



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Curso de Pós-Graduação em Química

Imobilização de Lipases em Materiais Poliméricos:
Aplicações na Síntese de Ésteres

Roberto Dalla Vecchia

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Em Química da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial para a
Obtenção do título de Doutor em Química.

Roberto Dalla Vecchia

Imobilização de Lipases em Materiais Poliméricos:
Aplicações na Síntese de Ésteres

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em Química Orgânica
no programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 07 de maio de 2004.

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Coordenador do Curso

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Maria da Graça Nascimento
Orientadora

Prof. Dr. Valdir Soldi
Co-orientador

Prof^ª. Dra. Nadia Krieger
DQ-UFPR

Prof. Dr. Pedro O. Volpe
IQ-UNICAMP

Prof^ª. Dra. Iolanda da Cruz Vieira
DQ-UFSC

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
DQ-UFSC

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
DQ-UFSC

*Aos meus pais pela vida, ao segundo pai Mario,
à segunda mãe Neuza.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Elena Maria e Belarmino pela base familiar que me proporcionaram e pela vida. Continuem zelando por mim. Fiquem com Deus!

Aos nove irmãos obrigado por estarem em minha vida.

À minha orientadora Prof.^a Maria da Graça Nascimento, pela orientação dedicada neste trabalho e pelas oportunidades que me proporcionou. Minha imensa gratidão, respeito e carinho. Obrigado! Do filho mais velho.

Ao Prof. Valdir Soldi pela co-orientação neste trabalho.

Aos “velhos” e novos amigos do grupo de Biocatálise, pelo tempo de trabalho, conversas, brincadeiras e verdadeiras amizades conquistadas, sendo muito mais que um simples ambiente de trabalho. Em especial a Sandra, Neide e Marcelo.

A Gisele e Damianni pela colaboração.

Aos secretários da pós-graduação, Graça e Jadir, por serem sempre tão prestativos e atenciosos.

Aos funcionários do Depto. de Química, em especial Marli Soldi pelas análises.

Aos professores, do Depto. de Química, que além de transmitir seus conhecimentos, transmitiram a sua experiência. Obrigado!

Aos grandes amigos que tiveram presença marcada nos bons momentos e também nos mais difíceis durante todos estes anos. Vocês com certeza estarão sempre no meu coração.

Aos amigos Albertina e Rogério por estes anos de amizade e companheirismo.

Aos amigos da UNIVALI, em especial do Curso de Farmácia.

Aos professores, por terem gentilmente aceitado fazerem parte da banca examinadora deste trabalho. Exprimo aqui o meu reconhecimento.

Agradeço ao Departamento de Química e a Pós Graduação em Química da UFSC, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A UFSC, UNIVALI, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ESQUEMAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Enzimas.....	1
1.2.Lipases.....	8
1.2.1. Classificação e Fontes.....	8
1.2.2. Estrutura e Mecanismo.....	9
1.2.3. Vantagens do uso de lipases em Química Orgânica.....	13
1.3.Métodos de imobilização de enzimas.....	14
1.4.Parâmetros que influenciam na imobilização de enzimas.....	16
1.5.Métodos de imobilização de lipases.....	22
1.5.1. Imobilização via ligação: adsorção.....	22
1.5.2. Modificação por ligação covalente no suporte ou por ligação cruzada.....	29
1.5.3. Confinamento em matriz polimérica ou em cápsulas.....	34
1.6.Resolução via Enzimática.....	40
1.7.Métodos Analíticos para a Determinação da Pureza Enantiomérica.....	42
1.7.1. Método polarimétrico.....	42
1.7.2. Cromatografia gasosa.....	43
1.7.3. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	44
1.7.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN).....	45
2.JUSTIFICATIVA.....	46
3.OBJETIVOS.....	48

3.1. Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivos Específicos.....	48
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	50
4.1. Materiais e Reagentes.....	50
4.2. Preparação dos Materiais Poliméricos.....	54
4.2.1. Imobilização dos preparados enzimáticos em filmes de carbóximetilcelulose (CMC).	54
4.2.2. Imobilização dos preparados enzimáticos em filmes de poli(álcool vinílico) (PVA) e poli(1-vinilpirrolidona-co-acetato de vinila) (P(PV-co-AV)).....	54
4.2.3. Imobilização dos preparados enzimáticos em blendas de CMC/PVA	55
4.2.4. Imobilização dos preparados enzimáticos em filmes de galactomanana (GAL) e xantana (XAN).....	55
4.2.5. Imobilização dos preparados enzimático em blendas de GAL/XAN.....	55
4.2.6. Imobilização dos preparados enzimático em filmes de poli(ácido acrílico)(PAA).....	56
4.2.7. Imobilização dos preparados enzimático em filmes de poli(4-estirenosulfonato de sódio) (PSS).....	57
4.2.8. Imobilização dos preparados enzimáticos em blendas de PSS/PEO.....	57
4.3. Preparação do meio reacional – Procedimento Geral.....	57
4.4. Determinação da porcentagem de conversão e caracterização dos produtos.....	58
4.5. Caracterização dos materiais poliméricos.....	59
4.6. Medidas de dessorção.....	60
4.7. Determinação da quantidade de água.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1. Seleção dos polímeros e estabilidade.....	62
5.2. Caracterização dos suportes.....	62
5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	63
5.2.2. Análises Térmicas.....	66
5.2.3. Medidas de dessorção.....	74
5.2.4. Determinação da quantidade de água nos polímeros.....	75

5.3.Síntese do laurato de n-butila catalisada por lipases de diferentes fontes imobilizadas em filmes poliméricos e blendas.....	78
5.4.Influência do tempo reacional.....	88
5.5.Estudo da variação de massa da lipase.....	89
5.6.Efeito da variação da temperatura.....	90
5.7.Estudo da variação da concentração dos substratos.....	95
5.8.Efeito do solvente externo.....	98
5.9.Reutilização e tempo de estocagem do biocatalisador.....	101
5.10.Efeito do doador acila.....	103
5.11.Efeito do tamanho da cadeia do álcool.....	108
5.12.Aplicações preliminares em resolução.....	113
6.CONCLUSÕES.....	117
7.PERSPECTIVAS.....	120
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo esquemático da reação entre uma enzima e substrato.....	5
Figura 2.	Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida rugosa</i> , e ampliação do sítio ativo.....	11
Figura 3.	Métodos de imobilização de enzimas.....	16
Figura 4.	Relação mutua entre os vários componentes envolvidos em uma reação biocatalisada na presença de solvente orgânico.....	17
Figura 5.	Dois tipos de modificadores: (a) em forma de cadeia PEG ₁ e PEG ₂ ; (b) em forma de “pente” PM ₁₃ e PM ₁₀₀	31
Figura 6.	Estrutura dos monômeros que formam a membrana poli(HEMA-MAPA)...	35
Figura 7.	Silanos utilizados na preparação de sol-gel para imobilização de lipases.....	37
Figura 8.	Micrografias:(a) CMC puro aumento de 150x, (b)LRO imobilizada em CMC aumento de 150x, (c) PVA puro aumento de 100x, (d) LRO imobilizada em PVA aumento de 100x (e) GAL pura aumento de 50x, (f) LRO imobilizada em GAL aumento de 50x.....	64
Figura 9.	Micrografia da LMJ imobilizada em (a) CMC aumento de 25x (b)PVA aumento de 25x (c) e (d) PSS aumento 1000x e 2000x (e) GAL aumento de 50x (f) XAN aumento de 25x.....	65
Figura 10.	Curvas de decomposição térmica (TGA) e derivada da curva de decomposição térmica (DTG) da lipase de <i>R. oryzae</i> e não imobilizada.....	67
Figura 11.	Curvas de decomposição térmica da carboximetilcelulose (CMC) pura e da <i>R. oryzae</i> imobilizada em CMC.....	68
Figura 12.	Derivada da curva de decomposição térmica da carboximetilcelulose (CMC) pura e da <i>R. oryzae</i> imobilizada em CMC.....	68
Figura 13.	Curvas de decomposição térmica do poli (álcool vinílico) (PVA) puro e da <i>R. oryzae</i> imobilizada em PVA.....	69
Figura 14.	Derivada da curva de decomposição térmica do poli (álcool vinílico) (PVA) puro e da <i>R. oryzae</i> imobilizada em PVA.....	70
Figura 15.	Curvas de decomposição térmica da blenda de CMV/PVA e da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada na blenda de CMC/PVA.....	71

Figura 16. Derivada da curva de decomposição da blenda CMC/PVA da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada na blenda de CMC/PVA.....	71
Figura 17. Curvas de decomposição térmica da blenda de poli(4-estirenosulfonato de sódio):poli(óxido de etileno) (80:20) e da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada na blenda.....	72
Figura 18. Derivada da curva de decomposição da blenda de poli(4-estirenosulfonato de sódio):poli(óxido de etileno) (80:20) e da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada na blenda.....	73
Figura 19. Efeito da variação do tempo de reação para a esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada por LRO e LMJ livre e imobilizada em CMC. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 37°C em n-hexano.....	88
Figura 20. Efeito da variação de massa da LRO em diferentes sistemas de imobilização na esterificação do ácido láurico com n-pentanol. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 24h, 37°C em n-hexano.....	89
Figura 21. Influência da variação de temperatura na esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada por lipases de diferentes fontes imobilizadas em CMC. [ácido] e [álcool] = 0,1M, tempo 24h, em n-hexano.....	91
Figura 22. Influência da variação de temperatura na esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada pela LRO na forma livre e imobilizada em CMC, PVA e blenda de CMC/PVA. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 24h, em n-hexano.....	93
Figura 23. Influência da variação de temperatura na esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada pela LMJ na forma livre e imobilizada em CMC, PVA e blenda de CMC/PVA. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 24h, em n-hexano.....	93
Figura 24. Efeito da concentração dos substratos em quantidades equimolares na reação de esterificação catalisada pela LRO/CMC, em n-hexano a 37°C, 24h.....	95
Figura 25. Efeito da concentração de ácido láurico:n-pentanol em quantidades equimolares na reação de esterificação catalisada pela LRO/CMC, em n-hexano a 37°C, 24h.....	96

Figura 26. Efeito da concentração de n-pentanol na reação de esterificação catalisada pela LRO/CMC. [ácido láurico] = 0,1 M em n-hexano a 37°C, 24h.....	97
Figura 27. Efeito da variação da polaridade do solvente na esterificação do ácido láurico com n-pentanol com lipases imobilizadas em diferentes polímeros. [ácido] e [álcool] = 0,1M, [enzima] = 50mg, 24h, 37°C.....	99
Figura 28. Influência do tempo de estocagem e reutilização na esterificação do ácido láurico com n-pentanol com a LRO na forma livre e imobilizada em diferentes suportes. [ácido] e [álcool] = 0,1M, [LRO] = 50 mg, 24h, 37°C em n-hexano.....	102
Figura 29. Efeito do comprimento da cadeia do doador acila na reação de esterificação com n-pentanol: [ácido] 0,1M. [álcool] 0,1M, solvente: n-hexano, 37°C, 24h.....	104
Figura 30. Efeito da presença de insaturações na cadeia do doador acil na reação de esterificação com n-pentanol: [ácido] 0,1M. [álcool] 0,1M, solvente: n-hexano, 37°C, 24h.....	107
Figura 31. Efeito do comprimento da cadeia do álcool na reação de esterificação do ácido láurico catalisada por LRO/CMC e LMJ/CMC: [ácido]=0,1M. [álcool]=0,1M,[enzima]=50 mg, solvente: n-hexano, 37°C, 24h.....	109
Figura 32. Cromatogramas de (a) (R,S)-2-hexanol; (b) acetado racêmico (preparado via química); (c) alíquota da reação de transesterificação do acetato de vinila com (R,S)-2-hexanol a 37°C, 24h catalisada pela LPS/GAL. Condições experimentais: Inj.= 250°C, Det. 280°C, T _i = 40°C, T _f = 58°C (3 min), Δ _{aq} = 0,5°C/ min, T _f = 150°C (5 min), Δ _{aq} = 3°C/min. P H ₂ = 75 Kpa.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.....	4
Tabela 2.	Critérios para a seleção do solvente orgânico.....	19
Tabela 3.	Valores de percentagem de conversão em éster obtidos para diversas lipases imobilizadas em PEO.....	29
Tabela 4.	Influência de diferentes composições de membranas poli(HEMA/MAPA) na atividade da lipase de <i>Candida rugosa</i> e na reação de hidrólise do óleo de oliva.....	36
Tabela 5.	Preparados enzimáticos utilizados.....	53
Tabela 6.	Parâmetros utilizados nas análises térmicas.....	59
Tabela 7.	Valores de teores de água (%) presentes em diferentes sistemas contendo LRO e MJL.....	76
Tabela 8.	Valores de teores de água (%) presentes no sistema contendo LRO/CMC após contato com solventes orgânicos.....	77
Tabela 9.	Valores de percentagem de conversão (C,%) em ésteres obtidos com lipase da <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em blendas de PSS/PEO.....	80
Tabela 10.	Percentagem de conversão (%) em laurato de n-pentila obtidos com lipases de diferentes fontes na forma livre e imobilizada.....	82
Tabela 11.	Resolução biocatalítica do (<i>R,S</i>) – 2-hexanol com acetato de vinila catalisada pela lipase de <i>Pseudomonas</i> sp imobilizada em diferentes sistemas.....	116

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Mecanismo da hidrólise de ésteres catalisada por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	12
Esquema 2.	Reação de esterificação do retinol com succinato de dimetila catalisada por lipase.....	25
Esquema 3.	Reação de esterificação de oximas catalisadas por lipase PS-C e PS-D.	26
Esquema 4.	Resolução da (\pm)-dropropizina catalisada por PS-C e PS-D.....	27
Esquema 5.	Resolução de álcoois e síntese de lactonas via lipases modificadas.....	31
Esquema 6.	Resolução do ácido (<i>R,S</i>)-2-butirol-2-fenilacético catalisada por <i>M. miehei</i> imobilizadas em diferentes resinas epóxi.....	32
Esquema 7.	Reação da acilação do <i>R,S</i> – madelato de metila catalisada por PSL/PEO.....	37
Esquema 8.	Equação geral para a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol.....	78
Esquema 9.	Equação geral para as reações de esterificação de diferentes ácidos com n-pentanol.....	104
Esquema 10.	Equação geral para as reações de esterificação do ácido láurico com diferentes álcoois.....	109
Esquema 11.	Equação geral para a resolução do (<i>R,S</i>)- 2-hexanol.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

Siglas

IUBMB	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
UFSC	= Universidade Federal de Santa Catarina
UNIVALI	= Universidade do Vale do Itajaí

Abreviaturas

ccd	= cromatografia de camada delgada
CG	= cromatógrafo gasoso
CMC	= carbóximetilcelulose
%c	= porcentagem de conversão
ees	= excesso enantiomérico do substrato
eep	= excesso enantiomérico do produto
%ee	= porcentagem de excesso enantiomérico
GAL	= galactomanana
LAN	= lipase de <i>Aspergillus niger</i>
LCR	= lipase de <i>Candida rugosa</i>
LCC	= lipase de <i>Candida cylindracea</i>
LMM	= lipase de <i>Mucor miehei</i>
LMJ	= lipase de <i>Mucor javanicus</i>
LPP	= lipase Pancreática de Porco
LPS	= lipase de <i>Pseudomonas</i> sp
LRM	= lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
LRO	= lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
LTL	= lipase de <i>Termonyces lanuginosus</i>
MEV	= microscopia eletrônica de varredura
PAA	= poli (ácido acrílico)
PEO	= poli (óxido de etileno)
PSS	= poli (4-estirenosulfonato de sódio)
PVA	= poli (álcool vinílico)
P(VP-co-AV)	= poli (1-vinilpirrolidona-co-acetato de vinila)
RMN ¹ H	= ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
RMN-2D	= ressonância magnética nuclear bidimensional
RNA	= ácido ribonucleico
TGA	= análise termogravimétrica
Temp.	= temperatura
XAN	= xantana

RESUMO

DALLA-VECCHIA, Roberto. Imobilização de Lipases em Materiais Poliméricos: Aplicações na Síntese de Ésteres. Florianópolis, 2004. 148p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós Graduação em Química, UFSC, 2004.

