que estas três são as mais utilizadas no setor industrial.<sup>8</sup>

### 1.3 - Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolase – E.C. 3.1.1.3.) tem o papel biológico de atuar em ligações éster do grupo carboxílico de triglicerídeos catalisando a hidrólise para formar mono e di-glicerídeos, liberando glicerol e ácidos graxos.<sup>2,8,9</sup>

As lipases podem ser obtidas a partir de origem animal (pancreática, hepática e pré-gástrica), plantas (*Carica papaya*) e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como os fungos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum* sp, por leveduras de *Tulopsis* sp e de *Candida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp.<sup>10</sup> Os microrganismos são mais valorizados do que as enzimas de origem animal porque produzem enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação destas do meio fermentativo e são ideais para a produção comercial de lipases em grande escala.<sup>11</sup>

De modo geral a massa molar das lipases varia entre 20.000 a 60.000 g mol<sup>-1</sup>, o ponto isoelétrico na faixa de pH 4,0 a 7,5 e a atividade ótima está entre pH 6,5 e 8,5.<sup>10,11</sup> Na **Figura 3**, observa-se a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica*.<sup>12</sup>

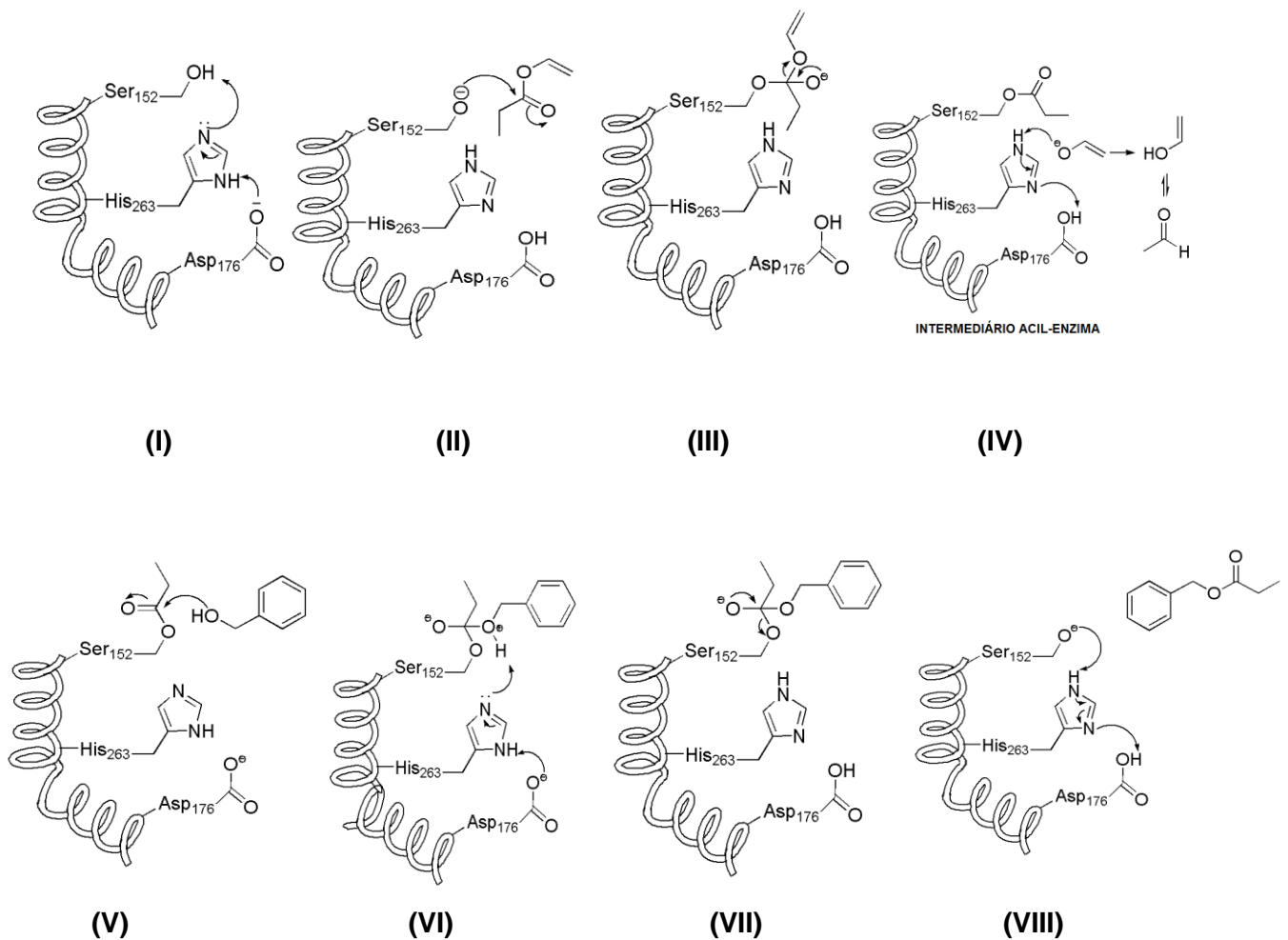


**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *C. antarctica*. (Adaptado da referência 12).

Dependendo das condições, as lipases também podem catalisar reações de síntese como de esterificação, transesterificação, tiotransesterificação, lactonização (esterificação intramolecular), peridrólise, oximólise, epoxidação, aminólise, amidação e transamidação em meios não aquosos, sistemas bifásicos e em líquidos iônicos puros (LIs) ou misturas.<sup>13-16</sup>

Somente com o surgimento da técnica de cristalografia de raios-X, a partir do início do século XX, foi que as primeiras estruturas de lipases foram elucidadas, e estes estudos foram importantes para entender o mecanismo de ação das lipases.

Todas as lipases são serina-hidrolases, ou seja, possuem um resíduo de serina nucleofílico em seu sítio ativo, em conjunto com um resíduo de histidina e um aspartato, formando uma tríade catalítica.<sup>17,18</sup> A **Figura 4**, ilustra a atuação desempenhada pelos resíduos de aminoácidos do sítio ativo.<sup>2,3</sup>

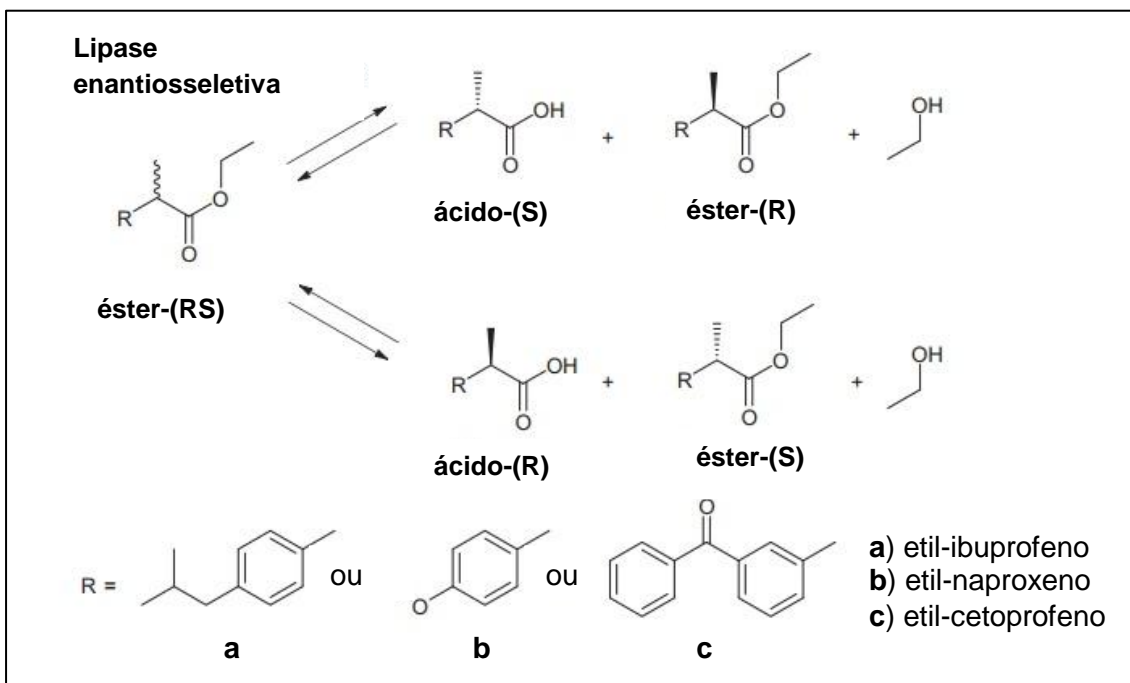


**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação catalisada por uma lipase de *Candida rugosa*. (Adaptado da referência 3)

Durante a primeira parte do processo catalítico, dois estados de transição estão envolvidos no rearranjo das ligações. Neste exemplo, o primeiro estado de transição (IV) é gerado na etapa de transformação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o éster vinílico em uma espécie intermediária denominada enzima acilada.<sup>2</sup> Normalmente são empregados ésteres vinílicos como doadores acila. Nestes casos, o enol formado após a acilação do resíduo de serina, é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável e volátil. Reações de transesterificação realizadas com excesso de doador acila em solventes orgânicos são irreversíveis.<sup>2,19</sup> Este método desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos, impedindo uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa, e o substrato (álcool benzílico). O segundo estado de transição (VI) ocorre quando a espécie intermediária enzima acilada reage com o álcool benzílico, formando um éster como produto (VIII).

O elevado potencial de aplicações das lipases é atribuído ao fato de que estas são exclusivamente estáveis em solventes orgânicos apolares. O seu esqueleto de proteínas flexíveis assume uma variedade de conformações, e lhes dão a capacidade de aceitar uma ampla gama de substratos de tamanhos variáveis e de grande complexidade estereoquímica.<sup>20, 21</sup>

D. Gérard e col.<sup>22</sup> realizaram a resolução de racematos do ibuprofeno utilizando a lipase de *C. rugosa*. (**Figura 5**)



**Figura 5.** Transesterificação enantiosseletiva de ésteres derivados do ibuprofeno em meio orgânico. (Adaptado da referência 22).

Aplicações mais detalhadas das lipases podem ser observadas na **Tabela 2**.

**Tabela 2** - Aplicações de lipases conforme o tipo de reação catalisada. <sup>13,18,23</sup>

<b>Tipos de Reações</b>	<b>Áreas de Aplicação</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Produtos</b>
<b>Hidrólise</b>	Alimentos (laticínios)	Hidrólise de gorduras do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
	Química (processamento de óleo).	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídeos).
	Química (detergentes)	Remoção de manchas de óleos	Detergentes de uso em lavanderias e domésticos
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits para diagnósticos
<b>Esterificação</b>	Indústria fina geral	Síntese de ésteres	Intermediários quirais, ésteres, emulsificantes.
	Indústria alimentícia	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, aromatizantes.
	Indústria farmacêutica	Síntese de intermediários em medicamentos	Anti-inflamatórios
<b>Transesterificação</b>	Indústria fina	Transesterificação	Produção de Biodiesel, aromatizantes

O uso de duas ou mais lipases simultaneamente para realizar algum processo, tem sido relatado recentemente, e será descrito a seguir.



#### 1.4 - Coquetel Enzimático

A busca por biocatalisadores cada vez mais eficientes e que se ajustem às condições necessárias para um processo catalítico tem se intensificado nos últimos anos. Geralmente refere-se ao termo “coquetel enzimático”, uma mistura de duas ou mais enzimas de diferentes fontes e que são utilizadas simultaneamente imobilizadas ou não no mesmo suporte e atuam na mesma reação.<sup>24</sup>

Um exemplo são os coquetéis de lipases produzidas por organismos separados e fornecidas por diferentes fabricantes. Devido à natureza evolutiva, procedência, meio de cultura, método de isolamento e purificação, e quando comparadas, as lipases de origens diferentes não possuem as mesmas propriedades físicas, química e biológicas, como a massa molar, pH ótimo e temperatura ideal. Estes fatores refletem diretamente na atividade e seletividade frente aos substratos, o que justifica a eficácia de determinados coquetéis enzimáticos sobre a catálise de uma determinada reação. Pesquisas recentes têm demonstrado as vantagens da biocatálise utilizando misturas de lipases.

Lee e col.<sup>25</sup> verificaram que o coquetel enzimático de *C. rugosa* (LCR) e *Rhizopus oryzae* (LRO) imobilizada em sílica, catalisou a reação de transesterificação de ésteres graxos com metanol para formar biodiesel em dióxido de carbono supercrítico. Foi observada que a mistura (LCR:LRO 1:1 m/m), foi mais eficiente do que as lipases individuais. A conversão em biodiesel foi de 99,2 % em 3h.

Poppe e col.<sup>26</sup> utilizaram três lipases imobilizadas disponíveis comercialmente. Uma mistura equivalente de Novozym 435 (CALB), Lipozyme TL-IM (TLL) e Lipozyme RM-IM (RML) catalisou a conversão do óleo de palma em biodiesel. O valor de conversão obtido para os ésteres etílicos foram de 80% em 18h, enquanto que ao utilizar somente a TLL no mesmo tempo de reação, a conversão foi de apenas 44%.

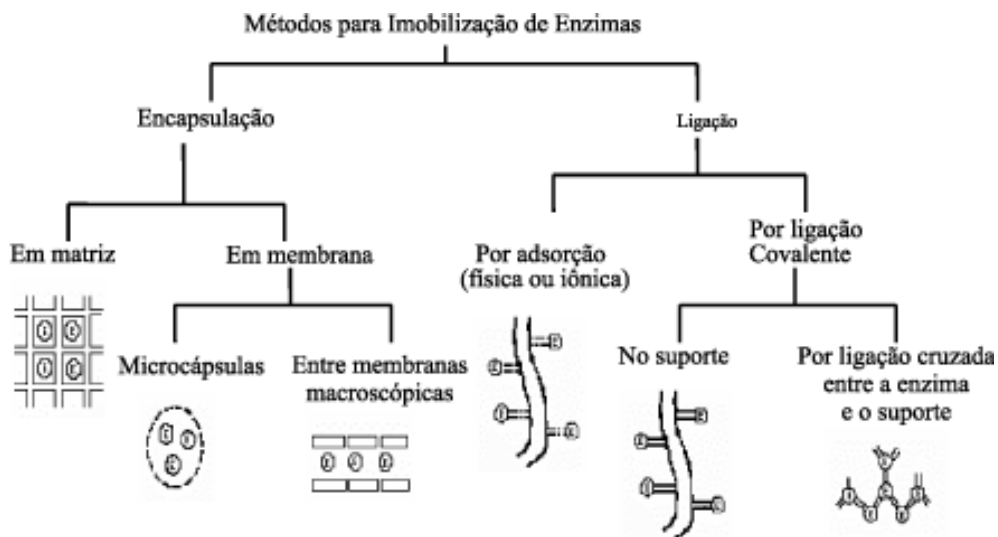
Na reação de etanolise do óleo de palma, Tongboriboon e col.<sup>27</sup> utilizaram as lipases AY (*C. rugosa*) e de AK (*Pseudomonas fluorescens*), e foi observado que o coquetel foi mais eficiente que usar somente a lipase AK. Em todos estes trabalhos o conceito de coquetel enzimático foi utilizado com o objetivo de diminuir a quantidade de enzima empregada e consequentemente reduzir os custos do processo, oferecendo oportunidades para o desenvolvimento de novas metodologias e aplicações industriais.

Entretanto, as enzimas nem sempre são catalisadores ideais para síntese química e aplicações industriais. Argumenta-se que algumas são instáveis, e não podem ser utilizadas em temperaturas elevadas ou em solventes orgânicos. Deve-se considerar também que o custo de isolamento e purificação ainda é elevado. Além disso, é muito caro recuperar a enzima do meio reacional ao final do processo quando estas são utilizadas na forma livre.<sup>28</sup> Portanto, para tornar o uso das enzimas mais econômico e eficiente, desde o final dos anos

60, o foco das pesquisas tem sido no desenvolvimento de métodos de imobilização, uma vez que estas técnicas são importantes, pois proporcionam a recuperação e reutilização do biocatalisador, facilitam a separação dos produtos, reduzem a inibição pelo meio reacional, aumenta a estabilidade em solventes orgânicos e podem ser estocados por longos períodos.<sup>29</sup>

### 1.5 - Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas consiste na fixação das mesmas em um determinado material, este procedimento é muito vantajoso, pois substitui a utilização destes catalisadores na forma solúvel, evitando a etapa de remoção da enzima do meio reacional para posterior aplicação, a utilização de enzimas imobilizadas diminui os custos do processo.<sup>28-30</sup> Este método pode ocorrer através de diferentes técnicas e cada uma delas envolve diferentes graus de complexibilidade e eficiência. Os vários métodos de imobilização podem ser divididos em duas categorias principais, métodos químicos quando a enzima é fixada no suporte por ligação covalente ou por ligação cruzada com auxílio de reagentes bi- ou multifuncionais, e os métodos físicos quando a enzima fica confinada no interior de um gel insolúvel, em fibras porosas, materiais adsorventes ou microencapsuladas.<sup>5</sup> A **Figura 6** mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.



**Figura 6.** Classificação dos métodos de imobilização.<sup>2,31,32</sup>

## 1.6 - Método da oclusão em matriz polimérica

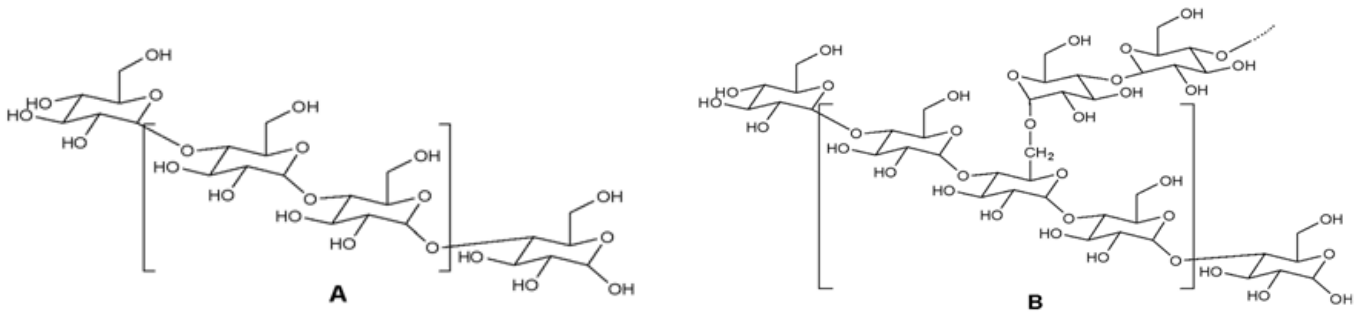
Este método envolve o confinamento (aprisionamento) da enzima dentro das cavidades internas existentes na estrutura de um polímero sólido.<sup>33</sup> A escolha do suporte é baseada em função das propriedades desejadas e do material selecionado. Podem ser produzidos filmes poliméricos a partir de proteínas tais como glúten de trigo, zeína de milho, proteína de soja, colágeno, caseínas e caseinatos, ou ainda de polissacarídeos como o amido, pectina, alginatos, carragena, dextrinas, ágar e outras gomas.<sup>34-36</sup> A matriz polimérica formada deve possuir boas propriedades mecânicas, boa permeabilidade, pois a velocidade com qual o substrato e os produtos formados difundem-se através da membrana é um fator limitante deste método. A vantagem deste método, é que a reação entre o substrato e a enzima a ser aprisionada não sofre modificação, pois a imobilização praticamente não altera sua estrutura. Além disso, o suporte deve possuir forma, tamanho e rigidez adequados para garantir a estabilidade química em solventes orgânicos e viabilizar o armazenamento e a reutilização.<sup>37</sup>

Como já citado, um dos suportes que pode ser utilizado para a imobilização de biocatalisadores, são os polissacarídeos e dentre eles destaca-se o amido que pode ser obtidos de diferentes fontes vegetais (exs: milho, mandioca, batata entre outros).<sup>34</sup>

## 1.7 - Amido

O amido é a substância mais importante na reserva de energia nas plantas superiores, ocorrendo principalmente em sementes, tubérculos, rizomas, e inclusive em pólen. Trata-se de uma matéria-prima renovável, biodegradável e não-tóxica. Pelo fato de ser facilmente hidrolisado e digerido é uma das substâncias mais importantes na alimentação humana e de animais.<sup>38</sup>

O amido é constituído essencialmente por uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina. As proporções dos componentes são dependentes da genética do vegetal e do tempo de maturação, mas, de maneira geral, a relação é de 17-28% de amilose e 72-83% de amilopectina.<sup>39</sup> A **Figura 6**, apresenta as estruturas destes biopolímeros.



**Figura 7.** Estruturas da amilose (A) e amilopectina (B).<sup>40</sup>

A amilose é constituída por 500 a 2 mil monômeros de glicose unidos entre si por ligações do tipo  $\alpha$ -1-4, formando uma cadeia linear, que na sua forma cristalina possui uma conformação helicoidal.<sup>40</sup> Esta conformação possibilita a formação de complexos de iodo (utilizado como indicador da presença de amido).

A amilopectina é a fração altamente ramificada do amido. É formada também por unidades de glicose ligadas de forma  $\alpha$ -1-4, porém com cadeias laterais unidas a cadeia principal a cada 24-30 unidades de glicose de forma  $\alpha$ -1-6. Pela forma a qual organizada, sua conformação espacial é esférica<sup>40</sup>.

À medida que a planta produz moléculas de amilose e amilopectina, estes se depositam em camadas sucessivas ao redor de um ponto central, para formar um grânulo compacto.<sup>40</sup> Os grânulos são considerados partículas semi-cristalinas e insolúveis em água fria. Em meio aquoso e com aquecimento e agitação ocorre a difusão da amilose para fora do grânulo e a água é incorporada na estrutura, este processo é chamado de gelatinização.<sup>38</sup> Com a gelatinização do amido há um aumento na viscosidade do meio, formando uma espécie de gel.

O gel de amido ao ser misturado com polióis (glicerol, sorbitol) pode ser transformado em filme. Quando a suspensão resultante do processo de gelatinização é deixada em repouso, ocorre um processo conhecido como retrogradação do amido. As moléculas de amido gelatinizado começam a se reorganizar de forma ordenada em uma rede macromolecular, estas redes podem ser utilizadas para o “aprisionamento” da enzima.

Após a remoção da água por evaporação, o gel resulta em uma película transparente, brilhante, com boas propriedades mecânicas (maleabilidade e resistência à ruptura) e é totalmente biodegradável.<sup>41</sup> Neste caso o aprisionamento pode ser uma boa escolha, porque resulta em um ambiente relativamente biocompatível dentro da matriz e causa relativamente poucos danos à estrutura tridimensional da enzima.

Com relação à origem vegetal dos amidos, pode-se dizer que as propriedades das diferentes fontes são atribuídas principalmente ao teor de amilose e amilopectina nos grânulos. Outras características que variam conforme a origem botânica são a cristalinidade, forma e tamanho do grânulo. Uma fonte botânica alternativa de amido é o lírio-do-brejo.

### 1.8 - Lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*)

O lírio-do-brejo é uma planta aquática, oriunda da Ásia tropical, e seu habitat natural é em áreas alagadiças como brejos e beiras de rios. Esta espécie foi introduzida no Brasil em 1987 com finalidade ornamental, mas devido ao seu intenso desenvolvimento em locais de elevada umidade e temperatura, acabou se tornando uma planta invasora e agressiva, competindo com a flora nativa por espaço, luz solar e nutrientes.<sup>42</sup>

O *H. coronarium*, **Figura 8**, apresenta uma ampla dispersão por propagação de sementes e rizomas. Seus frutos são de coloração atrativa e podem ser transportados por longas distâncias por pássaros e morcegos. Os fragmentos dos rizomas podem se dispersar pela água, através dos rios e formar novas colônias com vários indivíduos de mesma característica genética.



**Figura 8.** *H. coronarium*. (a) flores, folhas e hastes. (b) rizomas. (c) frutos

Por ser uma planta invasora, esta apresenta acentuados aspectos negativos como, agressiva infestação em lavouras de cacau e banana, potencial para desviar cursos d'água e impedir o tráfego de barcos pesqueiros, prejudicando a economia.<sup>43</sup>

Porém, seu atributo benéfico se inclui principalmente na alimentação animal, o rizoma feculento pode ser utilizado como alimentação humana alternativa em situações de pobreza extrema e falta de alimentos. Seus óleos essenciais possuem propriedades medicinais, são usados no tratamento de problemas pulmonares, tosse, possui ação antibacteriana e

antifúngica.<sup>44</sup> Estudos recentes mostram a ação larvicida do extrato aquoso de *H. coronarium* contra o *Aedes aegypti*.<sup>45</sup>

No entanto, apesar do considerável teor de amido nos rizomas do lírio-do-brejo, não existe na literatura relatos sobre o uso deste amido natural para a elaboração de filmes e/ou blendas para imobilização de lipases, tornando-se necessários estudos sobre suas aplicações em biocatálise. Outro polímero natural que pode ser usado é a proteína de soja.

### 1.9 - Proteína Isolada de Soja

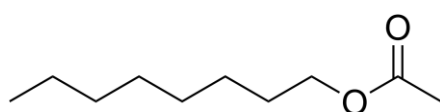
As proteínas de origem vegetal estão entre os maiores biopolímeros encontrados na natureza. Há muitas aplicações para as proteínas tais como: desenvolvimento de fibras e materiais plásticos que são produzidos a partir caseínas e zeínas. Dentre estas proteínas, a proteína de soja tem a vantagem de ser economicamente, viável, biodegradável e de fácil disponibilidade<sup>46</sup>. Além disso, o Brasil é o segundo maior exportador de soja do mundo (CONAB).<sup>47</sup>

A Proteína Isolada de Soja (PIS) é a forma mais refinada entre os derivados proteicos mais comuns da soja (entre eles a farinha de soja, a proteína texturizada e a proteína concentrada). Com mais de 90% de proteína, a PIS é um pó de coloração creme, preparado, a partir da fração proteica dos grãos de soja, e separado dos demais componentes não proteicos através de um processo de purificação em etapas baseado na sua reatividade química e solubilidade.<sup>48</sup>

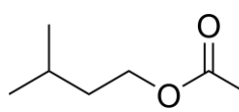
Experimentos recentes mostram que a proteína de soja sozinha ou misturada com outros biopolímeros, como o amido, por exemplo, pode ser moldada como constituinte dos plásticos como embalagens descartáveis, utensílios, e brinquedos. Os plásticos moldados demonstram propriedades mecânicas e resistência à água, adequados para muitos produtos disponíveis comercialmente. Depois de consumidos, os materiais usados podem ser coletados, processados e utilizados como ração animal ou adubo para o solo, o que compete uma completa utilização do material e soluciona os problemas de poluição ambiental.<sup>46,49</sup> A proteína de soja pode formar géis e filmes, similar aos obtidos com outros polissacarídeos tal como o amido, e estas propriedades tornam este biopolímero um material interessante para ser explorado como suporte para imobilização de lipases e/ou de outros biocatalisadores, especialmente as lipases, viabilizando o uso em reações de esterificação e transesterificação. Através destas reações, é possível preparar ésteres de cadeias curtas, também conhecidos como “ésteres de aroma”. Estes são amplamente usados nas indústrias de alimentos e de fragrâncias.