Neste trabalho lipases de diferentes fontes foram imobilizadas nos polímeros xantana (XAN), poli(ácido acrílico) (PAA), carboximetilcelulose (CMC), poli(4-estirenosulfonato de sódio) (PSS), poli(álcool vinílico) (PVA), poli(1-vinilpirrolidona-co-acetato de vinila) (P(VP-co-AV), galactomanana (GAL), e blendas de CMC/PVA (50:50), GAL/XAN (50:50) e PSS:PEO (80:20). Estes sistemas foram utilizados como biocatalisadores em reações de esterificação. Foram avaliados parâmetros tais como tempo, temperatura de reação, concentração de enzima no suporte, variação da razão molar ácido:álcool, efeito do doador acila e tamanho da cadeia do álcool. Foi, também, verificada a aplicação preliminar destes sistemas para a transesterificação enantiosseletiva do acetato de vinila com (*R,S*)-2-hexanol catalisada pela lipase de *Pseudomonas* sp. A imobilização foi realizada mediante dissolução do polímero em água e adição do biocatalisador, com posterior evaporação do solvente para a formação e obtenção dos suportes (lipase/polímero). Estes foram caracterizados, e a presença da enzima foi constatada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e análises térmica (TGA). As lipases utilizadas foram as de *Rhizomucor miehei* (LRM), *Mucor miehei* (LMM), *Termomyces lanuginosus* (LTL), *Aspergillus niger* (LAN), *Rhizopus oryzae* (LRO), *Candida rugosa* (LCR), *Mucor javanicus* (LMJ), *Pseudomonas* sp e pancreática de porco (LPP). As micrografias de MEV para a LRO e LMJ imobilizadas em CMC, PVA, GAL, XAN e PSS mostraram uma homogeneidade completa do suporte e que as enzimas estão localizadas preferencialmente na superfície dos polímeros. Os resultados de análises térmicas (TGA), indicaram que a presença da enzima provocou uma pequena desestabilização nestes sistemas. Não foi verificada dessorção de LRO e LMJ imobilizadas em CMC e PVA para o n-hexano, mesmo após 66h. As porcentagens de água nos suportes variaram de 4,0-18%. A formação do laurato de n-pentila catalisada pelas lipases de diferentes procedências imobilizadas, foi dependente do tipo de suporte e fonte de enzima. A esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada pela LRO e LMJ foi dependente do tempo e temperatura reacional, concentração de enzima no suporte e solvente. No estudo da variação da concentração molar dos substratos, ocorreu uma diminuição da porcentagem de conversão em concentrações de álcool superiores a 0,10M. A LRO imobilizada em CMC, PVA, GAL, XAN, CMC/PVA GAL/XAN e PSS:PEO manteve sua atividade, formando o laurato de n-pentila em altas porcentagens de conversão (70-99%), mesmo após oitenta dias de armazenagem no solvente(n-hexano) e com dez ciclos reacionais. A reação de esterificação catalisada pela LRO e LMJ imobilizada em CMC, foi dependente do tamanho da cadeia do doador acila e do álcool. Na reação de transesterificação do acetato de vinila com (*R,S*)-2-hexanol, a enantiosseletividade da LPS na forma livre foi sempre maior ($E=65$) comparando-se com a imobilizada em GAL, CMC/PVA e GAL/XAN($E=13-27$). A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os polímeros usados podem ser utilizados para imobilização de lipases, pois formam filmes homogêneos, as enzimas mantiveram sua atividade catalítica, e ésteres alquílicos foram obtidos com boas porcentagens de conversão. Finalmente, polímeros sintéticos e naturais são materiais alternativos para imobilização de enzimas.

Palavras-chave: lipase, imobilização, polímeros, esterificação e resolução.

ABSTRACT

DALLA-VECCHIA, Roberto. Lipases Immobilization in Polymeric Materials: Applications in Esters Synthesis. Florianópolis, 2004. 148p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós Graduação em Química, UFSC, 2004.

In this work lipases from different sources were immobilized in polymers such as xanthan (XAN), poly(acrylic acid) (PAA), carboxymethylcellulose (CMC), poly(sodium 4-styrenesulphonate) (PSS), poly(vinyl alcohol) (PVA), poly(vinyl 1-vinylpyrrolidone-co-acetate) (P(VP-co-AV), galactomannan (GAL), and CMC/PVA (50:50), GAL/XAN(50:50) and PSS:PEO(80:20) blends. These systems were used as biocatalysts in esterification reactions. Parameters such as time, reaction temperature, enzyme concentration in the support, acid:alcohol molar ratio, acyl donor and alcohol chain length were evaluated. A preliminary application of these systems in the transesterification of vinyl acetate with (*R,S*)-2-octanol catalysed by lipase from *Pseudomonas* sp, was also evaluated. The immobilization was performed by polymer dissolution in water and enzyme addition, with further solvent evaporation for forming and obtaining the systems (lipase/polymer). These were characterized, and the presence of the enzyme confirmed by using scanning electronic microscopy (SEM) and thermal analysis (TGA). The lipases used were from *Rhizomucor miehei* (LRM), *Mucor miehei* (LMM), *Termomyces lanuginosus* (LTL), *Aspergillus niger* (LAN), *Rhizopus oryzae* (LRO), *Candida rugosa* (LCR), *Mucor javanicus* (LMJ), *Pseudomonas* sp and pig pancreatic (LPP). The SEM micrographies for LRO and LMJ immobilized in CMC, PVA, GAL, XAN and PSS showed a complete support homogeneity and the special location of the enzyme in the polymer surface. Thermal analysis results (TGA), showed that the enzymes caused a small destabilization in these systems. The desorption of LRO and LMJ immobilized in CMC and PVA to n-hexane was not observed, even after 66h. The water percentage in the supports ranged from 4,0-18,0 %. The formation of n-pentyl laurate catalysed by the various immobilized lipases, was dependent on the support and lipase sources. The reaction catalysed by LRO and LMJ was dependent on reaction time and temperature, enzyme concentration in the support and solvent. In the study of substrates molar concentration, a decrease in conversion for alcohol concentration higher than 0.10 M was observed. LRO immobilized in CMC, PVA, XAN, CMC/PVA, GAL/XAN and PSS/PEO retained its activity forming n-pentyl laurate in high conversions (70-99%), even after eighty days of storage in n-hexane and after ten reactional cycles. The esterification reaction catalysed by LRO and LMJ immobilized in CMC was dependent on the acyl donor and alcohol. In the transesterification of vinyl acetate with (*R,S*)-2-octanol catalysed by lipase from *Pseudomonas* sp, the LPS enantioselectivity in a free form was superior (E=65) to the one immobilized in GAL, CMC/PVA and GAL/XAN (E=13-27). From these results, it is concluded that these polymers can be used for lipases immobilization, for they form homogeneous films, the enzymes retain their catalytic activity and alkyl esters were obtained in good conversion degree. Finally, synthetic and natural polymers are alternative materials for enzymes immobilization.

Key-words: lipase, immobilization, polymers, esterification, resolution.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas

Muito da história da bioquímica se refere à pesquisa em enzimas. A catálise biológica foi reconhecida e descrita no final de século XVIII no estudo da digestão da carne pela secreção estomacal. A pesquisa continuou no século XIX com o estudo da conversão do amido em açúcar pela saliva e vários extratos de plantas. Em 1850, Louis Pasteur, concluiu que a fermentação do açúcar em álcool por levedura é catalisada por fermentos. Pasteur postulou que estes fermentos eram inseparáveis da estrutura da célula viva da levedura. Esta idéia perdurou por vários anos. Em 1897, Eduard Büchner descobriu que o extrato da levedura pode fermentar o açúcar em álcool, comprovando que a fermentação foi promovida por moléculas que mantêm suas funções mesmo quando removidas das células. Frederick W. Kühne, em 1878, denominou estas moléculas de enzimas (do Grego: *en*, em + *zyme*, levedura)¹.

Em 1926 James Sumner's isolou e cristalizou a primeira enzima, a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em NH_3 e CO_2 , demonstrando que este cristal consistia de uma proteína. A natureza protéica não era muito aceita até 1930, quando John Northrop e Moses Kunitz mostraram que existe uma correlação direta entre a atividade enzimática de cristais de pepsina, tripsina e quimiotripsina e a quantidade de proteína presente. A partir desta data, foi amplamente demonstrado que enzimas são proteínas, isto é, são formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados entre si através de ligações peptídicas. Atualmente, são conhecidas algumas moléculas de RNA que são chamadas de ribozimas, que são catalisadores durante o seu próprio processamento².

O termo biotransformação pode ser aplicado para modificações específicas ou interconversão na estrutura química realizada por enzimas presentes em células ou na forma isolada. A biotransformação difere da fermentação, na qual o substrato é convertido a produtos através de um caminho metabólico bastante complexo na célula.³

As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microorganismos. Entretanto, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato ou quando acontecem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas³.

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente com os vários tipos de reações orgânicas. Diversos processos no metabolismo animal são regidos por enzimas. As vantagens de se utilizá-las como catalisadores são³:

P Alta velocidade de reação: as velocidades de reações catalisadas, enzimaticamente, podem ser de 10^6 a 10^{14} vezes mais rápidas que as correspondentes não catalisadas.

P Atuam em condições suaves: as reações ocorrem em condições suaves de temperatura, abaixo de 100°C , sob pressão atmosférica e num meio de pH e concentração salina praticamente constante. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização e rearranjos, que freqüentemente permeiam a metodologia tradicional.

P Apresentam diversos tipos de seletividade: quimiosseletividade, regiosseletividade e diastereosseletividade, e também enantioseletividade. As reações raramente formam subprodutos.

P Capacidade de regular processos: a atividade catalítica de muitas enzimas varia dependendo da concentração de outras substâncias que não são seus substratos.

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

Porém, estes biocatalisadores apresentam algumas desvantagens, tais como:

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

A atividade catalítica depende da integridade da conformação da enzima nativa. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em sub-unidades, a atividade é diminuída. Assim a estrutura primária, secundária, terciária e quaternária são essenciais para tal propriedade.

Enzimas, como outras proteínas, apresentam massa molar em torno de 14 a 100 KDa. Algumas necessitam de componentes químicos adicionais, denominados de cofatores, para auxiliar na atividade catalítica. Estes cofatores podem ser um ou mais íons inorgânicos, tais como; Fe^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} , um complexo orgânico ou um componente metalorgânico denominado coenzima. Muitas vezes a combinação entre uma coenzima ou um ou mais íons metálicos se faz necessária para a atividade. Quando uma coenzima com um íon metálico está interagindo firmemente ou ligada covalentemente a uma proteína, este é denominado grupo prostético. Algumas enzimas são modificadas por fosforilação,

glicosilação ou por outros processos. Muitas destas alterações são importantes para regular a atividade^{1,2}.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) já reconheceu 3.000 diferentes enzimas. A cristalização de várias tem sido obtida e determinada a seqüência de aminoácidos, bem como a estrutura tridimensional, através de cristalografia de raios-X e RMN-2D^{2,4}.

A IUBMB divide as enzimas em seis grandes classes, e cada uma em subclasses de acordo com o tipo de reação que a mesma catalisa. Entretanto, a aplicação em química orgânica se restringe a cinco grupos, e as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas por não requererem cofatores. (Tabela 1)².

Tabela 1 – Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.

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

A função de um catalisador é diminuir a barreira de energia entre os reagentes e produtos. Esta habilidade é devida à capacidade de aproximar os substratos em uma orientação tal que favoreça a formação do complexo enzima-substrato (ES), para posteriormente formar os produtos (Figura 1)².

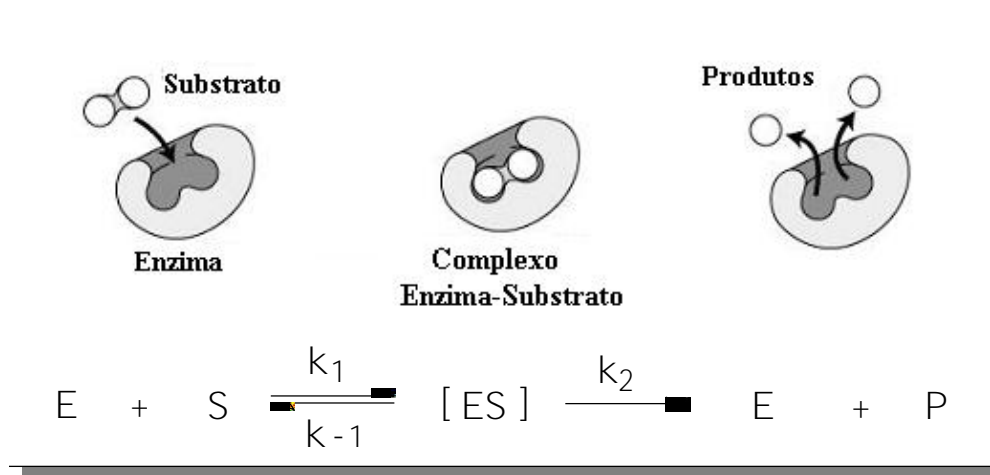


Figura 1 – Modelo esquemático da reação entre uma enzima e substrato.

Na literatura são mostrados alguns modelos para entender a catálise enzimática. Os modelos mais ilustrativos são³:

- Mecanismo Chave e Fechadura, desenvolvido por Emil Fischer em 1894. Este modelo assume que a enzima e seu substrato interagem mecanisticamente como “chave e fechadura”.
- Mecanismo do Encaixe Induzido, mostrado por Koshland Jr. no final da década de sessenta. Este modelo assume que durante a aproximação de um substrato para a formação do complexo ES, a enzima modifica a sua

conformação pela influência da estrutura do substrato, como uma capa ao redor do hóspede.

- Teoria da “Desolvatação” e “Substituição-Solvatação” mostrada por M.J.S. Dewar, que assume uma racionalização diferente para explicar as altas velocidades de conversão das reações enzimáticas.

Na teoria da “desolvatação” assume-se que as cinéticas de reações enzimáticas são semelhantes com as em fase gasosa. Se uma molécula de substrato entra no sítio ativo, ela substitui todas as de água presentes. Então, esta reação seria semelhante a uma em fase gasosa, pois não sofreria os distúrbios causados pelo solvente. Esta teoria tem sido recentemente estendida para a “substituição-solvatação”. Está baseada na suposição que a enzima não seria capaz de retirar a água que está rodeando o substrato, por efeito de “desolvatação” do substrato, porque isto é energeticamente desfavorável. O solvente, neste caso, é deslocado para outro ambiente (provavelmente o sítio ativo) chamado de “solvatação-substituição”. Assim o substrato hidrofóbico substitui a água do sítio hidrofóbico da enzima.