### 1.10 - Ésteres de aroma

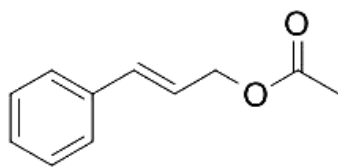
Os ésteres são compostos de ocorrência muito comum na natureza. Muitos ésteres de cadeia curta têm frequentemente um odor agradável e frutado, os quais estão associados com propriedades organolépticas (aroma e sabor).<sup>50</sup> Conseqüentemente, estes ésteres têm significância comercial notável nas indústrias de fragrâncias, cosméticos, alimentos e farmacêutica. A indústria química utiliza os ésteres para uma variedade de propósitos, por exemplo, o acetato de etila é um solvente muito comum em síntese química, o acetato de octila (1) é a base para o aroma artificial de laranja<sup>51</sup> e o acetato de isoamila (2), é um dos constituintes do óleo de banana.<sup>52</sup>



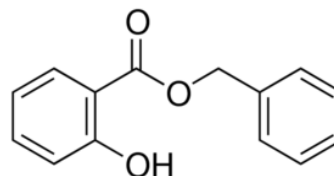
(1)



(2)



(3)



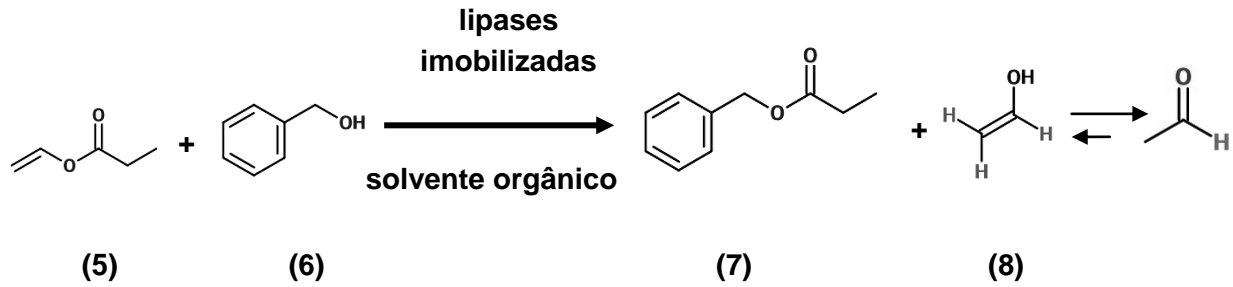
(4)

O acetato de cinamoíla (3) é um importante ingrediente usado na indústria de perfumes,<sup>53</sup> e o salicilato de benzila (4) é utilizado como solvente de almíscar sintético e em cosméticos como fixador de composições florais.<sup>54</sup>

A preparação de ésteres de sabor por métodos químicos não é ecologicamente amigável, pois há a necessidade de se utilizar reagentes em excesso, além de possuir alguns efeitos tóxicos na saúde que incluem a utilização de catalisadores agressivos como, por exemplo, ácido sulfúrico. O desenvolvimento de pesquisas sobre processos que empregam enzimas está sendo muito discutida nas últimas décadas.<sup>55</sup> Essas reações usam condições operacionais suaves, têm alta especificidade com reações laterais reduzidas e produzem compostos de alta pureza evitando técnicas de separação dispendiosas.

Sendo assim, a obtenção destes compostos é de interesse, e será explorada neste trabalho. Como catalisador serão usadas lipases imobilizadas em filmes e/ou blendas de amido do lírio-do-brejo (ALB) e PIS, e a reação será feita em condições brandas. Será preparado principalmente o *n*-propionato de benzila (7) a partir do *n*-propionato de vinila (5) e álcool benzílico (6). Este é um éster artificial que compõe a mistura de compostos

responsáveis pelo aroma floral/frutado.<sup>56</sup> O **Esquema 1** mostra a equação química para a preparação deste composto.



**Esquema 1.** Reação de transesterificação do *n*-propionato de vinila com álcool benzílico para obter o éster 7.



## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo geral

- Imobilizar lipases em filmes e/ou blendas de amido de lírio-do-brejo e proteína isolada de soja, plastificados com sorbitol, contendo  $\beta$ -CD e utilizar estes sistemas como catalisadores em reações de transesterificação.

### 2.2- Objetivos específicos

- Extrair, separar e purificar o amido procedente do rizoma do lírio-do-brejo (*H. coronarium*).
- Preparar filmes de amido e proteína isolada de soja, plastificados com sorbitol, contendo  $\beta$ -CD, com e sem enzima.
- Verificar a influência da imobilização de lipases de diferentes procedências na blenda polimérica de ALB/PIS (50:50 m/m) na reação de transesterificação do *n*-propionato de vinila com o álcool benzílico.
- Avaliar o efeito da imobilização das lipases, LAY-30, LCR e LPS-SD em diferentes filmes e/ou blendas de ALB e PIS, bem como avaliar a reação na ausência de enzima ou o uso das mesmas na forma não imobilizada.
- Verificar a influência da temperatura (25 - 45° C) na síntese do *n*-propionato de benzila catalisada pelas lipases LAY-30, LAK-20, LAN-12 e LPS-SD.
- Imobilizar simultaneamente pares de lipases LAY-30/LCR e LCR/LPS-SD (coquetel enzimático) em filmes e/ou blendas de ALB/PIS, verificar a eficiência destas lipases na reação de transesterificação do *n*-propionato de vinila com o álcool benzílico.
- Avaliar a utilização de diferentes solventes orgânicos, efeito do tempo e razão molar do doador acila, na reação de transesterificação do *n*-propionato de vinila com o álcool benzílico, catalisada pelo coquetel enzimático LCR/LPS-SD, a 35°C.
- Avaliar o efeito de diferentes reagentes acilantes de cadeia longa nas reações de transesterificação com o álcool benzílico catalisada pelo coquetel enzimático imobilizado em filme de ALB
- Verificar a reutilização e o tempo de estocagem dos filmes e/ou blendas de ALB/PIS (50:50 m/m) contendo o coquetel enzimático LCR/LPS-SD imobilizado, na reação para obtenção do éster.
- Comparar os resultados obtidos com outros já descritos na literatura.

### 3 - PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 - Materiais

Para a preparação dos suportes, foi utilizado o amido proveniente de tubérculos do lírio-do-brejo (*H. coronarium*). Este foi extraído conforme descrito no item 3.5.1 na página 28.

As **lipases** utilizadas neste trabalho estão apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3** - Lipases de diferentes fontes usadas neste trabalho.

Fontes das lipases	Sigla	Atividade	Fornecedor
<i>Aspergillus niger</i>	LAN-12	120.000 U g <sup>-1</sup> (a)	Amano
<i>Burkholderia cepacia</i>	LPS-SD	30.000 U g <sup>-1</sup> (a)	Amano
<i>Candida rugosa</i>	LAY-30	30.000 U g <sup>-1</sup> (a)	Amano
<i>Candida rugosa</i>	LCR	746 U mg <sup>-1</sup> (b)	Sigma
<i>Candida rugosa</i>	LAY-S	30.000 U g <sup>-1</sup> (a)	Amano
<i>Mucor javanicus</i>	LM-10	10.000 U g <sup>-1</sup> (a)	Amano
Pâncreas suíno	PPL	10 a 30.000 U g <sup>-1</sup>	Sigma
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LAK	20.000 U g <sup>-1</sup> (a)	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LAK-20	20.000 U g <sup>-1</sup> (a)	Amano
<i>Rhizopus oryzae</i>	FAP-15	150.000 U g <sup>-1</sup> (a)	Amano

Por definição <sup>(a)</sup> 1 unidade de lipase (U) é a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, utilizando-se óleo de oliva como substrato, a pH 7,0 e 37 °C.

Por definição <sup>(b)</sup> 1 unidade de lipase (U) é a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, utilizando-se óleo de oliva como substrato, a 37 °C, sendo o pH 7,2, tempo de incubação 30 minutos.

**Solventes:** acetato de etila (Grupo Química 99,5%), acetona (Carlo Herba 99,5%), acetonitrila (Vetec 99,5%), *t*-butanol (Vetec 99%), diclorometano (Vetec 99,5%), etanol (Grupo Química 99,5), éter etílico (Dinâmica 99%), éter diisopropílico (Vetec 99%), ciclohexano (Vetec 99%), hexano (Synth 98.5%), MTBE (Vetec 99,5%), DMSO (Grupo Química 99%), *iso*-octano (Merck 99%).

**Reagentes:** Proteína isolada de soja (Supra), álcool benzílico (J.T. Baker 98%), *n*-propionato de vinila (Aldrich 98%), laurato de vinila (Aldrich 99%), estearato de vinila (Aldrich 95%), sorbitol (Vetec 99,0%) e β-ciclodextrina (Aldrich 97%).

### 3.2 - Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho estão descritos a seguir:

- Espectrômetro Varian AC 400F, 400 MHz
- Espectrofotômetro IR Shimadzu Prestige – 21\*
- Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau

\*Lab 202/204 (Polimat –DQ)

Estes equipamentos estão localizados na Central de Análises, e os seguintes disponíveis nos laboratórios 301/306 ambos do Departamento de Química – UFSC.

- Agitador com banho termostatizado: Technal TE-0532
- Agitadores magnéticos e chapas de aquecimento: Dist
- Balanças analíticas: Adventurer Ohaus-AR2140 e -EK200i
- Rotaevaporador: R II Buchi
- Ultrassom: Thornton Unique UltraSonic Cleaner T1440

### 3.3 - Caracterização dos compostos

Os compostos, álcoois e ésteres, foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H-RMN}$ ), obtidos no espectrômetro Varian AC 400 ou 200 MHz, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$ ). O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). O éster foi também caracterizado por infravermelho (filme).

### 3.4 - Determinação do teor de água nos filmes pelo método de Karl-Fischer

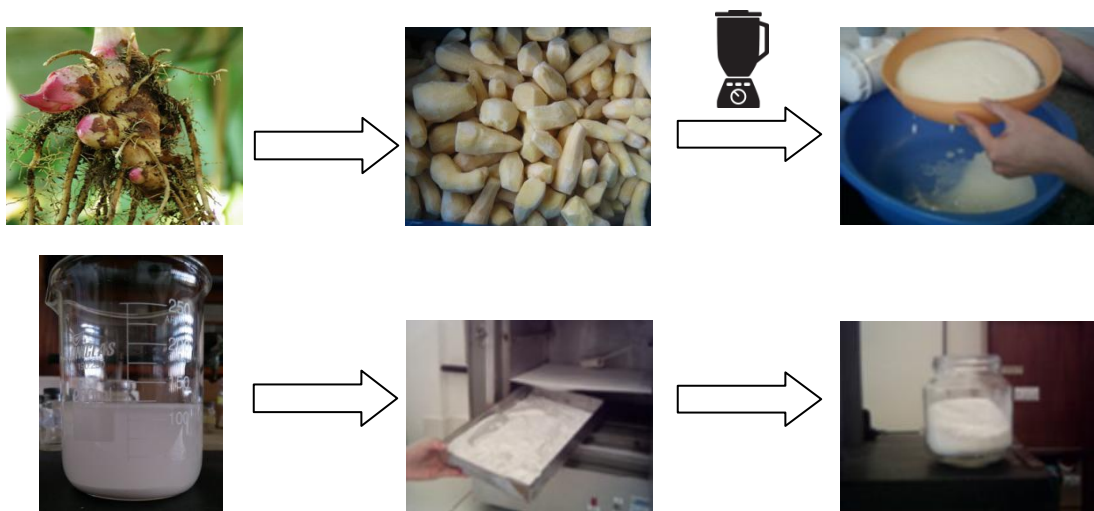
A determinação do teor de água nos filmes de amido de lírio-do-brejo (ALB), proteína isolada de soja (PIS) e na blenda ALB/PIS (50:50 m/m), foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, utilizando-se o Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau. Este método baseia-se na determinação quantitativa da água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo.<sup>57</sup> Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos no item 4.2, pág 32.

### 3.5 - Procedimentos experimentais

#### 3.5.1 - Extração do amido

Os rizomas de lírio-do-brejo foram obtidos de plantas saudáveis da cidade de Santa Cecília, SC. Aproximadamente 1,5 Kg de tubérculos foram selecionados para extração do amido. Os rizomas foram lavados, descascados e posteriormente picados e colocados em contato com uma solução de metabissulfito de potássio ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) para evitar o escurecimento do amido. A trituração foi realizada em um liquidificador comercial, obtendo-se uma massa que foi passada em peneiras e lavada com água sucessivamente para separação do amido por decantação.

O filtrado contendo o amido foi deixado em repouso na geladeira por 24h para decantar. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o amido colocado na estufa a  $50^\circ\text{C}$  por 8h para secagem (**Esquema 2**). Após este processo, obteve-se 80g de amido. A caracterização do amido foi feita pelo teste do iodo.



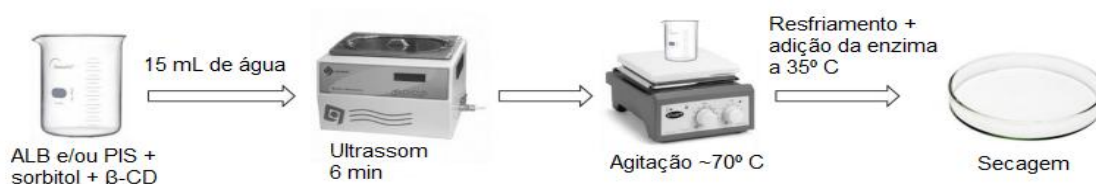
**Esquema 2.** Extração do amido de lírio-do-brejo (*H. coronarium*).

#### 3.5.2 - Preparação dos filmes e imobilização das lipases

Os filmes de ALB/PIS foram preparados seguindo-se a metodologia descrita a seguir. Em um béquer de 50mL foram adicionados 0,0-1,0g de ALB e 0,0-1,0g de proteína isolada de soja dissolvidos em 15mL de água destilada com 0,3g de sorbitol como plastificante e 0,1g de  $\beta$ -CD como agente espaçador. A solução foi mantida sob agitação magnética e com aquecimento brando por 5 min. Os mesmos foram preparados com as lipases, adicionando-

se 0-30mg das várias lipases na solução do filme após o resfriamento do mesmo (temperatura ambiente), e o sistema foi agitado por mais 10 min. A solução foi então transferida para uma placa de Petri e colocada na capela para evaporação da água (~24h).

Após evaporação da água, os filmes com as enzimas imobilizadas foram cortados em quadrados pequenos com aproximadamente  $0,5\text{ cm}^2$  e transferidos para um erlenmeyer de 250 mL contendo o solvente orgânico. A preparação dos filmes de amido está representado no **Esquema 3**.



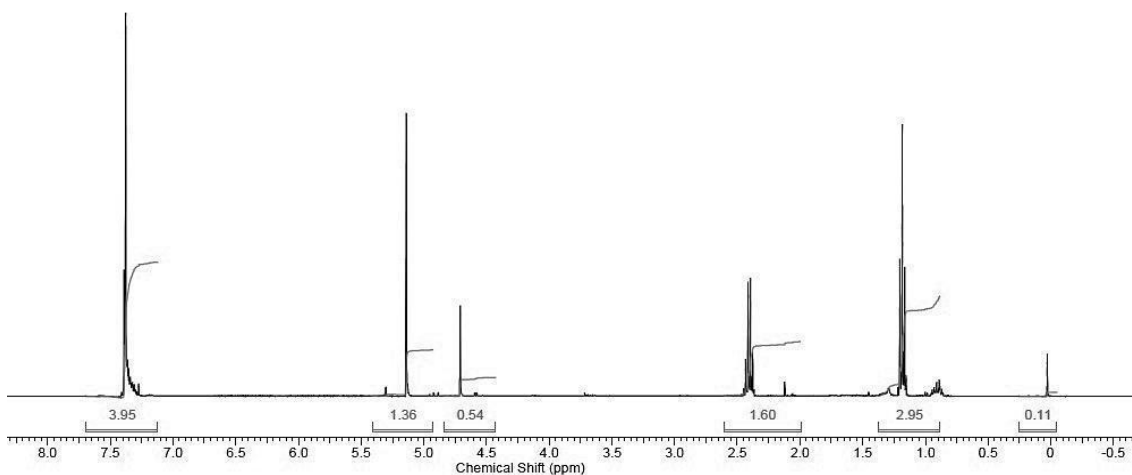
**Esquema 3.** Preparação do filme de amido do lírio-do-brejo e imobilização de lipases

### 3.5.3 - Preparação do meio reacional

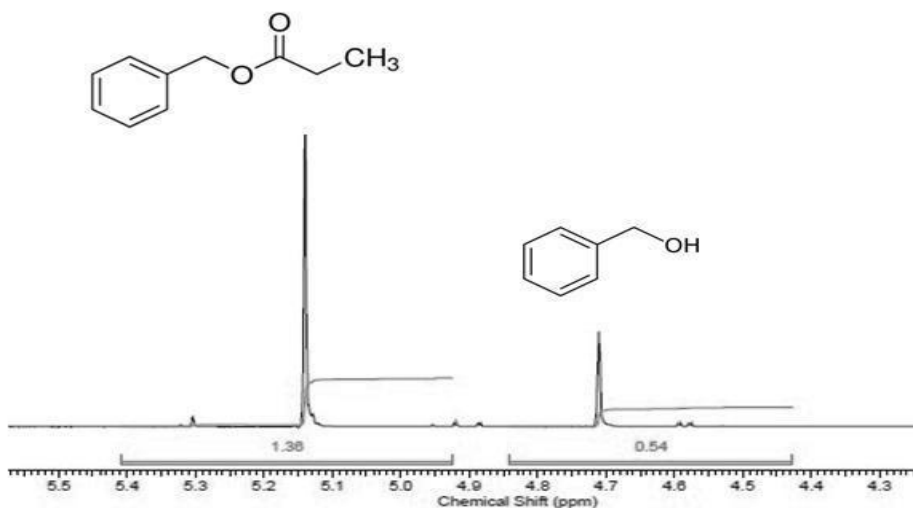
Para as reações de transesterificação, inicialmente foram adicionados 5 mmol de álcool benzílico, 5 mmol de *n*-propionato de vinila e 25 mL de *n*-hexano em um erlenmeyer de 250 mL contendo as lipases imobilizadas. A mistura foi colocada em banho termostaticado com agitação (Technal TE-0532) por 24h (ou em diferentes tempos) e na temperatura requerida para cada análise.

As reações foram monitoradas por ccd, usando como eluente hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Após 24h, a mistura reacional foi separada e transferida para um balão de fundo redondo. Os filmes foram lavados com solvente até que não houvesse mais a presença dos reagentes (conferindo por ccd), e o solvente evaporado em rota-evaporador. A quantificação do produto foi feita por análises de  $^1\text{H-RMN}$ . (**Figura 9a**)

As regiões analisadas no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram as de 4,60 ppm e 5,10 ppm. Na região de 4,60 ppm, é observado o singlete dos hidrogênios do grupo metilênico vizinho à hidroxila do álcool, e a região de 5,10 ppm se refere ao singlete dos hidrogênios do grupo metilênico próximo ao oxigênio do éster. (**Figura 9b**)



**Figura 9a.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de uma alíquota da reação de transesterificação do *n*-propionato de vinila com o álcool benzílico catalisada pela lipase LPS-SD imobilizada na blenda ALB/PIS (50:50 m/m). Conversão: 88,0% [Condições de reação: *n*-propionato de vinila (5mmol); álcool benzílico (5mmol), massa total de enzima: 30mg, *n*-hexano (25mL), 35° C, 24h].



**Figura 9b.** Ampliação do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 8a**), mostrando as regiões entre 4,5 ppm e 5,5 ppm.

O valor de conversão em éster foi calculado a partir da **Equação 1**.

$$\text{Conversão} = \frac{\text{integral do sinal dos hidrogênios metilênicos do éster}}{\text{soma das integrais dos hidrogênios metilênicos do éster e do álcool}} \times 100\% \quad 1$$

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, lipases de diferentes procedências foram imobilizadas em filmes de amido de lírio-do-brejo (*H. coronarium*) extraído de fontes renováveis, e de proteína isolada de soja, obtida comercialmente. Foram realizados alguns testes usando os diferentes suportes para imobilizar as lipases e avaliar o mais eficiente. A seguir, estudou-se a influência da procedência das lipases, efeito da temperatura, influência de diferentes solventes orgânicos, reutilização do suporte e do tempo de estocagem na obtenção do éster de aroma, *n*-propionato de benzila. Os próximos itens apresentarão e discutirão os resultados obtidos.

### 4.1- Preparação do filme de amido de lírio-do-brejo/proteína isolada de soja

Conforme descrito no item 3.1, utilizou-se o lírio-do-brejo como fonte de amido, da qual a partir de 1500 g obteve-se 80g de amido. O amido depois de seco foi triturado e peneirado para ser utilizado na preparação dos filmes. A caracterização do amido, a partir do teste do iodo, evidenciou a presença deste polissacarídeo visto que houve a formação de um complexo de coloração azul escuro. Esta coloração é resultado da interação do iodo com o amido.<sup>58</sup> A proteína isolada de soja foi obtida comercialmente.

Com o objetivo de definir as melhores condições para formação de um filme de ALB/PIS mais estável e maleável, foram feitos alguns testes a partir da adição de diferentes proporções destes polímeros. Foi feita também a comparação entre dois tipos de agentes plastificantes, glicerol e sorbitol, onde se concluiu que o sorbitol foi o mais eficiente e formou filmes mais maleáveis. Portanto, o sorbitol foi usado como agente plastificante. A **Tabela 4** apresenta os aspectos macroscópicos para os filmes obtidos com diferentes massas (em gramas) de ALB e PIS.

**Tabela 4** - Aspectos macroscópicos dos filmes usando diferentes proporções de ALB/PIS.

ALB (g)	PIS (g)	Aspecto macroscópico <sup>a</sup>
1,0	0,0	Filme maleável e resistente
0,8	0,2	Filme maleável e resistente
0,6	0,4	Filme maleável e resistente
0,5	0,5	Filme maleável e resistente
0,4	0,6	Filme maleável e resistente
0,2	0,8	Filme maleável e resistente
0,0	1,0	Filme maleável e resistente

(a) após evaporação da água a temperatura ambiente, massa de sorbitol 0,3g

Analisando os resultados obtidos, foram escolhidas as quantidades de 0,5g de amido de lírio-do-brejo e 0,5g de proteína isolada de soja, 0,3g de plastificante sorbitol e também foi

introduzido um agente espaçador  $\beta$ -CD na estrutura do suporte, este aditivo aumenta a porosidade do filme e permite uma melhor difusão dos substratos através da matriz polimérica.

Nestas condições, o filme obtido é maleável e resistente, além de trabalhar em condições o menor custo. Menciona-se que a obtenção do amido de lírio-do-brejo é de baixo custo, pois pode ser facilmente obtido a partir de fontes renováveis como brejos e terrenos baldios.

#### 4.2 - Determinação do teor de água

O teor de água nos filmes e/ou blendas de ALB e/ou PIS, utilizando sorbitol como plastificante, contendo  $\beta$ -CD foi determinado pelo método de titulação Karl-Fischer. Os filmes preparados com 30mg de lipase e sem a mesma, apresentaram de 2,67-9,08% de água. Estes valores estão mostrados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** - Determinação do teor de água nos filmes e/ou blendas de ALB e/ou PIS

Sistemas <sup>(a)</sup>	Teor de água (%) <sup>(b)</sup>
Filme de ALB	2,67
Filme de PIS	9,08
Filme de ALB/PIS	6,74
Filme de AL/PIS/LCR	5,88

(a) Filmes de amido: 1,0g de ALB, 0,3g de sorbitol, 0,1 de  $\beta$ -CD. Filme de proteína de soja: 1,0g de PIS, 0,3g de sorbitol, 0,1g de  $\beta$ -CD. Blenda: 0,5g de ALB, 0,5g de PIS, 0,3g de sorbitol, 0,1g de  $\beta$ -CD, lipase LCR 30 mg (b) Determinado pelo método de Karl-Fischer.

O filme de amido de lírio-do-brejo apresentou um baixo teor de água quando comparado a outros resultados. Um estudo realizado por Ascheri e col.<sup>59</sup>, descreveu que o amido dos rizomas de lírio-do-brejo possui elevada temperatura de empastamento (73-78°C), tendência ao inchamento e índice de solubilidade baixo. O gel apresenta elevada estabilidade frente ao aquecimento com agitação mecânica, e mostra alta tendência à retrogradação, fenômeno no qual a rede do amido começa a se contrair e consequentemente provoca a expulsão de grande parte da água. Estas observações ajudam a explicar o baixo conteúdo de água no filme de ALB (2,67%).