- Regra dos Três Pontos, criada por A. G. Ogston. Este modelo está sendo amplamente utilizado para explicar a enantiosseletividade das enzimas. Para se obter um alto grau de enantioseleção, um substrato tem que ser mantido firmemente no espaço tridimensional. Como consequência, deve haver no mínimo três pontos diferentes de ligação do substrato no sítio ativo.

A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais e ao fato de atuarem com alta eficiência e em condições reacionais bastante suaves. Apesar destas vantagens, o uso para aplicações industriais ainda é limitado, devido à instabilidade destes nas condições operacionais requeridas e/ou na dificuldade de separação dos substratos e produtos⁵.

A utilização de enzimas como catalisadores em reações sintéticas em meio de solventes orgânicos não é recente; as primeiras publicações a respeito deste assunto são do início do Século XX. Entretanto, o interesse por estes sistemas ressurgiu após a publicação dos trabalhos de Zaks e Klibanov no início dos anos 80⁶⁻⁹. As enzimas tinham pouca utilidade em síntese orgânica, devido principalmente à idéia pré-concebida de que somente o meio aquoso era propício para manter a sua conformação estrutural cataliticamente ativa. Entretanto, sabe-se atualmente que muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas, ou em certos casos, até superior. Acredita-se, que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque permanecem na sua forma original. Esta característica deve-se em parte às interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima que aumentam em solventes orgânicos devido à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes, e também ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares¹⁰.

As enzimas estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente para um processo, há necessidade de protegê-la da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois poderia provocar a inativação impossibilitando a catálise da

reação¹¹. Frente a este problema, novas técnicas têm sido desenvolvidas para fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização. As vantagens de se utilizar reações biocatalisadas, em meio orgânico, já está bem documentada na literatura.^{12,13} Neste contexto, o uso de imobilização é uma das técnicas utilizadas e será descrito posteriormente.

A aplicação de enzimas não se dá somente em síntese orgânica. Lima e Angnes¹⁴ mostraram várias aplicações analíticas envolvendo reações enzimáticas, tais como biossensores amperométricos. Estes biossensores são empregados em várias áreas como clinica, análise de alimentos e de amostras ambientais.

1.2 Lipases

1.2.1 Classificação e Fontes

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC. 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases¹⁵. A diferenciação de uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que as esterases agem em substratos solúveis¹⁶.

Entretanto, a diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes

autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água¹⁷.

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microorganismos, tais como os fungos *Aspergillus Mucor*, *Rhizopus Penicillium*, *Geotrichum* sp, por leveduras como *Tulopsis* sp e *Candida* sp, e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Destes microorganismos, as lipases de *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* e *Candida* sp estão comercialmente disponíveis. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de microorganismos são preferíveis às de fontes animais e plantas devido ao alto custo do seu isolamento¹⁸.

1.2.2 Estrutura e Mecanismo

As estruturas de várias lipases são conhecidas, tais como as de *Humicola lanuginosa*, *R. delemar*¹⁹, *Geotrichum candidum*^{20,21}, *Mucor miehei*^{22,23}, *P. glumae* (atualmente *Burkholderia glumae*)²⁴, *Candida rugosa* (anteriormente denominada *C. cylindracea*)^{25,26}, *C. antarctica*²⁷, *Chromobacterium viscosum*²⁸, Lipase Pancreática de cavalo²⁹, Lipase Pancreática Humana³⁰, e Lipase Pancreática bovina³¹. O peso molecular destas enzimas varia de 20.000-60.000 Da. Seu ponto isoelétrico (pI) varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente acídicas, com pI entre 4 e 5^{32,33}.

Estudos de raio-X mostram que a estrutura tridimensional das lipases apresenta um padrão conformacional comum, denominado de conformação α/β hidrolase, composto de

uma seqüência de α -hélices e folhas β -pregueadas. O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas e é freqüentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid”, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases²². Estudos de raio-X realizados por Uppenber *et al.*³⁴ com a lipase da *C. antarctica* revelou a existência de uma “tampa” similar recobrando a tríade catalítica Ser-His-Asp .

Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *P. aeruginosa*, *B. glumae* e *C. antarctica* B, que apresentam a “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial³⁵. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica³⁶.

A determinação da estrutura tridimensional da lipase proveniente de *C. rugosa* foi mostrada por Cygler e Scharag em 1999, e apresentou uma seqüência de 534 resíduos de aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 60.000 Da. O sítio catalítico é composto pela tríade Ser209, His449 e Glu341 e está localizado no topo de uma β -folha próximo ao centro (Figura 2)³⁷.

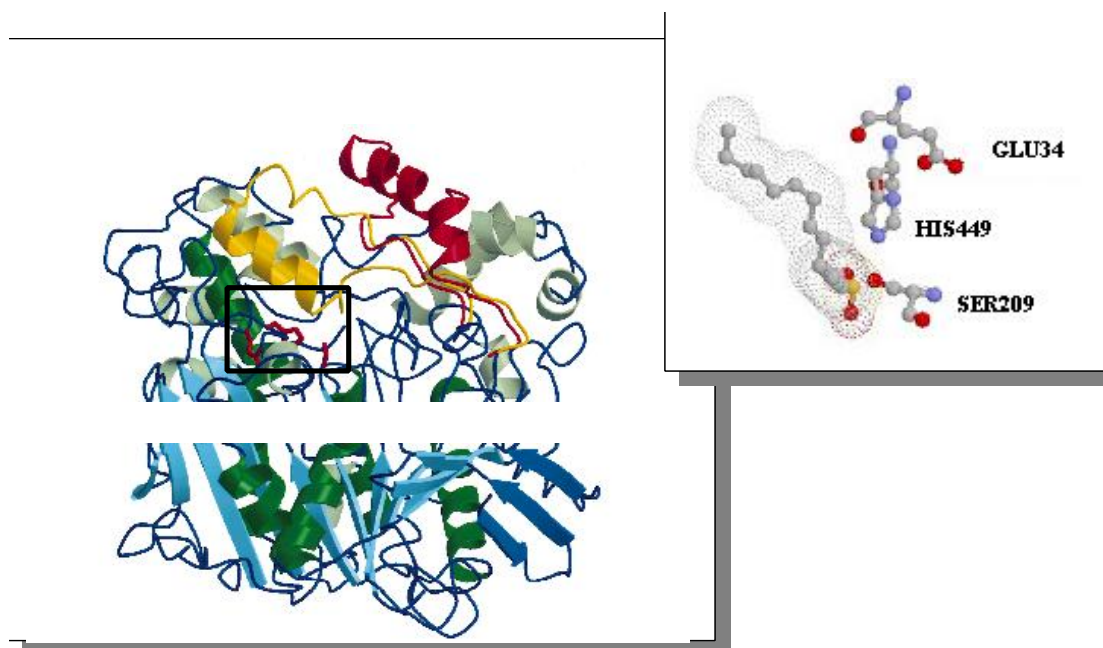
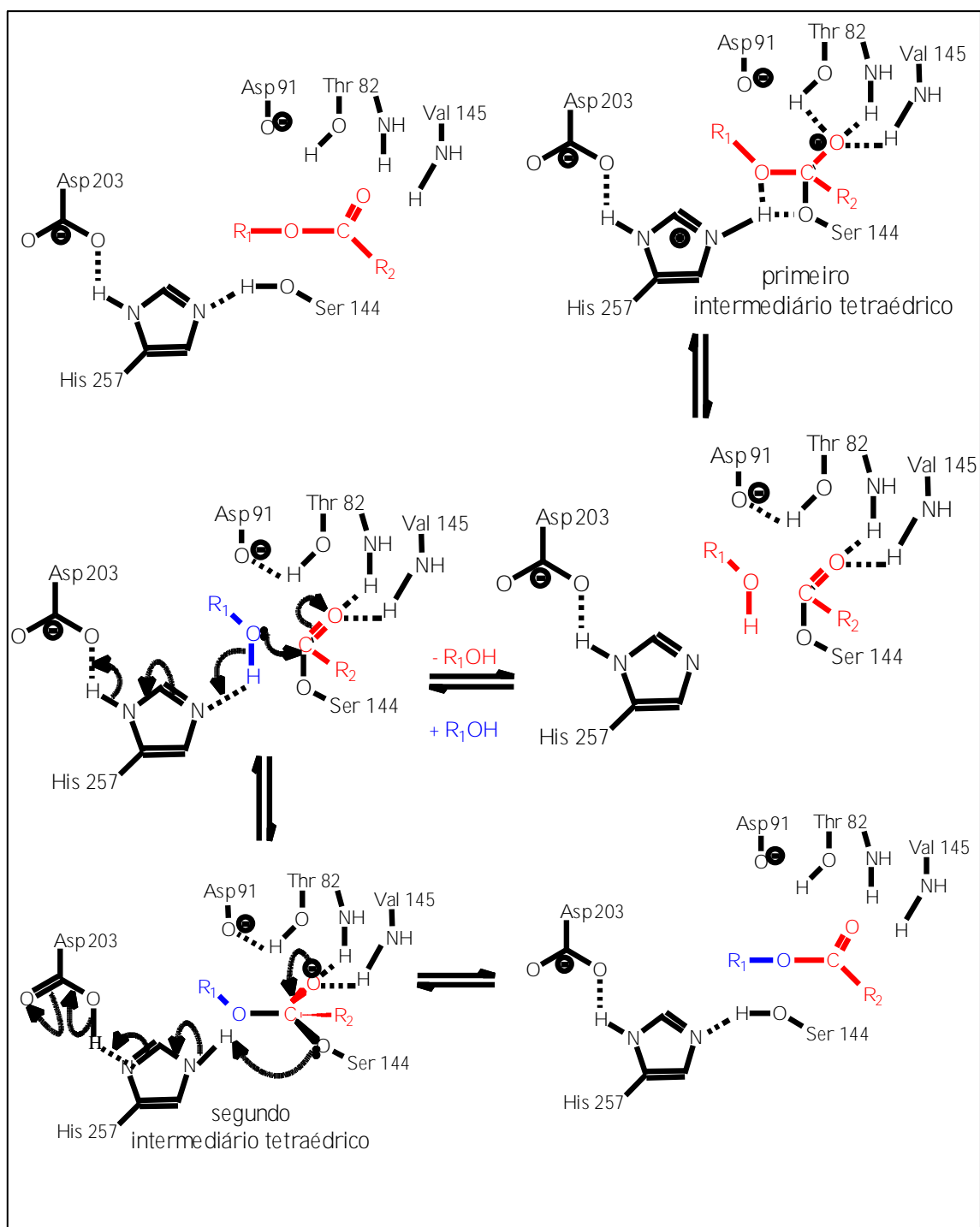


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida rugosa*, e ampliação do sítio ativo³⁷.

As α/β hidrolases apresentam um mecanismo catalítico comum para a hidrólise de ésteres, o qual consiste em cinco etapas subseqüentes. A primeira consiste na ligação ao substrato éster. A segunda, na formação do primeiro intermediário tetraédrico através do ataque do resíduo de serina. O oxianion formado é estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio e este é denominado de “cavidade oxianion”. A terceira consiste, no rompimento da ligação éster. Na quarta etapa ocorre a saída da porção álcool. Como última etapa, a hidrólise do complexo acil-enzima é realizada com a liberação dos produtos (Esquema 1)¹².



Esquema 1 – Mecanismo da hidrólise de ésteres catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae*¹².

1.2.3 Vantagens do uso de lipases em Química Orgânica

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido a sua grande disponibilidade, baixo custo, não requerem cofatores, trabalham em uma faixa de pH relativamente grande (4,0-8,0), são muito estáveis em meio orgânico, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. As lipases tem sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e mais recentemente para aplicações industriais^{17, 38}.

As lipases apresentam a capacidade de preservar sua atividade catalítica em solvente orgânico. Devido a esta propriedade, seu potencial para conversão do excesso de gordura e óleos em produtos para usos industriais está sendo amplamente investigado. Além destes exemplos, elas apresentam inúmeras aplicações na resolução de misturas racêmicas, na síntese de fármacos, novos surfactantes e na bioconversão de gorduras e óleos e na indústria alimentícia. Entretanto, a baixa estabilidade, atividade ou seletividade encontrada ocasionalmente com algumas destas enzimas e o alto custo da forma nativa ainda tem dificultado a sua aplicação em larga escala na indústria³⁹.

Nos últimos anos, com o intuito de aumentar a atividade catalítica de lipases, foram apresentados na literatura vários procedimentos de imobilização ou modificações na estrutura nativa, sendo que estes processos envolvem diferentes graus de complexidade e

eficiência^{30,40}. Os métodos de imobilização requerem uma interação fraca ou a formação de ligações covalentes entre a lipase e o suporte³. A engenharia genética de lipases envolve modificações do gene que codifica para a enzima. Esta tecnologia inclui a habilidades de isolar e expressar os genes de interesse e modificar alguns aminoácidos que ocupem um sítio importante para a atividade catalítica da enzima.na proteína.^{11,30}.

A seleção da estratégia de imobilização ou o procedimento de modificação está baseada no processo específico, o qual levará em consideração parâmetros como a atividade enzimática, a eficácia do método, a desnaturação da enzima no meio, o custo no procedimento, a toxicidade dos reagentes usados na imobilização e as propriedades finais da lipase imobilizada¹¹.

1.3 Métodos de imobilização de enzimas

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos^{41,42}.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não foram alterados durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disto, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no seu sítio ativo⁴³. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização⁴¹.

Na literatura, inúmeros métodos têm sido estudados e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e para otimizar as várias aplicações. Posteriormente far-se-á uma revisão dos métodos e na abordagem o uso de polímeros como materiais de suportes e serão evidenciados por serem alvo de nossos estudos. Outros materiais utilizados serão também mostrados.

Algumas vantagens da imobilização em comparação com a forma livre são:

- ? Aumento da estabilidade da enzima;
- ? Redução de custos;
- ? Facilidade de separação da enzima, recuperação a sua reutilização;
- ? Possibilidade de operações contínuas;
- ? Aumento, em alguns casos, da atividade enzimática.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, ou pelo confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica³. A escolha da matriz é muito importante para uma boa atuação do sistema com a enzima imobilizada. As características desejáveis para um bom suporte são:

- ? Área superficial grande;
- ? Alta rigidez;
- ? Boa permeabilidade;
- ? Forma e tamanho adequado;
- ? Características hidrofílicas;
- ? Resistência ao ataque de microrganismos;
- ? Insolúveis;
- ? Regenerabilidade.
- ? Estabilidade química, mecânica e térmica;

Na Figura 3 é mostrada, esquematicamente, a classificação dos métodos para imobilização de enzimas^{3,44}.

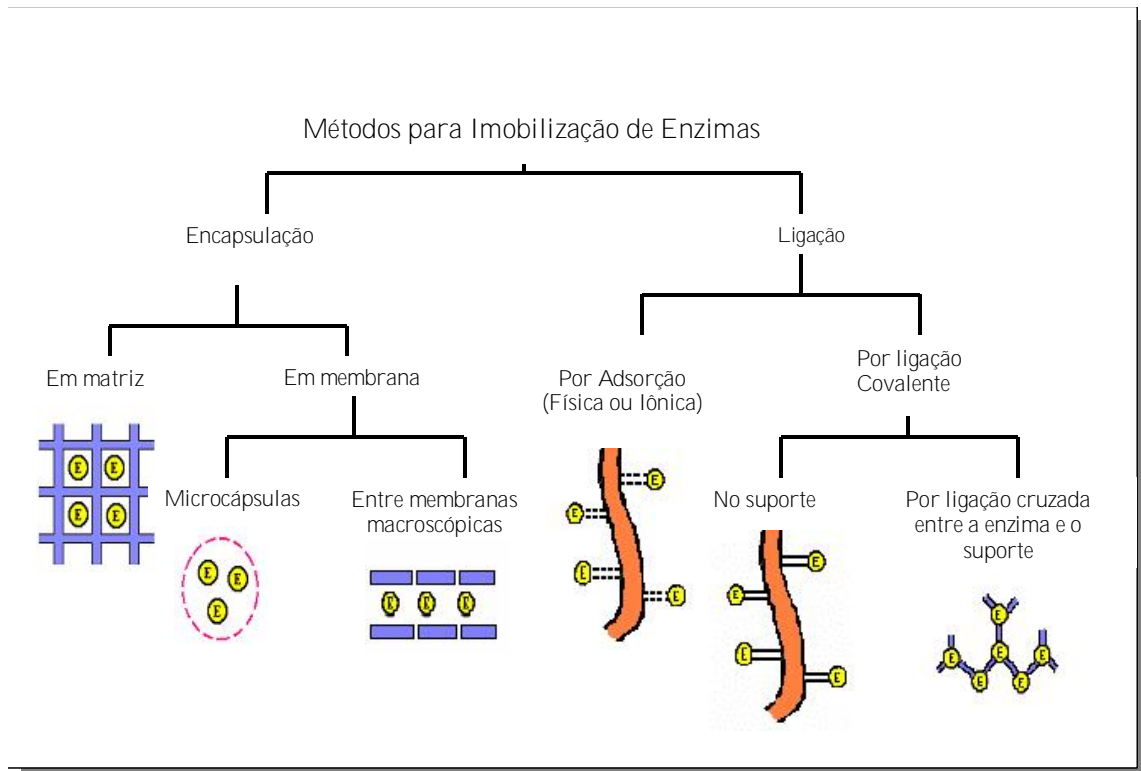


Figura 3 – Métodos de imobilização de enzimas^{3, 44}.

1.4 Parâmetros que influenciam na imobilização de enzimas.

A heterogeneidade do sistema biocatalítico, em meio orgânico, implica em uma relação mútua entre os diferentes componentes do sistema (Figura 4).

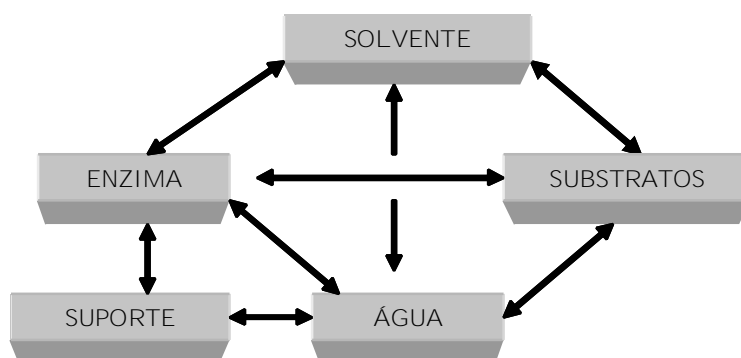


Figura 4 – Relação mútua entre os vários componentes envolvidos em uma reação biocatalisada na presença de solvente orgânico.

Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionada para uma determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliadas e otimizadas. O desconhecimento entre estas possíveis relações podem levar a uma interpretação errônea⁴⁵.

A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. Está bem documentado na literatura que uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Normalmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento da camada de hidratação da enzima, o que é devido à ação lubrificante da água, que aumenta a flexibilidade interna da enzima. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a síntese^{45,46}.

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para manter sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente em um suporte^{9,10,47,48}. A água contribui ainda para a integridade estrutural, para a polaridade do sitio ativo e estabilidade da proteína, e ela pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima⁴⁹.

Halling⁵⁰ sugeriu o uso da atividade termodinâmica da água (a_w) para definir a relação entre a água e os outros componentes do sistema reacional. O teor de água no catalisador é mais importante para manter a atividade catalítica do que a quantidade total contida no sistema. A atividade catalítica da lipase de *R. miehei* em diferentes solventes orgânicos foi muito pequena para valores fixos de a_w ⁴⁹. O efeito da atividade da água em reações biocatalisadas por lipases tem sido mostrado em vários trabalhos⁵¹⁻⁵⁸.

A influência da natureza do solvente têm sido interpretada em termos de vários fenômenos tais como, a mudança na rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína^{59,60}. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sitio ativo, bem como a variação da energia livre total, associadas com diferentes energias de solvatação do solvente, são as possíveis causas do efeito de solvente^{28,61}. Os principais critérios para a seleção de um solvente orgânico são apresentados na Tabela 2, e incluem critérios físico-químicos, biológicos, de segurança, logístico e econômico.

Tabela 2 – Critérios para a seleção do solvente orgânico⁶²

Físico-Químicos
<ul style="list-style-type: none"> - Capacidade de solubilização do substrato e produto; - Coeficiente de partição; - Densidade; - Pontos de fusão e ebulição; - Tensão superficial; - Viscosidade.
Biológicos
<ul style="list-style-type: none"> - Toxicidade para o biocatalisador.
Segurança
<ul style="list-style-type: none"> - Toxicidade; - Inflamabilidade.
Logísticos
<ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de obtenção; - Eliminação de resíduos.
Econômicos
<ul style="list-style-type: none"> - Custo; - Reciclagem do solvente.

Do ponto de vista físico-químico, os aspectos mais importantes são a capacidade de extração (coeficiente de partição) e solubilização de substratos e/ou produtos pelo solvente orgânico. Estas propriedades vão determinar a facilidade de separação das fases e a transferência de massa. O solvente orgânico deve ser química e termicamente estável, não deve formar emulsões em meio aquoso para facilitar a separação de fases, a sua viscosidade deve ser reduzida, de forma a facilitar a transferência de massa, e não deve ser degradado pelo biocatalisador. O critério biológico, que se relaciona à toxicidade do solvente para o biocatalisador é, de todos estes, o mais restritivo⁶².

Na literatura não existe um consenso claro com referência à escolha do parâmetro para descrever quantitativamente o efeito do solvente, em reações biocatalisadas por

enzimas. Porém, o parâmetro mais frequentemente utilizado para verificar o efeito do solvente é o logaritmo do coeficiente de partição do solvente num sistema padrão n-octanol/água ($\log P_{\text{oct}}$), conhecido como parâmetro de Hansch, o qual é um indicador do grau de hidrofobicidade do solvente que está sendo utilizado⁶³.

Segundo Laane *et al.*⁶³ solventes que possuem $\log P_{\text{oct}} \leq 2$ e 3 são hidrofílicos e não são adequados para a biocatalise, porque eles perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes com $\log P_{\text{oct}}$ entre 2 e 4 são menos hidrofílicos e perturbam fracamente a interação água-biocatalisador e afetam a sua estrutura de maneira imprevisível. Os solventes que possuem $\log P_{\text{oct}}$ superior a 4 são hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, deixando o biocatalisador no seu estado ativo.

Parâmetros como constante dielétrica (ϵ)^{60,61}, polarizabilidade⁶⁴, bem como parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ)⁶⁵ e o de solubilidade tridimensional⁶⁶, uma derivação do Hildebrand, são também propostos para verificar a influência do solvente nas reações catalisadas por enzimas imobilizadas ou livres.

Costa *et al.*⁶⁷, em 1999, discutiram os principais aspectos relacionados com a influência do solvente sobre a enantiosseletividade de hidrolases, principalmente as lipases. Os autores mostraram que o solvente pode alterar a especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade, seletividade proquiral e enantiosseletividade das lipases e outras hidrolases. O efeito do solvente nas reações biocatalisadas também foi mostrado por outros autores^{54, 56, 68-70}.

O material usado como suporte para a imobilização afeta a quantidade de água total nas proximidades da enzima, e a partição dos reagentes e/ou produtos na mistura

reacional⁵⁶. Gray *et al.* verificaram que a atividade da lipase de *C. cylindracea* ligada ou não covalentemente em um suporte diminui quando a quantidade água é diminuída do sistema⁷¹.

A imobilização em suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade enzimática, devido à mudança conformacional. Os materiais hidrofílicos podem reduzir a solubilidade de substratos hidrofóbicos em regiões hidrofílicas, e o acesso dos substratos ao sítio ativo. Em alguns casos a matriz pode impor uma barreira estérica, resultando em rigidez na estrutura da enzima⁷².

A capacidade de água absorvida por um suporte é caracterizada pela “aquofilicidade” (Aq), que é a razão entre a quantidade de água no suporte e a quantidade no solvente em condições padrões⁷³. O valor de Aq não é uma constante de partição verdadeira porque é dependente da quantidade relativa do suporte e solvente⁷⁴. Um suporte possuindo um alto valor de Aq é hidrofílico e por isso pode, potencialmente, privar a enzima da hidratação. A atividade é geralmente maior com suportes hidrofóbicos como o celite.

O suporte para ser efetivo na imobilização deve deixar a enzima acessível aos substratos, fazer com que a mantenha sua atividade por um longo período e que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorra a perda da atividade enzimática.

1.5 Métodos de imobilização de lipases

1.5.1 Imobilização via ligação: adsorção

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito, e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo ¹¹.

Balcão *et al.*¹³, em 1996, publicaram uma compilação de métodos de imobilização, onde mostraram que vários materiais podem ser utilizados tais como polietileno, polipropileno, celite, resina sintética, celulose, e SEPHADEX entre outros.

Paiva *et al.*⁷⁵ recentemente apresentaram uma revisão enfocando os aspectos cinéticos dos diversos métodos de imobilização de lipases, especialmente em processos que ocorrem em reatores.

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, depende de vários parâmetros, tais como, o tamanho da proteína a ser adsorvida, a área superficial do adsorvente, e principalmente a porosidade e tamanho do poros ¹¹.

O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação. Este processo, em geral, é realizado à temperatura

constante e isotermas de adsorção são obtidas as quais seguem as equações de Langmuir ou Freundlich.⁴¹

Na literatura existe um grande número de publicações com aplicações de lipases imobilizadas por adsorção física. Por exemplo, Carta *et al.*⁴⁸ estudaram a imobilização da lipase de *C. cylindracea* (atualmente denominada de *C. rugosa*) em Nylon 6, que é muito simples e facilmente reproduzida. Os autores mostraram que este sistema pode ser usado para catalisar a síntese de ésteres derivados do ácido propiônico em n-hexano, com altos rendimentos.

O uso de aditivos ou solventes durante o processo de imobilização, com o intuito de melhorar a eficiência, tem sido descrito na literatura⁷⁶. Por exemplo, a resina de troca iônica, Dowex 66, foi utilizada para imobilizar a lipase de *P. fluorescens*. Quando a imobilização foi realizada sem um pré-tratamento do suporte a adsorção foi muito baixa. Porém, quando se adicionou 50% de um solvente polar, tal como etanol ou iso-propanol, a adsorção aumentou para 96-97%.

O efeito da adição de vários compostos na estabilização de proteínas durante a imobilização em celite foi demonstrado por Wehjte *et al.*⁷⁷

Ruckenstein e Wang⁷⁸ imobilizaram a lipase de *C. rugosa* em poliestireno-divinilbenzeno. O material poroso foi preparado por co-polimerização através de ligações cruzadas do estireno com divinilbenzeno, e o efeito da razão entre as proporções divinilbenzeno/estireno foi estudado. Este parâmetro determinou a ligação cruzada e conseqüentemente a difusão do substrato e produtos através da membrana/biocatalisador. Os autores verificaram que um aumento desta razão aumentou a área superficial, embora neste caso a adsorção da lipase foi pequena devido ao tamanho do poro, que era inacessível para a enzima.

O mesmo efeito foi observado por Motero *et al.*⁷⁹, no qual o pré-tratamento do suporte com o solvente afetou a adsorção da proteína e a atividade após imobilização na hidrólise do óleo de oliva. Os autores sugeriram que o solvente polar “absorve” as moléculas de água do suporte, favorecendo a adsorção da proteína.

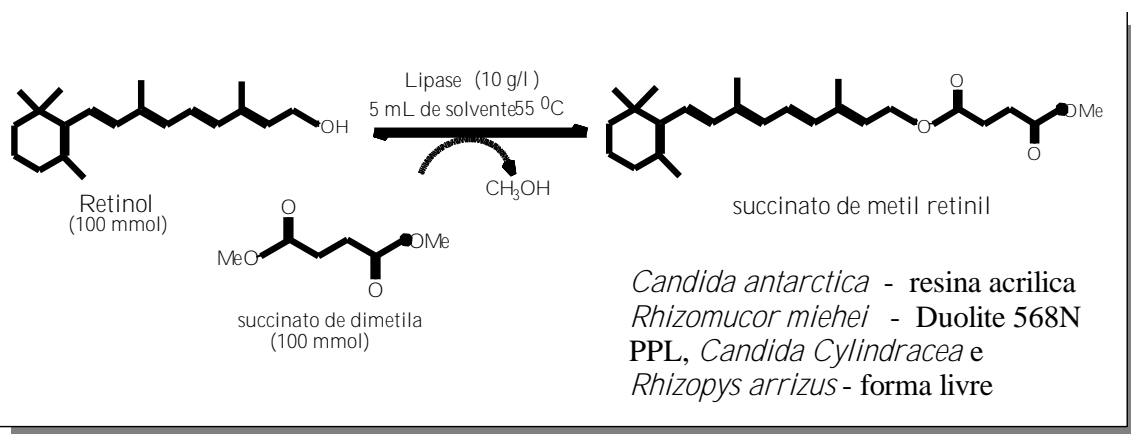
Basri *et al.*⁸⁰, imobilizaram a lipase de *C. rugosa* em três suportes diferentes, Amberlite XAD7, poli(metilmetacrilato)(PMMA) e celite. A adsorção da proteína nestes suportes e nas condições testadas ocorreu em aproximadamente 30 min com 60, 30 e 20% de adsorção, respectivamente. A atividade da enzima imobilizada nos suportes foi testada na reação de esterificação do ácido oleico com n-butanol. Parâmetros como a razão molar, o efeito de solvente, a variação do doador acil, bem como diferentes álcoois, foram analisados.

Bosley e Peilow⁸¹, estudaram o efeito da massa das lipases de *R. miehei*, *Humicola sp.*, *R. niveus* e *C. antarctica B* imobilizadas em poli(propileno). Foi observada uma pequena diminuição na eficiência da esterificação do ácido oleico com octanol para a lipase de *Humicola sp* quando comparada com a de *R. miehei*, após imobilização. Segundo os autores, podem ter ocorrido distorções na conformação da enzima, devido à alta afinidade com a superfície do suporte. Com a lipase de *C. antarctica B*, a eficiência foi muito alta, utilizando pequenas quantidades do biocatalisador.

Nascimento *et al.*⁸², utilizaram a crisotila, um silicato magnésiano hidratado do grupo das serpentinas, com fórmula molecular $Mg_3(Si_2O_5)(OH)_4$, na imobilização de lipases. Estes biocatalisadores imobilizados foram usados em reações de esterificação de álcoois alifáticos e na resolução de ácidos racêmicos em meio orgânico com sucesso.