A adição de proteína isolada de soja na composição do biopolímero provoca um aumento no teor de água, pois se sabe que biomoléculas como esta, apresentam resíduos de aminoácidos carregados que podem formar interações eletrostáticas e ligações de



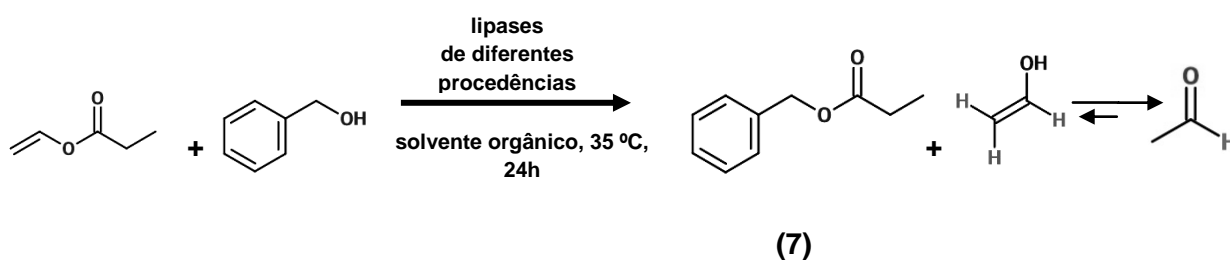
hidrogênio com moléculas de água e, por consequência, formar uma camada de hidratação<sup>60</sup>. Esta característica é responsável pelo maior valor no teor de água observado neste filme (9,08%). Esta informação é importante, pois já está documentado na literatura, que as enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para manter sua conformação tridimensional, a integridade estrutural do sítio ativo e conseqüentemente a atividade catalítica.<sup>2</sup>

### 4.3 - Preparação *via* enzimática do *n*-propionato de benzila

#### 4.3.1 - Uso de lipases de diversas procedências

Conforme citado, neste trabalho foi estudada a reação de transesterificação do *n*-propionato de vinila com o álcool benzílico. (**Esquema 4**)

A reação foi realizada utilizando como biocatalisadores, dez lipases imobilizadas individualmente na blenda ALB/PIS (50:50 m/m), com sorbitol e  $\beta$ -CD. As porcentagens de conversão em *n*-propionato de benzila foram determinadas através de análises dos espectros de <sup>1</sup>H-RMN.



**Esquema 4.** Reação de transesterificação do álcool benzílico com *n*-propionato de vinila utilizando lipases de diferentes procedências.

A **Tabela 6** apresenta os dados de conversão em *n*-propionato de benzila, após 24h de reação.

**Tabela 6** - Influência do uso de diversas lipases na conversão em *n*-propionato de benzila <sup>(a)</sup>

Lipases	Origem	Atividade	Conversão (%) <sup>(b)</sup>
LPS SD	<i>Burkholderia cepacia</i>	30.000 U g <sup>-1</sup>	88,0
LCR	<i>Candida rugosa</i>	746 U mg <sup>-1</sup>	53,4
LAY 30	<i>Candida rugosa</i>	30.000 U g <sup>-1</sup>	30,0
LAYS	<i>Candida rugosa</i>	30.000 U g <sup>-1</sup>	64,0
F-AP15	<i>Rhizopus oryzae</i>	30.000 U g <sup>-1</sup>	15,0
LAN 12	<i>Aspergillus niger</i>	120.000U g <sup>-1</sup>	66,0
LAK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25.000 U g <sup>-1</sup>	62,0
LAK20	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25.000 U g <sup>-1</sup>	59,0
LM 10	<i>Mucor javanicus</i>	10.000 U g <sup>-1</sup>	5,0
PPL	<i>Pâncreas suíno</i>	10 a 30.000 U g <sup>-1</sup>	3,0

(a) álcool benzílico (5mmol), *n*-propionato de vinila (5mmol), lipases (30 mg), hexano (25 mL), 35 °C, 24h. (b) determinada por <sup>1</sup>H-RMN.

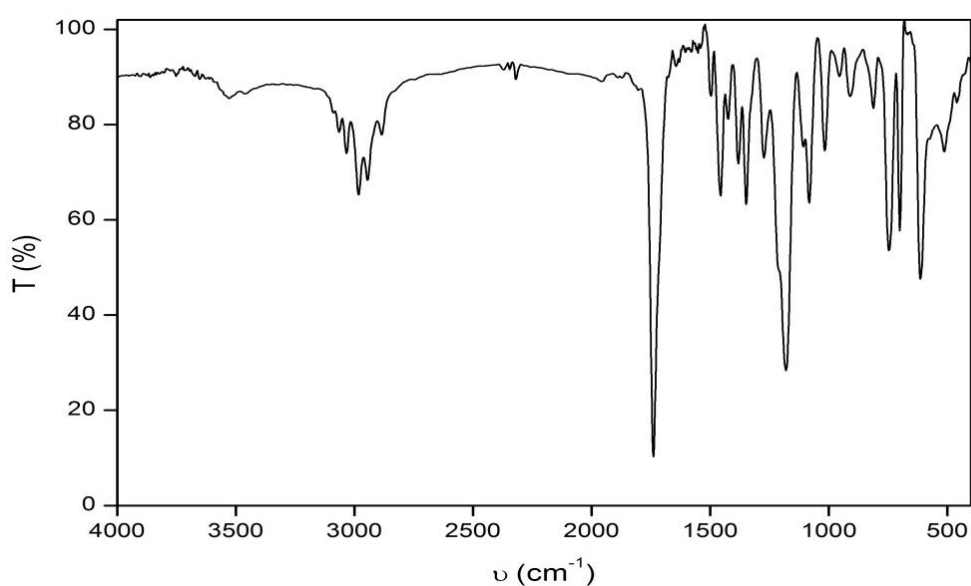
Observa-se pelos dados da **Tabela 6**, que ao utilizar lipases de diferentes procedências a conversão em *n*-propionato de benzila apresentou uma grande variação. Ao utilizar as lipases do pâncreas suíno (PPL) e de *Mucor javanicus* (LM10), o éster foi formado com baixas conversões, sendo que os valores foram de 3 e 5% respectivamente. Usando as lipases F-AP15, e LAY30, as conversões em éster foram moderadas com valores de 15-30%. Quando as lipases, LCR, LAK20, LAK, LAYS, LAN12 foram utilizadas como biocatalisadores na reação de transesterificação, o éster **7**, foi obtido com conversões de 53-66%. Os melhores resultados foram obtidos quando a lipase LPS-SD foi usada, formando o éster com 88% de conversão.

Esses resultados mostram que as lipases mais eficientes apresentam bom potencial para serem usadas nesta reação. Portanto, as lipases LAY-30, LCR e LPS-SD foram selecionadas para dar continuidade aos estudos do melhor suporte para imobilização, e as lipases LAY-30, LAK20, LAN12 e LPS-SD foram escolhidas para verificar o efeito da temperatura nesta reação de transesterificação.

Nas reações realizadas na ausência de lipase, não foi observado a formação do éster **7** utilizando apenas o filme de ALB, ou foram mínimos (7-3%) utilizando os filmes de ALB/PIS e PIS, respectivamente. Esta observação deve principalmente à presença de outras enzimas como esterases ou lipases, envolvidas no metabolismo da germinação do grão de soja.<sup>61</sup>

#### 4.3.2 - Caracterização do éster (7) por IV

Através da observação e identificação das bandas do espectro de IV do *n*-propionato de benzila, é possível confirmar a formação do éster de interesse, sabendo que o reagente de partida era o álcool benzílico. Na **Figura 10**, pode-se observar a presença de uma banda em  $1740\text{ cm}^{-1}$ , referente à carbonila do éster. A ausência de uma banda larga na região de  $3500\text{ cm}^{-1}$  evidencia a formação do propionato, pois mostra que não há mais grupo  $\text{-OH}$  na molécula. Observa-se também as bandas entre  $2840$  e  $3120\text{ cm}^{-1}$ , referentes às vibrações de estiramento C-H, e em  $1180\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-O. Estes dados são concordantes com os citados na literatura.<sup>62</sup>



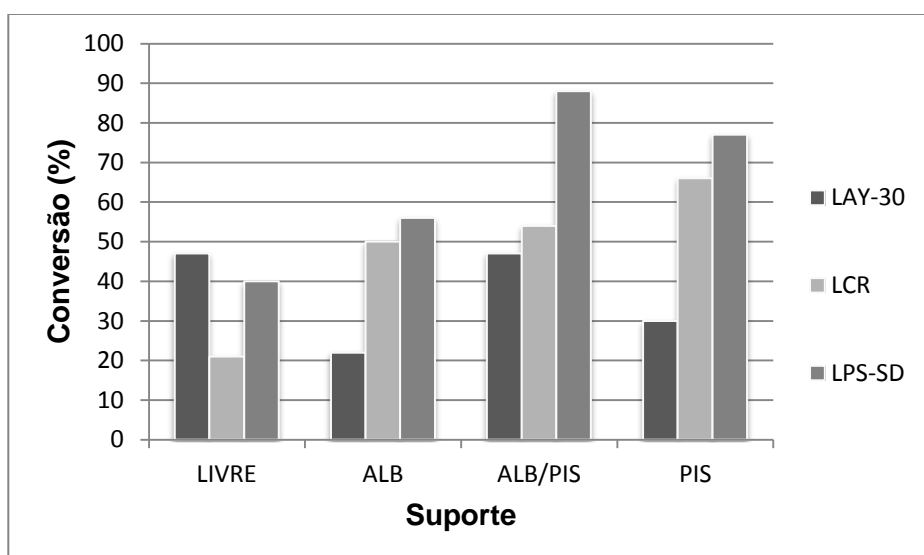
**Figura 10.** Espectro de IV do *n*-propionato de benzila.

### 4.3.3 - Influência do suporte na imobilização das lipases

A combinação de dois ou mais polímeros é chamada de blenda polimérica. Esta técnica fornece propriedades específicas ao material formado, obedecendo a critérios de custos, processabilidade e reciclagem.<sup>63</sup>

Portanto, avaliou-se o efeito da utilização de dois biopolímeros e a mistura destes na proporção 1:1 na preparação do suporte. Estes filmes e/ou blends foram usados para imobilização de três lipases para posterior aplicação na catálise da reação de transesterificação do álcool benzílico (**6**) com *n*-propionato de vinila.

Os resultados de conversão (%) obtidos para esta reação, utilizando as lipases imobilizadas em diferentes suportes estão apresentados na **Figura 10**.



**Figura 11.** Influência do suporte na imobilização das lipases e obtenção do éster **7**. [Álcool benzílico (5mmol), *n*-propionato de vinila (5mmol), lipases (30 mg), hexano (25 mL), 35 °C, 24h].

Em geral, observa-se um aumento na conversão em éster utilizando a enzima imobilizada, com algumas exceções. Ao observar os resultados de conversão em éster com a lipase LAY-30 verifica-se que quando esta é utilizada na sua forma livre, o valor de conversão de 47% é praticamente igual ao obtido com a lipase imobilizada em filme de ALB/PIS, e menor quando imobilizada em filme de ALB e PIS, sendo de 22 e 30% respectivamente. Porém, o uso de enzimas livre não é um método vantajoso, pois a recuperação do biocatalisador ao final da reação pode ser dificultada, aumentando os custos do processo.

Quando a LCR foi utilizada na forma livre, a conversão ao éster **7** foi de apenas 21%. Com a imobilização da LCR, a conversão em éster foi dependente do suporte. Ao usar o

filme de ALB a conversão foi de 50%, e quando utilizada a blenda ALB/PIS (50:50 m/m) o valor foi de 53%. A maior conversão em éster foi obtida quando a LCR foi imobilizada no filme preparado somente com PIS, sendo de 66%.

A utilização da LPS-SD mostrou-se eficiente nas reações de transesterificação. As conversões em produto aumentaram em relação ao suporte, na ausência de suporte. Ao usar a LPS-SD livre, o éster **7** foi obtido com 40% de conversão. A técnica de imobilização promoveu um aumento na conversão, e ao imobilizar a LPS-SD no filme de ALB e de PIS, as conversões foram de 56 e 77%, respectivamente. Utilizando a LPS-SD imobilizada na blenda ALB/PIS (50:50 m/m), o éster foi obtido com 88% em 24h.

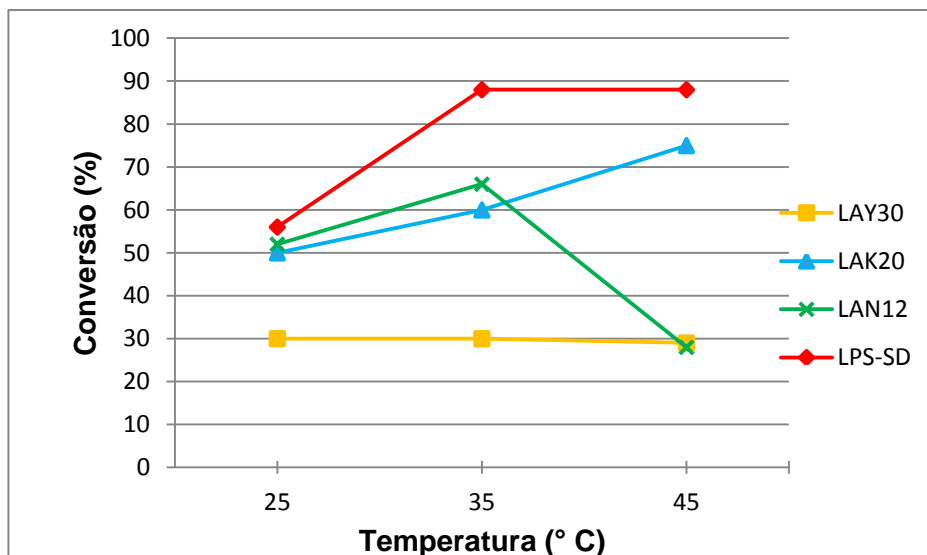
Com bases nestes resultados, observa-se uma tendência experimental, demonstrando que ao imobilizar as lipases em filme de proteína isolada de soja, o éster **7** foi obtido em maior conversão. A influência da PIS na atividade enzimática é devida principalmente à sua natureza proteica que auxilia na estabilidade conformacional da lipase, protegendo-a da desnaturação. Como citado no item **4.2**, o tipo de suporte pode modificar o teor de água necessária para a atividade enzimática.