Mougard e Legoy⁸³, estudaram a esterificação do retinol (Vitamina A) com succinato de metila, utilizando as lipases de *C. antarctica* imobilizada em resina acrílica, a

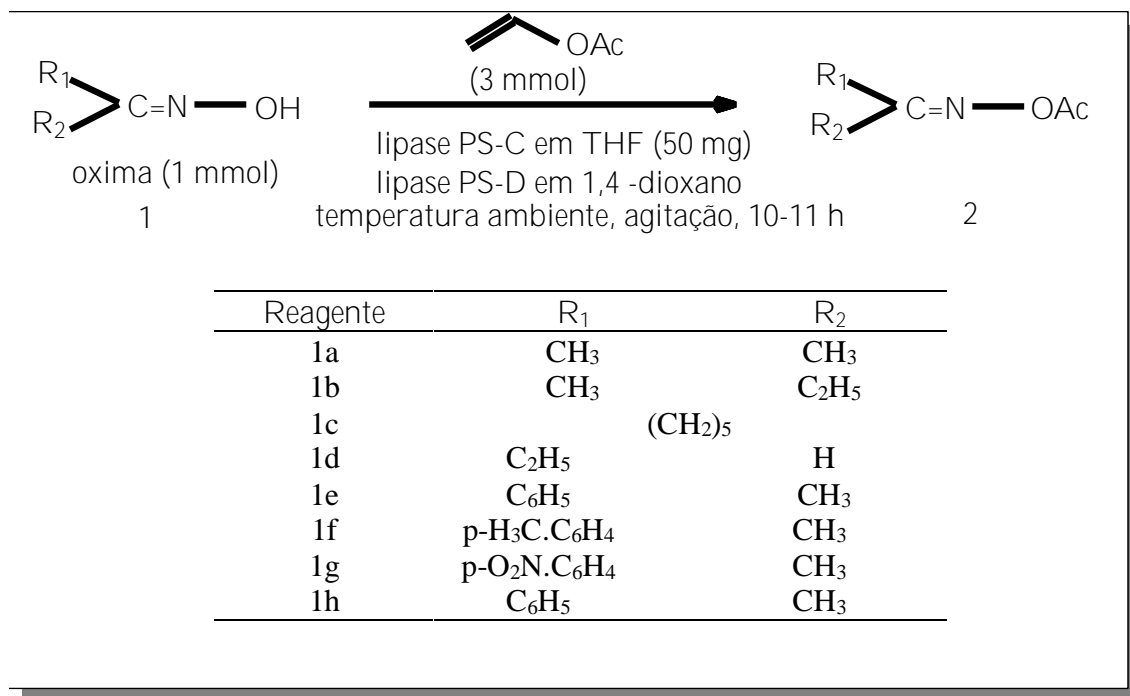
de *R. miehei* immobilizada em resina aniônica Duolite 568N, e as pancreática de porco (PPL), *C. rugosa* e de *R. arrizus* na forma livre. A reação foi dependente do solvente, e foi o primeiro processo descrito para a síntese de um derivado do retinol. O produto obtido foi um carreador de ácido láctico (Esquema 2).



Esquema 2 – Reação de esterificação do retinol com succinato de dimetila catalisada por lipases⁸³.

A lipase proveniente da *P. cepacia* foi immobilizada em cerâmica (lipase PS-C) e diatomite (lipase PS-D) e foram utilizadas na acilação de aldoximas e cetoximas em THF e 1,4-dioxano como solvente por Salunkhe e Nair⁸⁴. Os resultados obtidos na acilação mostraram que as oximas alifáticas reagiram mais rapidamente que as aromáticas e ambas apresentaram porcentagem de conversão acima de 90%, com exceção da oxima da o-acetil-p-nitroacetofenona, com 89% de conversão. Segundo os autores, o melhor solvente para a lipase PS-D, foi o THF e para a lipase PS-C o 1,4-dioxano. A reutilização do sistema foi testada na reação da oxima da benzofenona com o acetato de vinila, e mostrou que ambas

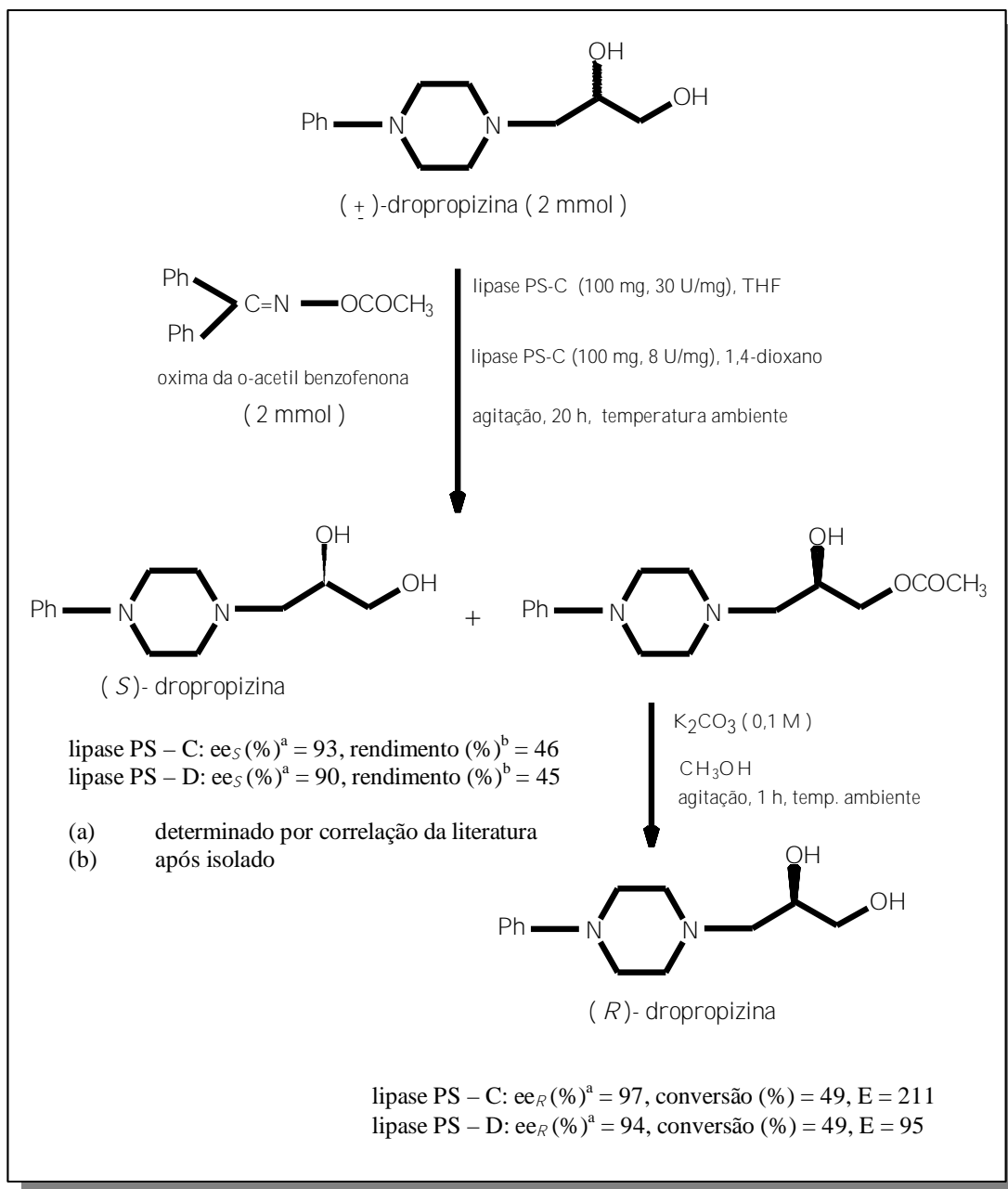
as lipases mantiveram-se ativas, apresentando uma porcentagem de conversão de 90% após cinco reutilizações (Esquema 3).



Esquema 3 – Reação de esterificação de oximas catalisadas por lipase PS-C e PS-D⁸⁴.

Os ésteres de oximas obtidos foram utilizados pelos mesmos autores, em 2001, na resolução da (\pm)-dropropizina, (*R,S*)-1-(4-pentil-1-piperazinil)-1,2-propanodiol. A (\pm)-dropropizina é utilizada como agente antitussígeno. Em estudos recentes, tem sido mostrado que a (*S*)-dropropizina apresenta a mesma atividade da mistura racêmica, mas é mais seletiva e apresenta uma baixa atividade no sistema nervoso central (SNC). A resolução foi catalisada pelas lipases PS-C e PS-D, as quais levaram a um excesso

enantiomérico (ee) e razão enantiomérica (E) superiores aos da lipase nativa. Os melhores resultados foram obtidos quando oximas aromáticas foram utilizadas (Esquema 4)⁸⁵



Esquema 4 – Resolução da (±)-dropropizina catalisada por PS-C e PS-D⁸⁵.

Abbas e Comeau⁸⁶, verificaram a habilidade catalítica da lipase da *Mucor sp* imobilizada em Amberlite IRC50 na síntese de ésteres aromáticos em ciclohexano a 30 °C. Os ácidos propiônico, butírico e capróico, e os álcoois metanol, etanol, alílico, butanol, isoamílico, geraniol, citronelol e farnesol foram utilizados em quantidades equimolares. Os rendimentos foram diferenciados, dependendo da afinidade da lipase em relação à cadeia do ácido e/ou do álcool. Conversões rápidas e com altos rendimentos, 92 e 98%, foram observadas para o caprato de metila e caprato de etila, respectivamente após 4h de reação. Rendimentos de 95, 100 e 93% foram obtidos para o butirato de butila, caprato de butila e caprato de alila, respectivamente após 24h de reação.

Crespo⁸⁷ estudou a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, catalisada por lipases de diferentes fontes imobilizada em poli(óxido de etileno)(PEO), poli(ácido acrílico)(Carbopol) e blendas PEO/Carbopol. Parâmetros como tempo e temperatura de reação, concentração de enzima no suporte e no meio reacional foram avaliados. Os resultados obtidos do estudo do efeito da variação da temperatura na conversão em éster catalisada por lipases de diferentes fontes são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de percentagem de conversão em éster obtidos para diversas lipases imobilizadas em PEO⁸⁷.

Lipase	Conversão (%) ^a	
	25°C	35°C
Pancreática de Porco	22	6
<i>Candida cylindracea</i>	43	53
<i>Aspergillus niger</i>	64	22
<i>Candida rugosa</i>	68	44
<i>Rhizomucor miehei</i>	86	57
<i>Aspergillus niger</i>	88	46
<i>Mucor javanicus</i>	92	90
<i>Mucor miehei</i>	97	95
<i>Rhizopus oryzae</i>	>99	97
<i>Pseudomonas sp</i>	>99	98

a: obtida por RMN-¹H, [enzima]:100mg g⁻¹, tempo de reação 24h, solvente: n-hexano.

Outros estudos descritos na literatura incluem lipases imobilizadas em poli(propileno)⁷⁹, poli(metil-metacrilato)⁸⁰, poli(estireno)⁸⁸, poli(cloreto de vinila)⁸⁹, quitosana⁹⁰ e quitina⁹⁰ e poly(vinil acetato (Vac)-divinilbenzeno(DVB))⁹¹.

1.5.2 Imobilização por ligação covalente no suporte ou por ligação cruzada

A utilização de proteínas modificadas quimicamente iniciou-se no final da década de 50, sendo que a técnica foi originalmente desenvolvida para auxiliar na elucidação da estrutura de proteínas. Desde o final da década de 70, muitos trabalhos de modificação de

proteínas para uso em síntese têm sido apresentados com o objetivo de alterar e melhorar as propriedades da lipase nativa. O procedimento envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido, através da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima em uma matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais. O poli(etilenoglicol) (PEG) tem sido extensivamente utilizado como um modificador de proteínas. As proteínas podem ainda ser alteradas com derivados de poli(etilenoglicol) ativado, os quais são usualmente sintetizados a partir do monometóxi-poli-etileno glicol com um grupo hidróxi no final da cadeia⁹².

A Figura 5 mostra dois tipos de modificadores para a preparação de PEG-proteína usados em biotecnologia e em aplicações biomédicas, um em forma de cadeia, PEG₂, e outro em forma de “pente”, obtido pela combinação do anidrido maleico e monometóxi-poli-etileno, PM. Os modificadores reagem com o grupo amino do resíduo de lisina e/ou com o grupo amino terminal na molécula de proteína. O uso de PEG₂ na resolução de álcoois e síntese de lactonas, são mostrados no Esquema 5⁹².

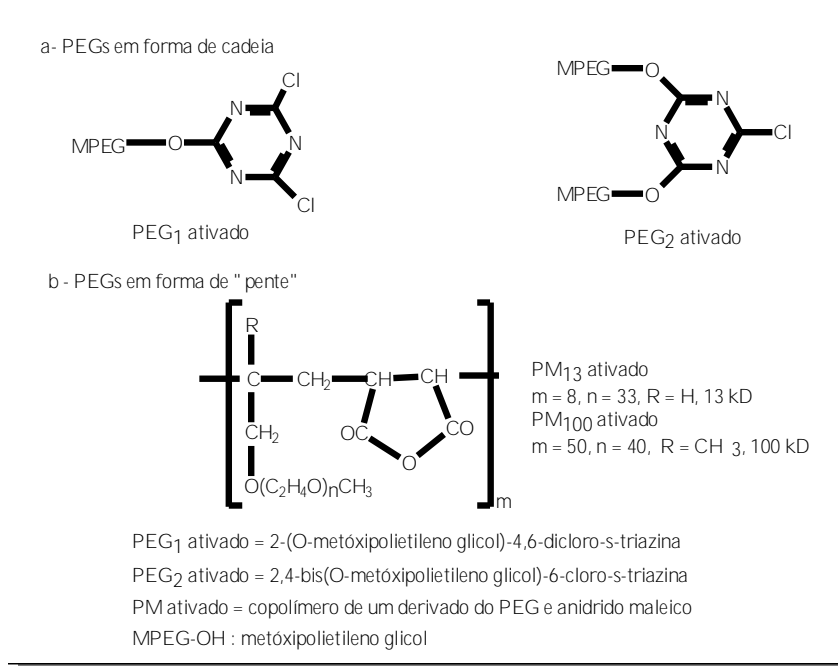
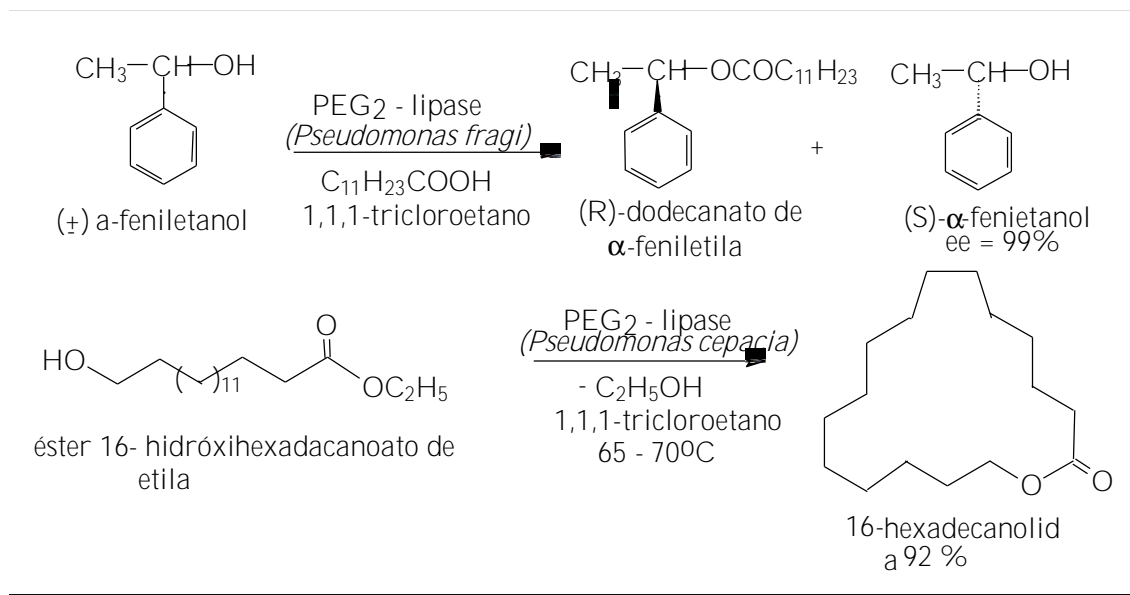
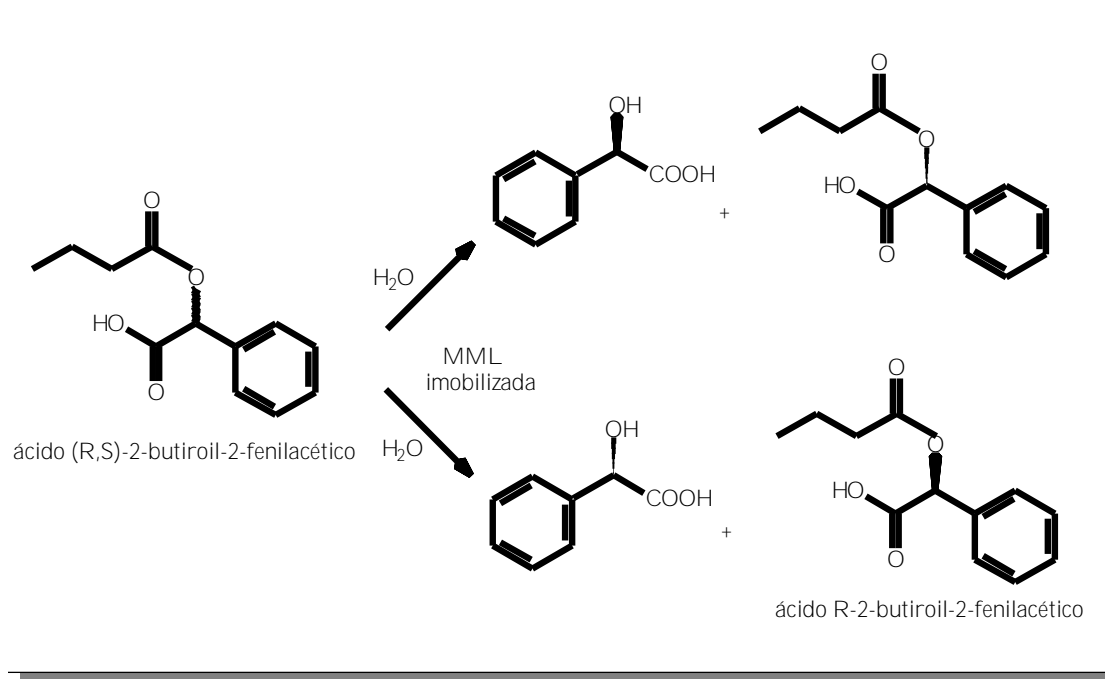


Figura 5 - Dois tipos de modificadores: (a) em forma de cadeia PEG₁ e PEG₂; (b) em forma de "pente" PM₁₃ e PM₁₀₀⁹².



Esquema 5 – Resolução de álcoois e síntese de lactonas via lipases modificadas⁹².

Palomo *et al.*⁹³, imobilizaram a lipase de *M. miehei* (MML) em diferentes resinas epoxi funcionalizadas com diferentes grupos (epoxi-iminodiacético-sephabeads, IDA, epoxi-etilenodiamina-sephabeads, EDA, e quelatos epoxi-cobre-sephabeads, IDA-Cu²⁺) e adsorvida via ativação interfacial em suporte octadecil-sephabeads. A enzima imobilizada nos diversos suportes foi utilizada na resolução do ácido (*R,S*)-2-butirol-2-fenilacético em diferentes condições de temperatura e pH. As propriedades catalíticas, atividade, especificidade e enantiosseletividade, foram dependentes do tipo de suporte utilizado. A lipase imobilizada em octadecil-sephabeads reagiu predominantemente com o enantiômero *R*, e nos demais suportes, IDA-Cu²⁺, IDA e EDA com o *S*⁹³. Os valores de ee e E, foram dependentes da temperatura e pH (Esquema 6).



Esquema 6 – Resolução do ácido (*R,S*)-2-butirol-2-fenilacético catalisada por *M. miehei* imobilizadas em diferentes resinas epóxi⁹³.

Kilinç *et al.*⁹⁴ imobilizaram a lipase pancreática do porco (PPL) em uma matriz obtida por ligações cruzadas entre o álcool poli-vinílico (PVA) e o dicloreto de adipoíla e utilizaram este sistema no estudo da reação de hidrólise da tributirina. Foram avaliados parâmetros como atividade da enzima (em diferentes pHs e temperaturas) e estabilidade (térmica, operacional e estocagem). Foi verificado que a atividade específica original da lipase foi mantida em 63%. Porém, o pH ótimo foi modificado de 8,5 para 9,0 e a temperatura de 30 para 37°C após a imobilização.

Tan *et al.*⁹⁵, obtiveram monoglicerídeos (MG) por hidrólise do óleo de palma utilizando lipases imobilizadas em membranas de quitosana (QTS), álcool poli-vinílico (PVA) e QTS/PVA utilizando glutaraldeído ou epícloridrina como agente “de ligação cruzada”. A lipase de *R. oryzae* imobilizada na membrana QTS/PVA foi mais ativa na reação de hidrólise quando comparada com as de QTS e PVA. Os rendimentos de MG foram de 35-52%.

Zacchima *et al.*⁹⁶ modificaram a lipase da *C. rugosa* com metóxi(polietileno glicol)-p-nitrofenil carbonato (NPC-mPEG). A lipase modificada reteve em 98% a atividade hidrolítica em comparação com a não modificada. Com este sistema, o laurato de benzila foi obtido com 100% de rendimento, após 6h, em tolueno.

Amorim *et al.*⁹⁷, imobilizaram a lipase da *Candida cylindracea* em filmes de quitosana de diferentes fontes, *Syncephalastrum racemosum* e de crustáceos, utilizando glutaraldeído como agente multifuncional. A lipase imobilizada reteve em 47 e 42%, respectivamente da sua atividade catalítica inicial após quatro ciclos reacionais na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNNP), a 37 °C.

1.5.3 Confinamento em matriz polimérica ou em cápsulas

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “prender” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, difundem-se¹¹.

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando assim a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante, e geralmente concentrações altas dos substratos são necessárias a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam melhor atividade com substratos pequenos do que com grandes, por estes não serem capazes de vencer a barreira imposta pela membrana e se aproximar do sítio ativo do biocatalisador¹¹.

Arice *et al.*⁹⁸, prepararam membranas de poli(2-hidroxietilmetacrilato-co-metacrilamido-fenilalanina (poli(HEMA-MAPA)). Estas, com diferentes proporções, foram obtidas pela fotopolimerização entre 2-hidróxietil metacrilato (HEMA) e 2-metacrilamido-fenilalanina (MAPA) na presença de α,α' -azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador. A incorporação do MAPA resultou em um aumento da hidrofobicidade da membrana (Figura 6)

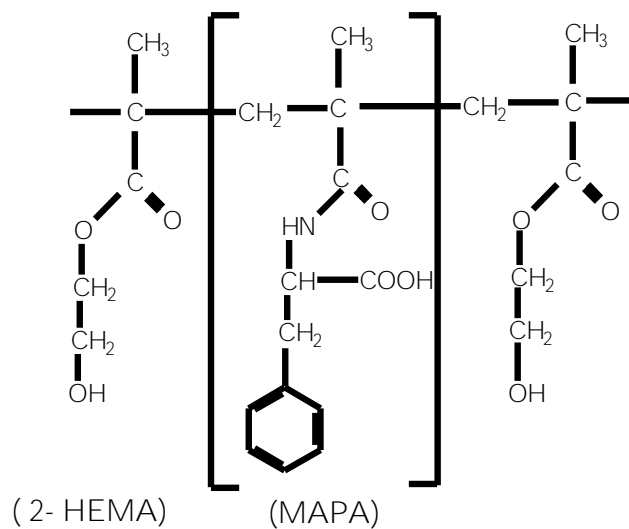


Figura 6 – Estrutura dos monômeros que formam a membrana poli(HEMA-MAPA)⁹⁸.

As membranas foram utilizadas para a imobilização da lipase de *C. rugosa* e foi determinada a sua atividade na hidrólise do óleo de oliva. Foram analisados parâmetros como a concentração de grupos hidrofóbicos no suporte, relacionados com a capacidade de adsorção da enzima, condições de adsorção em função do pH, temperatura e reutilização do sistema. O efeito da razão molar HEMA/MAPA na capacidade de imobilização e na atividade enzimática é mostrado na Tabela 4⁹⁸.

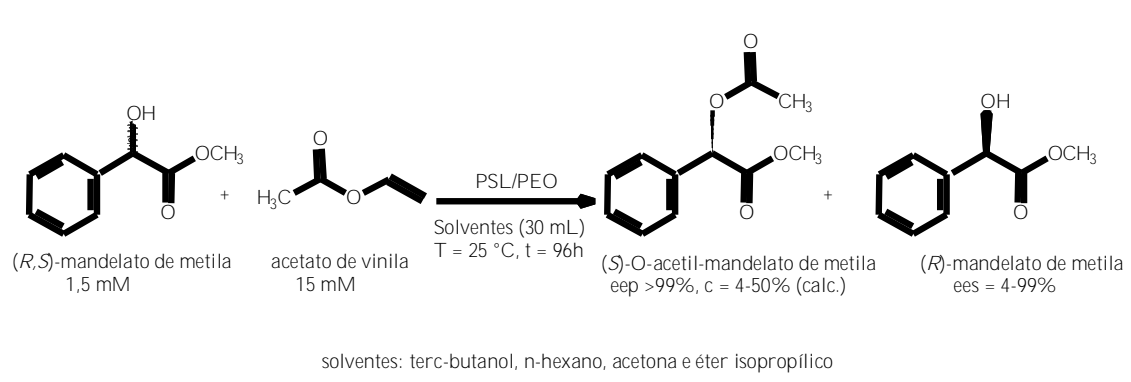
Tabela 4 – Influência de diferentes composições de membranas poli(HEMA/MAPA) na atividade da lipase de *Candida rugosa* e na reação de hidrólise do óleo de oliva⁹⁸.

Tipo de membrana	Razão molar HEMA/MAPA	Densidade de fenilalanida ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de membrana)	Quantidade de enzima adsorvida ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Atividade enzimática (U cm^{-2} de membrana)	Retenção de atividade (%)
Poli(HEMA/MAPA-1)	77	104	74	549	78
Poli(HEMA/MAPA-2)	39	208	103	815	83
Poli(HEMA/MAPA-3)	26	312	135	1040	81

Temperatura = 35°C.

Com o aumento da densidade de fenilalanina, a capacidade de adsorção foi de 74 para 135 μg de lipase/ cm^2 de membrana. O sistema com 312 μmol de fenilalanina/g de membrana de poli(HEMA/MAPA-3) apresentou uma densidade máxima de grupos hidrofóbicos, e resultou em grande capacidade de adsorção com pequena redução na atividade da enzima⁹⁸.

Queiroz e Nascimento⁹⁹ imobilizaram a lipase de *Pseudomonas* sp (PSL) em dois polímeros, poli(óxido de etileno) (PEO) e em gel de ágar. Estes sistemas foram utilizados na resolução do *R,S*-metil mandelato com acetato de vinila como agente acilante, em vários solventes orgânicos. O método foi bastante efetivo usando a lipase imobilizada em filme de PEO. O grau de conversão foi aproximadamente de 50% e ambos enantiômeros foram obtidos com pureza óptica de 100% (Esquema 7).



Esquema 7 – Reação da acilação do *R,S*-madelato de metila catalisada por PSL/PEO⁹⁹.

A imobilização de lipases por confinamento em sol-gel de silanos foi mostrada por Reetz *et al*¹⁰⁰. Foram verificados os efeitos de vários parâmetros, tais como a quantidade de água e silano, diferentes aditivos, como a gelatina e álcool polivinílico, e diferentes biocatalisadores. Os diversos silanos utilizados estão mostrados na Figura 7.

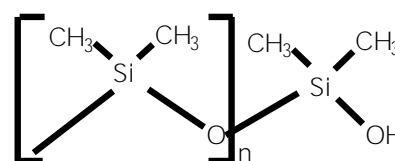
$\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ Tetrametóxisilano (TMOS)

$\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$

R = CH_3 Metiltrimetóxisilano (MTMS)

C_2H_5 Etiltrimetóxisilano (ETMS)

$n\text{-C}_3\text{H}_7$ Propiltrimetóxisilano (PTMS)



Polidimetilsiloxano (PDMS)

Figura 7 – Silanos utilizados na preparação de sol-gel para imobilização de lipases¹⁰⁰.

A lipase de *P. cepacia* foi imobilizada em diferentes géis de silano (MTMS, MTMS/PDMS (6:1) e TMOS/PTMS (1:5) e utilizada para a determinação da atividade na reação de esterificação do ácido láurico com 1-octanol em isooctano. A maior atividade foi observada com o gel de alto caráter hidrofóbico, TMOS/PTMS (1:5). Esta matriz foi utilizada para a imobilização das lipases de *A. niger*, *C. antarctica*, Lipase Pancreática de Porco, *P. Roqueforti*, *R. arrhizus*, *R. miehei* e *Candida sp* (lipase SP 523). Após imobilização, e com todas as lipases, as atividades foram superiores às da forma livre¹⁰⁰.

A lipase da *C. viscosum* (CVL) foi imobilizada em organo-gel de gelatina formado com microemulsão água-óleo (MBGs)¹⁰¹, que é uma matriz predominantemente hidrofóbica. A atividade desta lipase foi determinada na reação de esterificação do ácido decanóico com n-octanol e foi dependente da composição do organo-gel. As mudanças mais significativas foram observadas com a alteração dos valores de R ($R=[H_2O] / [\text{surfactante}]$). Valores entre 60-80 foram os mais adequados, por apresentarem maior estabilidade física e atividade para a CVL. Os solventes utilizados para a formação do organo-gel e o do meio reacional, também influenciaram na atividade da enzima. Outros trabalhos na literatura utilizaram este sistema em reações biocatalisadas por lipases¹⁰²⁻¹⁰⁶.

O uso de agentes geleificantes naturais como gelatina, agarose e k-carragenanas tem sido testado para a formação de organo-gel de microemulsão, bem como hidrogéis (sem surfactante e óleo). Stamakis e Xanakis¹⁰⁷, utilizaram estes géis como matrizes para imobilização de lipases. A lipase de *P. cepacia* manteve sua atividade catalítica quando confinada nestes sistemas, na esterificação do ácido láurico com propanol. Neste estudo, foram avaliados parâmetros como natureza e concentração do agente gelificante, concentração do biocatalisador e a concentração do substrato que influenciam a atividade catalítica. Foram obtidos rendimentos elevados para o laurato de propila (80%) com o

organo-gel de agarose e k-carragenana. Os sistemas puderam ser reutilizados por cinco vezes, e a atividade foi dependente do biopolímero utilizado na formação do organo-gel.