A comparação dos resultados obtidos na **Figura 10** permite estabelecer algumas diferenças entre o tipo de suporte utilizado para a imobilização. Uma diferença notável foi observada ao utilizar a mistura de ALB E PIS na proporção 1:1, e portanto este suporte foi selecionado para dar continuidade aos estudos. Dentre eles, a influência da temperatura nesta reação.

#### **4.3.4 - Efeito da temperatura**

A temperatura desempenha um papel importante em reações químicas de modo geral, o aumento pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade e melhorar o processo de difusão, entre outros fatores. Em reações biocatalisadas, a temperatura elevada pode alterar a conformação da enzima, o que pode levar à perda de atividade e seletividade.<sup>2,5</sup>

Para avaliar a temperatura ideal neste sistema, e a influência nas reações de transesterificação do *n*-propionato de vinila com **6**, foram utilizadas 30 mg das lipases, LAY-30, LAK20, LAN12 e LPS-SD imobilizadas em filme de ALB/PIS (50:50 m/m). As reações foram realizadas em hexano a 25, 35 e 45 °C. A **Figura 11** mostra os resultados obtidos dos valores de conversão em **7**, em função da temperatura.



**Figura 12.** Variação da conversão em **7** em função da temperatura. [Álcool benzílico (5mmol), *n*-propionato de vinila (5mmol), lipases (30 mg), hexano (25 mL), 25-45 °C, 24h].

Na **Figura 11** é possível observar que as maiores conversões em éster (88%) foram obtidas utilizando a LPS-SD imobilizada na blenda ALB/PIS (50:50 m/m), nas temperaturas de 35 e 45° C. Quando a temperatura de 25° C foi utilizada, as conversões em éster foram menores, sendo de 30-56%. Na temperatura de 45° C provavelmente a estabilidade da lipase LAN12 foi menor, e conseqüentemente a conversão em éster diminuiu significativamente de 66% a 35° C para 28% a 45° C. Ao utilizar a LAK20, a temperatura de 45° C foi favorável para a formação do produto, pois esta enzima apresenta atividade ótima na temperatura de 60° C. Quando a LAY-30 foi utilizada a 45° C, os valores de conversão foram similares aos obtidos nas reações a 25 e 35° C, sendo de 29-30%. Estes resultados destacam que cada lipase tem uma temperatura ótima de atuação.

Portanto, a partir destes dados, a temperatura de 35° C foi selecionada para dar continuidade aos estudos. Dentre eles, verificar a influência da imobilização de duas lipases simultaneamente, “coquetel enzimático”, efeito do solvente orgânico, razão molar do doador acila e o uso de diferentes agentes acilantes.

#### 4.4 - Preparação do *n*-propionato de benzila com duas lipases imobilizadas

##### 4.4.1 - Escolha do coquetel enzimático

Conforme citado, neste trabalho foi estudada a reação de transesterificação do *n*-propionato de vinila com o álcool benzílico. A reação foi também realizada utilizando o coquetel enzimático de LCR e LAY-30 (diferentes proporções) imobilizadas em blendas de ALB/PIS como catalisadores da reação.

Inicialmente, foram imobilizadas as lipases de *C. rugosa* (LCR) e (LAY-30) simultaneamente no filme de ALB/PIS (50/50 m/m). Cada sistema foi preparado mantendo-se constante a massa total das lipases (30mg) em diferentes proporções. A **Tabela 7** apresenta os dados de conversão em **7**, após 24h.

**Tabela 7** - Conversão em **7** utilizando o coquetel enzimático <sup>(a)</sup> formado pelas lipases LCR e LAY-30 imobilizadas em blendas de ALB/PIS (50:50 m/m). <sup>(a)</sup>

Massa das lipases (mg)		Conversão (%) <sup>(b)</sup>
LCR	LAY-30	
0	30	27
10	20	43
15	15	35
20	10	26
30	0	28

Condições de reação: álcool benzílico (5mmol); *n*-propionato de vinila (5mmol); massa total de lipases 30mg; hexano (25mL); 35° C; 24h; (a) (15:15 m/m) ; (b) determinada por <sup>1</sup>H- RMN.

As maiores conversões em éster, utilizando *n*-hexano como solvente, foram obtidas ao usar as lipases LCR/LAY-30 na proporção de 10:20 m/m, com conversão de 43,0%. Não foi observada uma relação direta entre a composição do coquetel enzimático e a conversão em **7**. Estes resultados, porém, não excluem que a imobilização simultânea de duas ou mais lipases de outras procedências possa conduzir a resultados mais promissores em termos de maiores valores de conversão aos produtos.

A partir destes resultados, utilizou-se outro coquetel enzimático, com as lipases de *B. cepacia* (LPS) e de *C. rugosa* (LCR). Os resultados de conversão ao *n*-propionato de benzila estão apresentados na **Tabela 8**.

**Tabela 8** - Conversão em *n*-propionato de benzila (**7**) utilizando o coquetel enzimático <sup>(a)</sup> das lipases *B. cepacia* (LPS) e de *C. rugosa* (LCR), imobilizadas em blendas de ALB/PIS (50:50 m/m).

Massa das lipases (mg)		Conversão (%) <sup>(b)</sup>
LPS	LCR	-----
0	30	48
10	20	62
15	15	77
20	10	77
30	0	88

Condições de reação: álcool benzílico (5mmol); *n*-propionato de vinila (5mmol); massa total de lipases 30mg; hexano (25mL); 35° C; 24h; (a) (15:15 m/m) ; (b) determinada por <sup>1</sup>H- RMN.

Os resultados apresentados na **Tabela 8** mostram que os valores de conversão em éster foram dependentes da composição do coquetel enzimático.

Quando a LCR foi imobilizada isoladamente no filme preparado com amido de lírio-do-brejo e proteína de soja, obteve-se o éster com conversão de 48%. Com a adição de 10mg da LPS no filme de ALB/PIS a conversão aumentou para 62%. Em geral, as conversões em éster aumentaram com o aumento da quantidade de LPS na composição do coquetel enzimático, sendo de 77 a 88%. O aumento na conversão ao utilizar a LPS pode estar relacionado com a atividade desta lipase (30.000U/g) que é maior do que a LCR (746 U mg<sup>-1</sup>). A mistura da LPS/LCR na proporção 1:1 (m/m) foi selecionada para estudos subsequentes, sendo estes, o efeito do melhor suporte para a imobilização, o do solvente orgânico e razão molar do doador acila, bem como a reutilização do suporte.

#### 4.4.2 - Efeito do solvente orgânico

Neste estudo, foi avaliada a influência do solvente orgânico na reação do *n*-propionato de vinila com o álcool benzílico catalisada pelo coquetel enzimático LPS/LCR (15:15 m/m) imobilizado na blenda ALB/PIS (50:50 m/m).

Sabe-se que a quantidade de água em contato com a enzima é essencial para a catálise em solventes orgânicos, isto é explicado pelo fato da água aumentar a mobilidade e a flexibilidade dos sítios ativos e a polarização da estrutura proteica.

Laane e col.<sup>63</sup> discutiram amplamente parâmetros de diversos solventes orgânicos, tais como a constante dielétrica, o momento dipolar e o logaritmo do coeficiente de partição log *P* (coeficiente de partição, que indica a hidrofobicidade do solvente, e é determinado pela



razão entre a concentração do 1-octanol sobre a concentração em água) e concluíram que este último, o  $\log P$ , era o que melhor se correlacionava com a atividade enzimática.

Os solventes hidrofóbicos com  $\log P$  maiores ou igual a 4 são considerados os mais adequados para as reações biocatalisadas. Solventes com  $\log P$  entre 2 e 4 são considerados moderados, e os mais polares, com  $\log P$  menores que 2 são frequentemente desfavoráveis para as reações catalisadas por lipases.<sup>63</sup>

A polaridade do solvente pode também alterar a quantidade de água que mantém a estabilidade da enzima. A **Tabela 9** apresenta os valores de conversão (%) ao éster **7**.

**Tabela 9** - Efeito do solvente orgânico na conversão em *n*-propionato de benzila, catalisada pelo coquetel enzimático LPS/LCR<sup>(a)</sup> imobilizado em filme de ALB/PIS (50:50 m/m)

Solvente	Log $P$ <sup>(b)</sup>	Parâmetro de saúde <sup>(c)</sup>	Conversão (%) <sup>(d)</sup>
Iso-octano	4,51	4	78,0
Hexano	3,5	4	77,0
Ciclohexano	3,2	7	66,0
Éter diisopropílico	1,52	8	76,0
MTBE	1,43	5	63,0
Diclorometano	0,93	4	48,0
Éter etílico	0,83	5	68,0
THF	0,49	8	28,0
Acetona	-0,23	8	32,0
Etanol	-0,24	8	35,0
Acetonitrila	-0,33	6	32,0
DMSO	-1,3	7	30,0

Condições de reação: álcool benzílico (5mmol); *n*-propionato de vinila (5mmol); massa total de lipases 30mg; solvente (25mL), 35° C, 24h. (a) (15:15 m/m) (b) ref 63 (c) ref 64 (d) determinada por <sup>1</sup>H-RMN.

Para possibilitar uma conformação enzimática catalítica funcional em meio orgânico, a enzima deve possuir uma camada de hidratação que separe o solvente do contato com a superfície da proteína e auxilie na sua flexibilidade interna. Quando a água é substituída por um solvente orgânico, a conformação nativa da enzima pode sofrer alterações tanto na estrutura terciária como na estrutura secundária, levando a desestabilização.

Os resultados obtidos mostram que a porcentagem de conversão em éster, foi dependente do solvente orgânico. Usando solventes com valores de  $\log P$  menores que 0,5, ou seja, os mais polares, os produtos foram obtidos em conversões menores (28-35%).

Os solventes com  $\log P$  acima de 1,0, ou seja, os menos polares foram os mais eficientes, formando o éster **7** com maiores conversões (63-78%). Como comentado anteriormente, nas enzimas há uma pequena camada essencial de água que recobre o microambiente enzimático, servindo de proteção entre a superfície da enzima e o solvente orgânico. Em reações conduzidas em ambientes não aquosos, a interação entre o solvente e as moléculas de água presentes na enzima, controla a atividade enzimática. Os solventes que são capazes de alterar a quantidade de água da estrutura proteica inativam a enzima, alterando a atividade catalítica.<sup>2</sup>

Isto explica porque os solventes apolares aumentam a atividade das lipases, pois não há interação significativa com a água necessária para manter a conformação nativa, enquanto que os solventes hidrofílicos removem esta camada de água ao redor da enzima, causando a perda da atividade.

Além dos critérios citados acima para a escolha do solvente em reações catalisadas por enzimas, também é importante a biocompatibilidade.

Por razões tanto ambientais quanto de saúde, a Química tem a obrigação de aperfeiçoar seus métodos de síntese, de forma a obter o produto desejado com o máximo de conversão e a mínima agressão ao meio ambiente. Dentro do conceito de química limpa (*Química verde*), sempre que possível devem ser utilizados solventes que possuem pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente. Uma maneira de medir a toxicidade de um solvente é usando o parâmetro de saúde.<sup>64</sup>

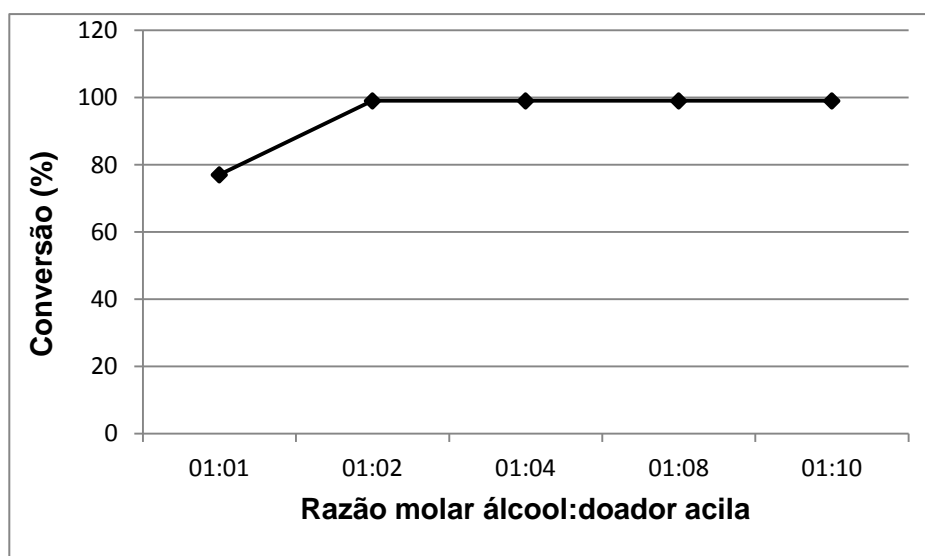
O parâmetro de saúde é uma escala que mostra o nível de toxicidade dos solventes para o corpo humano durante longos períodos de exposição. Como valor máximo na escala tem-se a água com parâmetro igual a 10, sendo o mais benéfico para a saúde humana. Os solventes ideais são aqueles com valores entre 8 e 10. Os valores de 4 a 7 são considerados intermediários em relação à exposição, e <4 devem ser abandonados e substituídos por outros solventes menos tóxicos.