As microcápsulas podem também ser utilizadas para diversas finalidades, como imobilização por encapsulamento de culturas de células, de agentes bioquímicos, e para a liberação controlada de fármacos e aromatizantes¹⁰⁸. O procedimento mais comum utilizado para a encapsulação envolve a união de dois ou mais polímeros, em especial polissacarídeos, como alginatos e caragenanas, que são encontrados em algas marinhas. Estes formam géis em contato com cloreto de cálcio e potássio e são muito utilizados para inclusão de proteínas¹⁰⁹.

A quitosana, um biopolímero de alto peso molecular usualmente preparado pela purificação e desacetilação da quitina, apresenta grande possibilidade de formar filmes, fibras e membranas de microcápsulas¹¹⁰. A associação da quitosana com alginato de cálcio leva à formação de cápsulas as quais são utilizadas para encapsulação de enzimas¹¹⁰.

A lipase de *R. miehei* foi imobilizada em cápsulas de quitosana/alginato/glutaraldeído e utilizada na esterificação do ácido láurico com álcoois de C2 a C12. A presença de ramificações próximas ao centro nucleofílico do álcool também foi analisada. As conversões mais elevadas foram obtidas com álcoois lineares de C3 a C6 com conversões entre 84-90% e C8-C12 entre 23-50%. Com os álcoois ramificados terc-butanol, 1-metil-butanol não foi observada formação de produtos. Com o 3-metil-butanol, a conversão foi de 80%¹¹¹.

O método de confinamento em matriz ou por microencapsulação de enzimas na catálise de diferentes reações tem sido aplicada também por vários outros autores¹¹²⁻¹¹⁵.

1.6 Resolução via Enzimática

A enantiosseletividade é uma propriedade das enzimas, que corresponde à capacidade de produzir substâncias enantioméricamente puras. A exigência por estas substâncias tem aumentado, particularmente, pelo interesse da indústria farmacêutica, que requer investigações sobre os efeitos farmacológicos de cada enantiômero de um racemato¹¹⁷.

As lipases são amplamente utilizadas na resolução de misturas racêmicas por possuírem ação estereosseletiva. Na literatura são mostrados vários exemplos utilizando estes biocatalisadores na resolução de compostos de interesse farmacológico, tais como *S*-naproxen¹¹⁶, (*R,S*)-proglumida¹¹⁸ e (*R,S*)-dropropizina⁸⁵.

Quando um substrato racêmico é submetido a uma reação enzimática, ocorre uma discriminação quiral dos enantiômeros. Devido à quiralidade do sítio ativo da enzima, um enantiômero ajusta-se melhor do que o outro e, portanto é convertido numa velocidade mais alta. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de rendimento em uma resolução via enzimática³.

O desenvolvimento de métodos de análise estereoquímica sensível, especialmente os cromatográficos de alta resolução para a determinação da pureza enantiomérica, foi fundamental para o desenvolvimento da síntese assimétrica, pois permite a avaliação precisa do grau de seletividade obtido em uma determinada reação³.

Um tratamento muito útil para as cinéticas de resolução enzimática, que descreve a dependência da conversão (*c*) e o excesso enantiomérico do substrato (*ees*) e produto (*eep*) foi desenvolvido por Sih em 1982, sob uma base teórica de Sharpless e Fajans. O parâmetro que descreve a seletividade foi introduzido como Razão Enantiomérica (*E*)³.

O valor de E é o fator de seletividade, que é uma medida da enantiosseletividade em uma resolução cinética e é definida pela razão entre duas constantes específicas K_{cat}/K_M para dois enantiômeros competindo. A Razão Enantiomérica é independente da conversão, em uma reação, e seria um valor constante ao longo do tempo em uma resolução cinética verdadeira. Este valor é o parâmetro que descreve a eficiência de reações de resolução, catalisadas por enzimas, e vários aspectos de sua determinação e usos tem sido revisada¹¹⁹.

A conversão pode ser calculada de acordo com a Equação 1 e pode ser obtido a partir de valores do excesso enantiomérico do substrato (ees) e do produto (eep) através das Equações 2 e 3, respectivamente³.

$$c = \frac{ees}{ees + eep}$$

Equação 1

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 - ees)]}{\ln[1 - c(1 + ees)]}$$

Equação 2

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + eep)]}{\ln[1 - c(1 - eep)]}$$

Equação 3

onde: c = conversão, ee = excesso enantiomérico, s = substrato, p = produto, E = razão enantiomérica.

As razões enantioméricas menores do que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos. Podem ser consideradas de moderadas a boas de 15-30, e acima deste valor são excelentes³.

1.7 Métodos Analíticos para a Determinação da Pureza Enantiomérica

O desenvolvimento de métodos de análise estereoquímica sensível, especialmente os cromatográficos de alta resolução, para a determinação da pureza enantiomérica, foi fundamental para o desenvolvimento da síntese assimétrica, pois permite a avaliação precisa do grau de seletividade obtido em uma determinada reação.

1.7.1. Método polarimétrico

O método clássico para determinar a pureza enantiomérica de uma amostra é medir sua pureza óptica usando um polarímetro. A rotação óptica específica, $[\alpha]$, é uma grandeza característica de cada composto opticamente ativo, sendo calculada pela Equação 4;

$$[\alpha]_t^D = \frac{\alpha_0}{c \cdot l} \quad \text{Equação 4}$$

onde:

α_0 = rotação óptica observada

c = concentração em g cm^{-3}

l = comprimento da cela em dm

t = temperatura (Celsius)

D = comprimento da linha de emissão de sódio (589 nm)

A rotação da luz plano polarizada é igual para ambos enantiômeros, mas com sinal contrário. Na literatura encontram-se valores de $[\alpha]$ para vários compostos opticamente ativos. Esse dado não só é utilizado como critério de identificação de uma substância, mas também para avaliar a pureza óptica ou a sua porcentagem em uma mistura. A pureza enantiomérica, também chamada de excesso enantiomérico (ee), pode ser calculada pela Equação 5¹²⁰.

$$ee = \frac{\text{rotação específica observada}}{\text{rotação específica do enantiômero puro}} \times 100$$

Equação 5

Embora este método seja uma técnica geralmente usada para determinar a pureza enantiomérica, possui algumas desvantagens. A amostra sob a análise deve ser homogênea, destituída de traços de impurezas quirais e deve ser isolada de uma mistura reacional sem enriquecimento enantiomérico acidental¹²⁰.

1.7.2. Cromatografia gasosa

Um método atrativo para a análise de misturas enantioméricas é o uso da cromatografia gasosa (CG) quiral. Este método não é afetado por traços de impurezas, é rápido e simples para ser realizado. A premissa sobre a qual o método está baseado é que a associação molecular pode levar reconhecimento quiral suficiente que resulte na resolução enantiomérica. O método usa uma fase estacionária quiral que contém um agente de

resolução auxiliar de alta pureza enantiomérica. Os enantiômeros sofrem interações diastereoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária, sendo eluídos em velocidades diferentes. A amostra deve ser suficientemente volátil e estável termicamente, e é claro, deve ser resolvida quantitativamente sobre a fase quiral¹²¹. Após resolução quantitativa dos enantiômeros sob a fase estacionária quiral ser alcançada, a inspeção do cromatograma fornece diretamente a composição enantiomérica da amostra. Tais medidas podem ser efetuadas com um alto grau de precisão ($\pm 0,05\%$).

As ciclodextrinas ou seus derivados (α , β , γ) tem sido aplicadas com muita ênfase na separação de enantiômeros pela cromatografia líquida ou gasosa, através do desenvolvimento de colunas com fases estacionárias quirais^{119, 121}.

1.7.3. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A separação de enantiômeros por CLAE, como na CG, requer um agente quiral. O método mais direto e preferido é induzir interações diastereoméricas dos dois enantiômeros com a fase quiral estacionária. Os complexos diastereoméricos formados terão estabilidades diferentes, e portanto eluem em tempos diferentes. Uma outra alternativa é usar suporte aquiral e eluir com solvente quiral¹²².

1.7.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN)

Os enantiômeros não podem ser identificados em um meio aquiral por seu espectro de RMN porque possuem deslocamentos químicos equivalentes. Em contraste, os diastereoisômeros podem ser distinguidos porque os deslocamentos químicos não são equivalentes. A determinação do ee requer a intervenção de um auxiliar quiral para converter os enantiômeros em uma mistura de diastereoisômeros. Três tipos de auxiliares quirais são amplamente usados: Os agentes derivatizantes quirais (CDAs) tais como ácido [S] ortometilmandélico e acetil [S] mandélico, que formam diastereoisômeros. Os agentes de solvatação quiral (CSAs) tais como o α -naftiletilamina e α -metilbenzilamina. E os reagentes de deslocamento lantanídicos quirais, tais como $\text{Eu}(\text{facam})_3$ e $\text{Eu}(\text{hfbc})_3$ que formam complexos diastereoméricos *in situ* com os enantiômeros dos substratos.^{122,123}

2. JUSTIFICATIVA

O uso de enzimas como biocatalisadores em reações orgânicas é de grande importância devido às inúmeras reações que realizam e com uma eficiência extraordinária em comparação com os catalisadores convencionais.

Os ésteres são uma classe importante de compostos orgânicos e são sintetizados por vários caminhos. Os produtos de esterificação de ácidos com álcoois, ambos de cadeias longas (C12-C20), são utilizados como lubrificantes e como plasticizantes para máquinas de alta precisão. Os ésteres obtidos da reação de ácidos de cadeias longas (C12 – C20) com álcoois de cadeias pequenas (C3-C8) são utilizados na indústria de alimentos, de detergentes, farmacêutica e cosmética. Os produtos obtidos através da esterificação com ácidos e álcoois ambos de cadeias pequenas (C2-C8) são utilizados como aromatizantes e compõem as fragrâncias utilizadas em vários setores da indústria.

A produção biotecnológica de ésteres com lipases apresenta grande importância e a reação catalisada por elas tem recebido grande destaque em relação aos métodos de síntese tradicional, particularmente na produção de aromatizantes naturais e fragrâncias. Esta importância é devido à regio e estereoespecificidade mostrada pelas lipases, condições operacionais suaves, o alto grau de pureza dos produtos e sua aceitabilidade na indústria alimentícia.

Nos últimos 20 anos ocorreu um aumento no uso destes biocatalisadores em meio orgânico, e com isso novas implicações teóricas e aplicações práticas estão surgindo. O desenvolvimento de novos métodos e o teste de novos materiais, que possibilite o uso de enzimas em solvente orgânico, é de grande interesse.

Muitos investimentos têm sido feitos a fim de encontrar um método eficiente, barato e que mantenha a integridade da enzima durante o processo em meio orgânico. Portanto, o desenvolvimento de diferentes técnicas de imobilização e novos suportes tem sido uma alternativa importante, que pode proporcionar a reutilização das enzimas, bem como a manutenção da sua estrutura terciária, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Explorar materiais poliméricos, puros ou em blendas, para imobilização de lipases e utilizar as lipases imobilizadas em síntese de ésteres em solvente orgânico.

3.2 Objetivos Específicos

- F Preparar filmes e blendas poliméricas com diferentes polímeros;
- F Avaliar a estabilidade dos suportes frente à variação do solvente externo e temperatura;
- F Avaliar a estabilidade, morfologia e a presença de enzima no suporte (enzima/polímero) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises térmicas (TGA);
- F Promover estudos dos processos para imobilização de preparados enzimáticos contendo lipases de diferentes fontes nos filmes e blendas;
- F Determinar o teor de água presentes nos sistemas com o biocatalisador imobilizado;
- F Verificar o processo de dessorção do biocatalisador nos suportes;
- F Avaliar a atividade e estabilidade das enzimas nestes sistemas, utilizando a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol como padrão utilizando como parâmetro o grau de conversão em éster;

F Analisar a influência do tempo reacional, temperatura, concentração de enzima no suporte e o efeito de solvente sobre os sistemas e na reação estudada;

F Avaliar a reutilização e o tempo de estocagem do biocatalisador imobilizado;

F Estudar o efeito da variação da razão molar ácido/álcool, do doador acila, e do tamanho da cadeia do álcool na reação de esterificação;

F Comparar os sistemas utilizados para imobilização com outros sistemas já descritos;

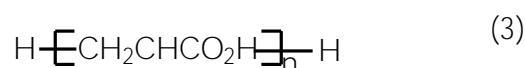
F Promover um estudo preliminar da resolução do (*R,S*)-2-hexanol com a lipase de *Pseudomonas* sp imobilizada em Galactomanana (GAL), blendas de Galactomanan/Xantana (GAL/XAN) e Carboximetilcelulose/poli(álcool vinílico) (CMC/PVA).

4. PARTE EXPERIMENTAL

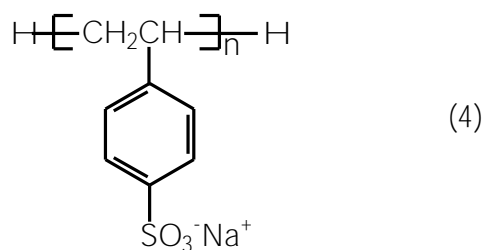
4.1. Materiais e Reagentes.

Neste trabalho, os polímeros foram utilizados sem purificação prévia. As estruturas dos monômeros estão relacionadas abaixo e os valores da massa molares (M_w) foram fornecidos pelo fabricante.

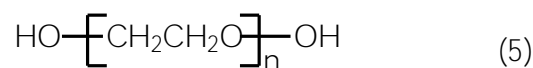
PAA: [poli (ácido acrílico)] (Carbopol 934) (3). O PAA é um polímero sintético com alta massa molecular com ligações cruzadas. Apresentam entre 56-68% de grupos ácidos (-COOH). M_w = superior a 700 000 Da, BF Goodrich, lote 934P.