Observa-se que os valores do parâmetro de saúde apresentados na **Tabela 9** mostram que o *n*-hexano e o *iso*-octano estão no limite de toxicidade (4) e estes solventes formaram o éster **7** com maiores porcentagens de conversão, sendo de 77 e 78% respectivamente. Para a reação utilizando o éter diisopropílico, cujo parâmetro de saúde é 8, o valor de conversão em éster também foi elevado, sendo de 76%.

#### 4.4.3 - Efeito da razão molar do doador acila

A afinidade entre o doador acila e a enzima é de grande importância para a formação do intermediário acil-enzima. Devido às suas características, os ésteres vinílicos (acetatos e propionatos de vinila) são amplamente usados como agentes acilantes em reações de transesterificação.<sup>2</sup> Normalmente, são empregados ésteres vinílicos, pois o enol formado após a acilação do resíduo reativo da tríade catalítica é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável e volátil. Esta estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos por impedir uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa e o substrato. A razão molar entre o álcool e doador acila também é um parâmetro importante a ser investigado, pois espera-se que um aumento na concentração do doador acila desloque o equilíbrio para formação dos produtos.

Na acilação do álcool benzílico (**6**) catalisada pelo coquetel enzimático de LPS/LCR, foi utilizado como doador acila o *n*-propionato de vinila. Além disso, foi também avaliada a variação da razão molar entre (**6**) e do doador acila nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:10. A **Figura 10** mostra a variação na conversão (%) em função da razão molar do doador acila.



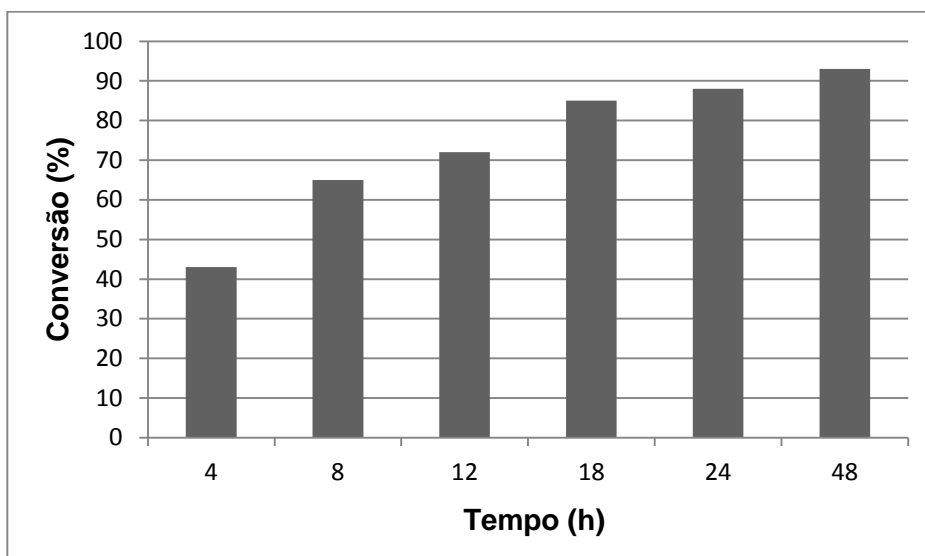
**Figura 13.** Efeito da razão molar álcool:doador acila. [álcool benzílico (5mmol), *n*-propionato de vinila (5-50mmol), lipases (30 mg) (LPS/ LCR 15:15 m/m), hexano (25 mL), 35 °C, 24h].

Na **Figura 12**, observa-se que a conversão em éster aumentou conforme as razões molares aumentaram. Na proporção 1:1 dos reagentes, a conversão em produto foi de 77% em 24h, e ao usar as outras razões molares (1:2, 1:4, 1:8, 1:10), foi >99%, no mesmo tempo

reacional. Em todas as reações estudadas utilizando os ésteres vinílicos, observou-se mudança de coloração dos filmes e/ou blendas que continham a PIS. Provavelmente, este efeito de mudança de cor do filme, é resultado da reação do acetaldeído com os resíduos de lisina presentes na proteína de soja.

#### 4.4.4 - Efeito do tempo

Para avaliar a influência do tempo na conversão em **7**, foram preparadas seis reações idênticas, com quantidades equimolares (5 mmol) de álcool benzílico e de *n*-propionato de vinila, utilizando o coquetel LPS/LCR (15:15 m/m) imobilizado em filme de ALB/PIS (50:50 m/m) a 35 °C, *n*-hexano como solvente, e tempos reacionais de (4, 8, 12, 18, 24 e 48h). A **Figura 13** mostra os resultados obtidos de conversão em **7** em função do tempo.



**Figura 14.** Efeito do tempo. [álcool benzílico (5mmol), *n*-propionato de vinila (5mmol), lipases (30 mg) (LPS/ LCR 15:15 m/m), hexano (25 mL), 35 °C, 4-48h].

Após quatro horas de reação, o éster **7** foi obtido com 43% de conversão. Esta conversão foi aumentando com o tempo sendo que em 12h foi de 72%. Após 18 e 24h de reação, as conversões forma similares sendo de 85 e 88 %. Após 48h o éster **7** foi obtido com 93% de conversão. Salienta-se que as condições reacionais são suaves.

#### 4.4.5 - Reutilização e estocagem dos sistemas biocatalíticos

Uma das principais vantagens da utilização de métodos de imobilização para as enzimas em reações biocatalisadas é a possibilidade de reutilização destes sistemas catalíticos. Para avaliar a eficiência da reutilização do coquetel enzimático imobilizado, foram feitas reutilizações, após estocagem do sistema em *n*-hexano em períodos distintos e avaliou-se a manutenção da atividade catalítica das lipases de *Burkholderia cepacia* e de *Candida rugosa* imobilizadas simultaneamente nos filmes de amido de lírio-do-brejo, proteína isolada de soja e na blenda ALB/PIS (50:50 m/m). Estes sistemas foram utilizados, após 7, 48 e 60 dias de armazenamento em *n*-hexano a temperatura ambiente. A **Tabela 10** mostra os resultados obtidos após reusos do suporte para a obtenção de **7**.

**Tabela 10** - Efeito da reutilização do coquetel enzimático LPS/LCR <sup>(a)</sup> imobilizado no suporte de ALB na conversão em *n*-propionato de benzila. <sup>(a)</sup>

Massa das lipases (mg)		Conversão (%) <sup>(b)</sup>	1º Reuso <sup>(c)</sup>	2º Reuso <sup>(d)</sup>	3º Reuso <sup>(e)</sup>
LPS	LCR	-----	-----	-----	-----
0	30	53	52	50	42
10	20	70	52	48	45
15	15	63	51	48	45
20	10	74	63	59	53
30	0	76	62	60	55

Condições de reação: álcool benzílico (5mmol); *n*-propionato de vinila (5mmol); massa total de lipases 30mg; hexano (25mL); 35° C; 24h. (a) (15:15 m/m). (b) Conversão da primeira utilização determinada por <sup>1</sup>H-RMN. (c) Estocagem: 7 dias. (d) Estocagem: 48 dias. (e) Estocagem: 60 dias.

Na primeira utilização, as conversões em **7** variaram de 53-76%, dependendo da massa de LPS presente no coquetel enzimático. A menor conversão no primeiro uso foi de 53,0% com 30 mg de LCR e a maior de 76% com 30 mg LPS. Este resultado demonstra que a conversão em éster foi dependente da atividade da lipase utilizada. Após esta primeira reação, foram feitas mais três reutilizações, também em 24h de reação. As conversões variaram de 52-63%, sendo que a menor foi de 51% com o sistema LCR/LPS (50:50 m/m) no primeiro reuso, após 7 dias de estocagem, e a maior foi de 60% com 30 mg de LPS-SD, no segundo reuso, após 48 dias. Para a terceira reutilização, os filmes foram estocados com *n*-hexano por um período de 60 dias. Após esse período, as conversões variaram de 42-

55%, sendo que a menor conversão em **7** foi de 42% ao utilizar 30 mg de LCR e a maior de 55% com 30 mg da LPS, em 24 h. Ao utilizar a mistura destas enzimas na proporção 1:1 “coquetel enzimático”, o produto foi obtido com 51, 48 e 45% de conversão, após 7, 48 e 60 dias de armazenamento, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos quando as lipases foram imobilizadas em filme de PIS, plastificado com sorbitol. (**Tabela 11**).

**Tabela 11** - Efeito da reutilização do coquetel enzimático LPS/LCR<sup>(a)</sup> imobilizado no suporte PIS na conversão em *n*-propionato de benzila.<sup>(a)</sup>

Massa das lipases (mg)		Conversão (%) <sup>(b)</sup>	1º Reuso <sup>(c)</sup>	2º Reuso <sup>(d)</sup>	3º Reuso <sup>(e)</sup>
LPS	LCR	-----	-----	-----	-----
0	30	33	42	30	28
10	20	59	60	65	60
15	15	59	55	66	65
20	10	70	65	60	58
30	0	82	80	75	71

Condições de reação: álcool benzílico (5mmol); *n*-propionato de vinila (5mmol); massa total de lipases 30mg; hexano (25mL); 35° C; 24h. (a) (15:15 m/m). (b) Conversão da primeira utilização determinada por <sup>1</sup>H- RMN. (c) Estocagem: 7 dias. (d) Estocagem: 48 dias. (e) Estocagem: 60 dias.

Pode-se observar que na primeira utilização, após 24h de reação, as conversões ao produto **7** variaram de 33-82%, sendo que a menor foi de 33% com 30 mg de LCR e a maior de 82% com 30 mg de LPS-SD. O coquetel na proporção 1:1, imobilizado neste suporte formou o produto com 59% de conversão, em 24h. Após este primeiro uso, foi realizado mais três reuso. O primeiro foi após 7 dias, o segundo após 48 dias, e o último após 60 dias. As conversões variaram de 28-80%, sendo que a menor foi de 28% com 30 mg de LCR na terceira reutilização, e a maior de 80% com 30 mg da LPS-SD na primeira reutilização.

Nota-se que em algumas reutilizações dos sistemas LCR/LPS/PIS obtiveram-se conversões ao produto **7** maiores do que no uso anterior. Este é um resultado inesperado, pois é previsto a manutenção ou diminuição da atividade catalítica da enzima após o uso. Pode-se explicar esse fato através da lavagem não adequada dos filmes, podendo ter ficado produto e/ou reagentes das reações anteriores.

As blendas ALB/PIS também foram estocadas em *n*-hexano, a temperatura ambiente para serem reutilizadas novamente em um período de até 60 dias de estocagem. **Tabela 12**.

**Tabela 12** - Efeito da reutilização do coquetel enzimático LPS/LCR<sup>(a)</sup> imobilizado no suporte ALB/PIS (50:50 m/m) na conversão em *n*-propionato de benzila.<sup>(a)</sup>

Massa das lipases (mg)		Conversão (%) <sup>(b)</sup>	1º Reuso <sup>(c)</sup>	2º Reuso <sup>(d)</sup>	3º Reuso <sup>(e)</sup>
LPS	LCR				
0	30	48	45	42	28
10	20	62	66	62	46
15	15	77	75	86	60
20	10	77	70	88	80
30	0	88	78	77	60

Condições de reação: álcool benzílico (5mmol); *n*-propionato de vinila (5mmol); massa total de lipases 30mg; hexano (25mL); 35° C; 24h. (a) (15:15 m/m). (b) Conversão da primeira utilização determinada por <sup>1</sup>H-RMN. (c) Estocagem: 7 dias. (d) Estocagem: 48 dias. (e) Estocagem: 60 dias.

A conversão em **7** variou de 45-78% no primeiro reuso, mantendo os valores de conversão próximo aos da primeira utilização que foram de 48-88%

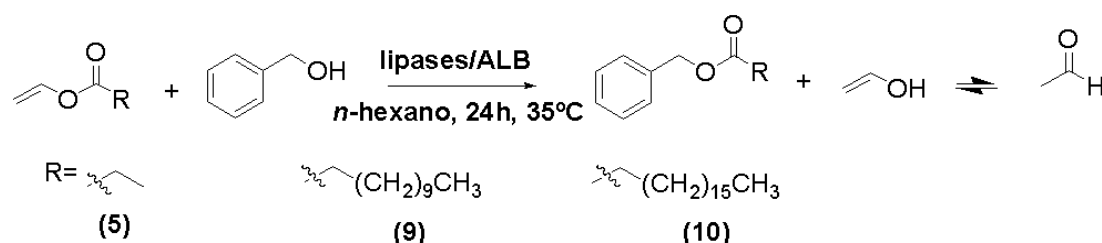
Com a reutilização das lipases imobilizadas após 48 dias, observou-se um pequeno aumento na conversão em **7**. Pode-se explicar este resultado devido à presença de traços dos substratos oriundos das utilizações anteriores e que não foram totalmente removidos, mesmo após as sucessivas lavagens dos filmes.

Após um tempo maior de armazenamento, os sistemas apresentaram-se menos eficientes, formando o éster **7**, com conversões de 28-80%. Os resultados mostraram a possibilidade de reutilizar o coquetel enzimático mesmo após 60 dias de estocagem evidenciando a vantagem da imobilização das lipases nos biopolímeros testados. A atividade catalítica das duas lipases pode ter diminuído em razão da liberação *in-situ* de acetaldeído que ao reagir com os resíduos de aminoácidos presentes na enzima causa a desnaturação. No entanto, as lipases mantiveram-se ativas devido à proteção conferida pelo suporte e a presença de certa quantidade de água nos filmes é importante para preservar a estrutura terciária da enzima, bem como a do sítio ativo.

#### 4.4.6 - Efeito de diferentes agentes acilantes

A afinidade entre o doador acila e a enzima é de grande importância para a formação do intermediário “acil-enzima”. Devido as suas características, os ésteres vinílicos são amplamente usados como agentes acilantes em reações de esterificação, transesterificação, devido à alta reatividade e irreversibilidade da reação.<sup>2</sup>

Para a reação de transesterificação do álcool benzílico, além do *n*-propionato de vinila, foram usados também outros doadores acila, sendo estes o laurato e o estearato de vinila. Nas reações do álcool benzílico com laurato e estearato de vinila, foi utilizada a razão molar álcool:doador acila 1:1, a 35° C em *n*-hexano. Utilizou-se o coquetel enzimático de LPS/LCR (15:15 m/m) imobilizadas no filme de amido de lírio-do-brejo como catalisador. ( **Esquema 5** )



**Esquema 5.** Reação do álcool benzílico com diferentes agentes acilantes.

Os resultados da conversão em éster em 24h estão apresentados na **Tabela 13**.

**Tabela 13** - Influência do doador acila na obtenção de diferentes ésteres derivados do álcool benzílico.

Doador acila	Conversão (%) <sup>(a)</sup>	
	1º Uso	Reuso <sup>(b)</sup>
<i>n</i> -propionato de vinila (5)	63	51
laurato de vinila (9)	36	30
estearato de vinila (10)	28	14

Condições de reação: doador acila (5mmol), álcool benzílico (5mmol), lipases 30mg, hexano (25mL), 35° C, 24h. (a) determinada por RMN de <sup>1</sup>H. (b) Estocagem: 7 dias.

Conforme os resultados apresentados na **Tabela 13**, observa-se que ao usar reagentes acilantes com cadeias maiores tais como o laurato (C12) e estearato (C18) de vinila, as conversões aos correspondentes ésteres foram menores, sendo de 36 e 28%, respectivamente, quando comparados com o obtido na reação com *n*-propionato de vinila (C3), sendo de 63%. Este resultado, provavelmente é devido ao impedimento estérico da cadeia alquílica do doador acila e à dificuldade de acesso destas moléculas ao sítio ativo da enzima.



## 5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

- A extração do amido de lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*) mostrou-se viável, sendo possível obter 80g deste polissacarídeo a partir de 1,5Kg de rizomas.
- Os filmes de amido de lírio-do-brejo (ALB), proteína isolada de soja (PIS) e das misturas de (ALB/PIS) foram preparados contendo sorbitol e  $\beta$ -ciclodextrina, mostraram-se resistentes e maleáveis, e foram eficientes na imobilização das lipases LPS-SD, LCR, LAY30, LAYS, F-AP15, LAN-12, LAK, LAK-20, LM 10, PPL.
- A quantidade de água nos filmes com e sem a lipase, variou de 2,67-9,08%, contribuindo para a manutenção da atividade catalítica.
- Ao usar as lipases LAY-30, LCR, LPS-SD imobilizadas ou não nos filmes e/ou blendas de ALB e PIS, as conversões em **7** foram de moderadas a boas. As maiores conversões foram obtidas ao usar o filme de ALB/PIS com a LPS-SD, sendo de 88%. Em quantidades equivalentes de proteína de soja (50%) no filme, as conversões aumentaram.
- A temperatura mais adequada para a reação de obtenção de **7**, foi de 35° C e tempo reacional de 24h.
- Quando imobilizadas simultaneamente na mesma proporção as lipases LPS-SD e LCR mostraram-se eficientes, formando **7** com conversão de 77%.
- O uso de diferentes solventes influenciou na conversão em **7**. Usando DMSO, acetonitrila, acetona, diclorometano, etanol e THF, as conversões foram moderadas (28-48%). Ao usar éter etílico, éter diisopropílico, ciclohexano, hexano, iso-octano e MTBE, as conversões em **7** foram maiores (63-78%).
- Nas reações do álcool benzílico com diferentes doadores acilas, os laurato e estearato de vinila, foram obtidos com conversões de 36-28%, respectivamente.
- A reutilização do sistema enzima/ALB/PIS na reação de transesterificação mostrou ser eficiente. Foram obtidas boas conversões em **7** (48-88%) após 60 dias de estocagem, mostrando pouca alteração na atividade catalítica das lipases após imobilização.
- A partir dos resultados obtidos neste trabalho comprova-se que a utilização de filme de ALB/PIS como suporte para imobilização de lipases é altamente benéfico. Além de desempenhar a função na imobilização de lipases, o amido de lírio-do-brejo é um material sem custo. Este pode ser obtido de fontes renováveis e é biodegradável, o que faz deste suporte economicamente viável e sem grandes impactos para o meio ambiente.
- Finalizando, foram avaliados e verificada a influência de diversos parâmetros reacionais nas reações catalisadas por lipases livres e/ou imobilizadas.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger: Principles of Biochemistry, 6th ed. USA, W.H. Freeman, **2013**.
- 2 - Faber, K.; Biotransformation in Organic Chemistry, 6th ed., Springer-Verlag: Heidelberg, **2011**.
- 3 - Campbell, M. K.; Farrell, S. O. Bioquímica. São Paulo: Cengage Learning, **2007**.
- 4 - Bishop, Michael L.; Fody, Edward P.; Schoeff, Larry E. Química clínica: princípios, procedimentos, correlações. 5. ed. Barueri, SP: Manole, **2010**.
- 5 - Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M. Engenharia Enzimática. 1ª ed. Lisboa: Lidel, Cap. 1, p. 1-4, Cap. 2, p. 26. **2003**.
- 6 - Yoshikawa, M. et al. Exorphins. Handbook of Biologically Active Peptides, Elsevier p.1570-1576, **2013**.
- 7 - de Oliveira, L. G.; Mantovani, S. M. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 742-756, **2009**
- 8 - Pellis, A. et al. N. *Biotechnol.*, **2017**. (in press)
- 9 - Salihu, A.; Alam, M. Z. *Process Biochem.*, 50, 1, 86-96, **2015**.
- 10 - Javed, S. et al.; *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1-12, ago. **2017**.
- 11 - Mala, J. G. S.; Takeuchi, S. *Anal. Chem. Insights*, 3, 9-19, **2008**.
- 12 - Klähn, M. et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 4, 1649-1662, **2011**.
- 13 - Kapoor, M.; Gupta, M. N. *Process Biochem.*, 47, 4, 555- 569, **2012**.
- 14 - Kaushik, P. et al. *Synth Comm.* 45, n. 5, 569-577, **2014**.
- 15 - Magnusson, C. D.; Haraldsson, G. G. *Chem. Phys. Lipids*, 165, 7, 712-720, **2012**.
- 16 - Gholivand, S. et al. *Chem. Cent. J*, 11, 44, 1-10, **2017**.
- 17 - Barriuso, J. et al. *Biotechnol. Adv.* 34, 5, 874-885, **2016**.
- 18 - Angajala G.; Pavan, P.; Subashini, R.; *Biocatal. Agric. Biotech.* 7, 257-270, **2016**.
- 19 - Bassanini, I. et al.; *J. Org. Chem.*, 11, 1583–1595, **2015**.
- 20 - Sugiyama, K. et al.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2017** ( in press)
- 21 - Kawanishi, S. et al.; *Green Chem.* 19, 2, 411-417, **2017**.
- 22 - Gérard, D. et al.; *Tetrahedron: Asymm.* 28, 3, 433-441, **2017**.
- 23 - Germinario, G. et al.; *Prog. Org. Coat.*, 110, 162-171, **2017**.
- 24 - Amoah, J., et al.; *Biores. Technol.*, 211, 224-230, **2016**.
- 25 - Lee, J. H. et al. *Biores. Technol.*, 102, 2, 2105-2108, **2011**.
- 26 - Poppe, J. K. et al. *Appl. Catal., A*, 490, 50–56, **2015**.
- 27 - Tongboriboon, K. et al. *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 67, 52–59, **2010**.
- 28 - Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzym. Microb. Technol.*, 40, 6, 1451-1463, **2007**.
- 29 - Sheldon, R. A.; van Pelt, S. *Chem Soc. Rev*, 42, 6223-6235, **2013**.
- 30 - Brady, D.; Jordaan, J., *Biotechnol. Lett.*, 31, 11, 1639-1650, **2009**.

- 31 - Cantone, S., Ferrario, V.; Corici, L.; Ebert, C.; Fattor, D.; Spizzoa, P.; Gardossi L. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6262-6276, **2013**.
- 32 - Dwevedi, A., *Enzyme Immobilization*, Switzerland, Springer International Publishing, **2016**.
- 33 - Neira, H. D.; Herr, A. E. *Anal. Chem.* 89, 19, 10311-10320, **2017**.
- 34 - Hoffmann, I.; Silva, V. D.; Nascimento, M. G.. *J. Braz. Chem. Soc.*, 22, 8, 1559-1567, **2011**.
- 35 - Cazón, P. et al. *Food Hydrocol.*, 68, p.136-148, **2017**.
- 36 - da Silva J. M. R.; Nascimento, *Quím. Nova*, 37, 6, p.1022-1027, **2014**.
- 37 - Cao, S. et al. *Sci. Rep.*, v. 6, 1, 1-12, **2016**.
- 38 - Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R.; *Química de Alimentos de Fenemma*, Porto Alegre, 4ª Ed, Artmed, **2010**.
- 39 - Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. *Introdução à Química de Alimentos*. 3. ed. rev. atual. São Paulo, Varela, **2003**.
- 40 - BeMiller, J.; Whistler R.; *Starch: Chemistry and Technology*, 3<sup>rd</sup> Ed, USA, Elsevier, **2009**.
- 41 - Wang, K. et al. *J. Sci. Food. Agric.*, 97, 11, 3613-3622, **2017**.
- 42 - Saulino, H. H. L.; Trivinho-Strixino, S. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 61, 1, 60-68, **2017**.
- 43 - de Castro, W.A.C. et al. *Environ. Exp. Bot.*, 127, 55–62, **2016**.
- 44 - Hartati R. et al. *Procedia. Chem.*, 13, 150 – 163, **2014**.
- 45 - Kalimuthu K. et al. *Process. Saf. Environ. Prot.*, 109, 82-96, **2017**.
- 46 - Zink J. et al. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 1376, **2016**.
- 47 - [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_04\\_17\\_17\\_20\\_55\\_boletim\\_graos\\_jun\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_17_17_20_55_boletim_graos_jun_2017.pdf) (acesso em 14/11/2017, 18:04)
- 48 - R.R. Koshy et al. *Food Hydrocol.*, 50, 174-192, **2015**.
- 49 - Nishinari, K. et al. *Food Hydrocol.*, 39, 301-318, **2014**
- 50 - Sinding, C. et al. *Flavour Sci. Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium*, 27-31, **2014**.
- 51 - Garlapati, V. K.; Banerjee, R. *Enzym.Res.*, v. 2013, p.1-6, **2013**.
- 52 - Schubert, M.; Hansson, B. S.; Sachse, S. *Front. Physiol.*, 5, 59, 1-13, **2014**.
- 53 - Tomke, P. D.; Rathod, V. K. *Ultrason. Sonochem.*, 27, 241-246, **2015**.
- 54 - Ozaki, H. et al. *Food. Chem. Toxicol.*, 86, 116-123, **2015**.
- 55 - Khan. R.; Rathod V. K.; *Process Biochem.*, 50, 1793–1806, **2015**.
- 56 - McGinty, D.; Letizia, C.S.; API, A.M.. *Food. Chem. Toxicol.*, 50, p.486-490, **2012**.
- 57 - Morita, T.; Assumpção, R.M.V. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*. 2a Ed.. São Paulo : Edgard Blucher LTDA,. p. 316, **1972**.
- 58 - Madhu, S. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 28, 8032-8035, **2016**.

- 59 - Ascheri, D. P. R. et al. *Pesq. Agropecu. Trop.*, 40, 2, 159-166, 14, **2010**.
- 60 - Laage, D; Elsaesser, T; Hynes, J. T. *Chem. Rev.*, 117, 16, 10694-10725, **2017**.
- 61 - Barros, M; Macedo, G. A. *Food Sci. Biotechnol.* 20, 5, 1195-1201, **2011**.
- 62 - Silverstein, R. M., Webster, F. X., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 7ª. Ed. LTC Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, **2006**.
- 63 - Lamantia, F. et al. *Polym. Degrad. Stab.*, 145, p.79-92, **2017**.
- 64 - Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C., *Biotechnol. Bioeng.*, XXX, 81- 87. **1987**.
- 65 - Henderson R. K. et al, *Green Chem.*,13, 854-862, **2011**.