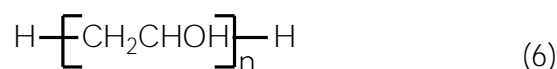
PSS: [poli(4-estirenosulfonato de sódio) (4)]. M_w = 70 000 Da, Aldrich



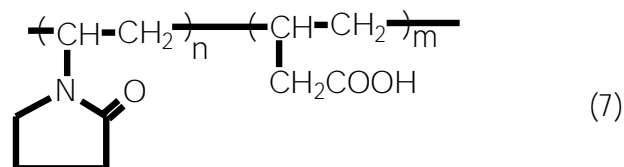
PEO: [poli(óxido de etileno)]. (5) M_w = 300 000 Da, Aldrich, lote 01729JZ



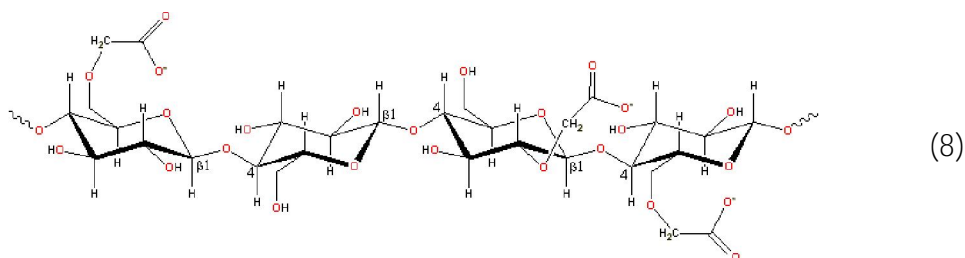
PVA: [poli(álcool vinílico) (6)]. M_w = 7200 Da, Vetec, lote 970745



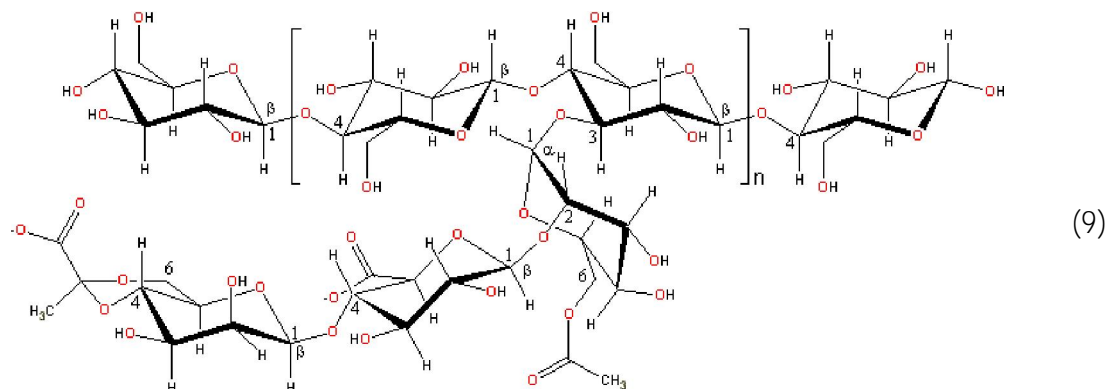
P(VP-co-AV): poli (1-vinilpirrolidona-co-acetato de vinila)(60/40) (7), Aldrich.
 $M_w = 50\ 000$ Da.



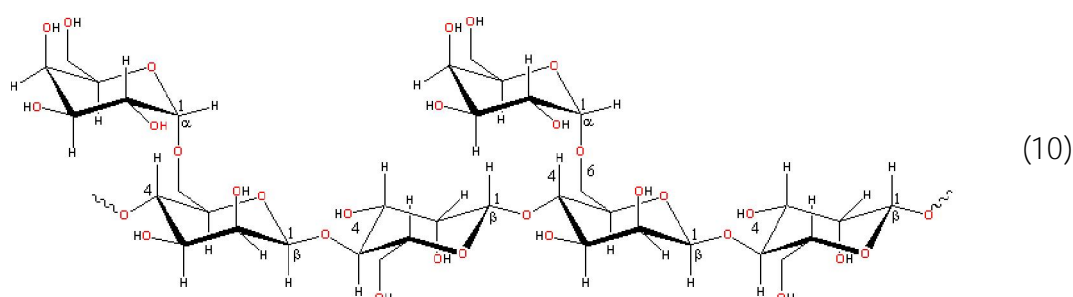
CMC: carbóximetilcelulose, Synth, lote 36755 (8). A CMC é um derivado da celulose formada pela reação com base e ácido cloro acético. A estrutura consiste de resíduos de D-glucopirranose ligados na posição 1-4.



XAN: goma xantana, Keltrol[®] (9). A goma xantana é um polieletrólito aniônico formado por resíduos de D-glucopirranose ligados em posição 1-4 e apresenta cadeias laterais de – (3-1)- α -D-manopirranose (2-1)-ácido- β -D-glucurônico (1-4)- β -D-manopirranose. Comercialmente é preparada na sua forma pura por fermentação da *Xanthomonas campestris*.



GAL: galactomanana (10). A galactomanana consiste de uma cadeia linear de resíduos de D-manopiranosil ligados em posição β -(1-4) apresentado resíduos de α -D-galactose (i. é. α -D-galactopiranosil ligados na posição 1-6). A galatomanana utilizada neste trabalho foi extraída da semente de *Mimosa scabrella*, variedade Argentina. As sementes foram coletadas em Bocaiúva do Sul (PR), e a amostra foi cedida pela Prof^a. Joana Lea S. Ganter do Depto de Bioquímica da UFPR, Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais. M_w 821.000 Da.



Os solventes e reagentes foram das seguintes procedências:

- Aldrich: ácidos 2-octenóico, 4-pentenóico, hexadecanóico, decanóico e hexanóico, tetraidrofurano e 2-hexanol.
- Merck: tolueno, solução de Karl Fischer isenta de piridina Lote 1000567
- Reagen: diclorometano e ciclohexano
- Fluka: acetato de vinila
- Sigma: acetonitrila, ácidos octenóico, sórbico, linoleíco, octadecenóico, tetradecanóico.

- Vetec: ácidos oleico, dodecanóico (láurico), butírico e propiônico, 1,4-dioxano, tetracloreto de carbono, n-hexano, n-heptano, clorofórmio, éter etílico, cloreto de acetila, 1-pentanol.

Os preparados enzimáticos^a utilizados neste trabalho estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Preparados enzimáticos utilizados.

Fonte de lipases	Sigla	Atividade	Temperatura de atividade máxima (°C) ¹²⁴⁻¹²⁶	Fornecedor/Lote
Pancreática de Porco	LPP	135 U mg ⁻¹ (b)	-	Sigma/63H1027
<i>Rhizomucor miehei</i>	LRM	1000 LU g ⁻¹ (c)	40	Novozymes/LMN02011
<i>Mucor miehei</i>	LMM	10.000 LU g ⁻¹ (c)	70	Novozymes/LMN0013
<i>Termomyces lanuginosus</i> ^e	LTL	100.000 U g ⁻¹ (d)	55-70	Novozymes/LAP1064
<i>Aspergillus niger</i>	LAN	120.000 U g ⁻¹ (d)	40	Amano/LV05508
<i>Rhizopus oryzae</i>	LRO	150.000 U g ⁻¹ (d)	37-40	Amano/LFV05516
<i>Candida rugosa</i>	LCR	30.000 U mg ⁻¹ (d)	50	Amano/LAYV06517
<i>Mucor javanicus</i>	LMJ	10.000 U mg ⁻¹ (d)	37-40	Amano/LMV01528
<i>Pseudomonas</i> sp	LPS	30.000 U mg ⁻¹ (d)	50	Amano/LPSAV09502

(a) serão denominados de preparados enzimáticos pois não foi realizado o isolamento e purificação das lipase

(b) Uma unidade de lipase (U) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido graxo por minuto, utilizando óleo de oliva como substrato, a pH 7,7 e 37°C.¹²⁴

(c) Uma unidade de lipase (LU) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido butírico por minuto, utilizando-se a tributirina como substrato, a pH 7,0 e 30°C.¹²⁵

(d) Uma unidade de lipase (U) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido graxo por minuto, utilizando-se óleo de oliva como substrato, a pH 7,0 e 37°C.¹²⁶

(e) atualmente *Humicola lanuginosa*.

Durante a apresentação dos resultados e discussão os preparados enzimáticos, serão referidos pela procedência de cada lipase.

4.2. Preparação dos Materiais Poliméricos

4.2.1. Imobilização dos preparados enzimáticos em filmes de carbóximetilcelulose (CMC).

Em um béquer adicionou-se 500 mg de CMC em 25 mL de água com agitação manual até total dissolução do polímero. Para todos os experimentos, exceto para o estudo da variação de massa do biocatalisador e nos estudos de resolução, 50 mg do preparado enzimático foram dissolvidos em 1 mL de água e adicionados ao sistema. Para os estudos de resolução foram utilizados 100 mg de preparo. O polímero/enzima foi agitado por 10 min. A mistura resultante foi depositada em uma placa de poli (etileno) (d=8,5 cm) e evaporou-se o solvente à temperatura ambiente. Desta forma obteve-se o filme de CMC após evaporação da água. O filme de CMC contendo a enzima foi retirado, cortado em pequenas secções e guardado em solvente orgânico para uso posterior nas reações de esterificação.

4.2.2. Imobilização dos preparados enzimáticos em filmes de poli(álcool vinílico) (PVA) e poli(1-vinilpirrolidona-co-acetato de vinila) (P(PV-co-AV)).

Em um béquer adicionou-se 500 mg de PVA ou P(VP-co-AV) em 20 mL de água com agitação constante até total dissolução do polímero, e para o PVA foi mantido por 4h a 40°C. Após dissolução, foram adicionado 50 mg do preparado enzimático dissolvidos em 1 mL de água, e o sistema agitado por mais 10 min. A formação do filme seguiu o procedimento citado no item 4.2.1.

4.2.3. Imobilização dos preparados enzimáticos em blendas de CMC/PVA .

Em um béquer dissolveu-se 500 mg de PVA em 20 mL de água com agitação constante por 4h a 40°C. Separadamente dissolveram-se 500 mg de CMC em 20 mL de água com agitação manual até total dissolução do polímero. Após dissolução as soluções de PVA e CMC foram misturadas e agitou-se por 15 min. Após este período, foi adicionado 50 mg do preparado enzimático dissolvido em 1 mL de água e o sistema agitado por mais 10 min. A formação do filme seguiu o procedimento citado no item 4.2.1. Em todos os experimentos utilizando a blenda CMC/PVA a proporção entre os polímeros foi de 1:1.

4.2.4. Imobilização dos preparados enzimáticos em filmes de galactomanana (GAL) e xantana (XAN).

Em um béquer dissolveu-se 500 mg de GAL ou XAN em 25 mL de água com agitação constante por aproximadamente 7h, à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 50 mg do preparado enzimático dissolvido 1 mL de água e o sistema agitado por 10 min. A formação do filme seguiu o procedimento citado no item 4.2.1.

4.2.5. Imobilização dos preparados enzimáticos em blendas de GAL/XAN.

Em um béquer dissolveu-se 500 mg de cada polímero em 25 mL de água com agitação constante por aproximadamente 7h. Após este período, foram adicionados 50 mg do preparado enzimático dissolvido em 1 mL de água e o sistema foi agitado por mais 10 min. A formação do filme seguiu o procedimento citado no item 4.2.1. Em todos os experimentos utilizando a blenda GAL/XAN a proporção entre os polímeros foi de 1:1.

4.2.6. Imobilização dos preparados enzimáticos em filmes de poli (ácido acrílico) (PAA).

Em um béquer adicionou-se 500 mg de PAA em 20 mL de água com agitação manual, até total dissolução do polímero com a formação de um gel. Após este período, foram adicionados 50 mg do preparado enzimático dissolvido em 1 mL de água e o sistema foi agitado por 10 min. A formação do filme seguiu o procedimento citado no item 4.2.1. Quando necessário, o pH do sistema ($\text{pH} = 2,5$) foi corrigido para 7,0 com adição de trietilamina, sendo este realizado antes da adição da enzima.

4.2.7. Imobilização dos preparados enzimáticos em filmes de poli(4-estirenosulfonato de sódio) (PSS).

Em um béquer dissolveu-se 500 mg de PSS em 25 mL de água com agitação constante por aproximadamente 1h, à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionadas 50 mg do preparado enzimático dissolvido em 1 mL de água e o sistema agitado por mais 10 min. A formação do filme seguiu o procedimento citado no item 4.2.1.

4.2.8. Imobilização dos preparados enzimáticos em blendas de PSS/PEO.

Para a imobilização de lipases em blendas poliméricas, as amostras foram preparadas variando-se a composição dos polímeros entre 0-100% (m/m), solubilizados em 20 mL de água com agitação constante por 12h, sendo a massa total 200 mg. Após este período, foram adicionadas 50 mg do preparado enzimático dissolvido em 1 mL de água e o sistema agitado por 10 min. A formação do filme seguiu o procedimento citado no item 4.2.1.

4.3. Preparação do meio reacional – Procedimento Geral.

Os filmes ou blendas obtidas foram cortados com secções de áreas aproximadamente iguais entre 3-4 mm³. Em seguida, estes foram colocados em um erlenmeyer, hermeticamente fechado, contendo 20 mL de solvente orgânico. Os reagentes

utilizados na reação de esterificação foram adicionados na proporção 1:1, exceto nos estudos da variação da concentração molar ácido:álcool.

Os sistemas, contendo os substratos e o preparado enzimático imobilizado ou na forma livre (para o estudo na forma livre foram utilizados 50 mg do pó em suspensão no solvente), permaneceram sob agitação suave em um banho-maria termostatizado tipo Dubnoff de acordo com o tempo de cada reação, ou grau de conversão aproximadamente 50% para as reações com os substratos racêmicos.

As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada utilizando uma mistura de n-hexano:acetato de etila (90:10) como eluente. Ao término da reação, os produtos e substratos remanescentes foram separados do filme e/ou blenda, através de decantação, sendo estes lavados várias vezes com solvente orgânico para remover os reagentes remanescentes e produtos. O solvente orgânico foi evaporado em um rotaevaporador. Foi realizado um experimento controle, para todas as reações, sem enzima e nas mesmas condições experimentais. Em todas as reações estudadas a atividade da água (a_w) não foi mantida constante.

4.4. Determinação da porcentagem de conversão e caracterização dos produtos.

As alíquotas dos produtos brutos isolados, após evaporação do solvente orgânico, foram redissolvidas em CDCl_3 para determinar a porcentagem de conversão em produtos e caracterização estrutural por RMN^1H (Espectrômetro da BRUKER AC 200 MHz) e por cromatografia gasosa (CG) (Cromatógrafo gasoso marca Shimadzu-14B). A porcentagem de conversão foi calculada, por RMN^1H comparando a integração do triplete em 3,2 ppm

correspondendo ao CH₂ do grupo álcool do material de partida, e o triplete em 4,1 ppm correspondendo ao CH₂ do éster obtido como produto.

Na reação de resolução do (*R,S*)-2-hexanol as medidas dos excessos enantioméricos foram obtidas por CG com uma coluna quirial (CHROMPACK, Chirasil – DEX CB 25mx0,25 mmIDx0,25µm). A purificação dos compostos foi feita através de cromatografia em coluna utilizando uma mistura de hexano:acetato de etila (60:40) como eluente.

A caracterização estrutural dos produtos, após purificação, foi realizada também por FTIR (Infravermelho com transformada de Fourier instrumento da Perkin Elmer FT-16-PC) e RMN¹H.

4.5. Caracterização dos materiais poliméricos.

Os filmes poliméricos com e sem as enzimas imobilizadas foram caracterizados por análises termogravimétricas (TGA), em um equipamento TGA-50 da SHIMADZU em atmosfera de nitrogênio. Os parâmetros utilizados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 6 – Parâmetros utilizados nas análises térmicas.

Análise	Massa (mg)	Taxa de aquecimento (°C min ⁻¹)	Fluxo de N ₂ (mL min ⁻¹)	Faixa de temperatura (°C)
TG	5-10	10	50	25-900

A morfologia interna dos suportes foi obtida em um microscópio eletrônico de varredura modelo PHILIPS XL30, do Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. Os filmes com e sem enzimas, foram fraturados em nitrogênio líquido e as análises foram realizadas na superfície e fratura (interior) do material. As amostras foram metalizadas, com uma fina camada de ouro, em um metalizador modelo P-2 DIODE SPUTTERING SYSTEM.

4.6. Medidas de dessorção.

Para verificar uma possível dessorção das lipases para o solvente, os filmes contendo o biocatalisador foram cortados em secções de volumes iguais e colocados em um erlenmeyer contendo 20 mL de n-hexano a 25°C. Amostras de 3 mL foram retiradas em períodos de 3, 18, 24 e 66h e determinada a absorvância da solução nos comprimentos de absorção máximos para cada lipase em estudo. Os sistemas utilizados foram LRO/CMC, LMJ/CMC, LRO/PVA e LMJ/PVA.

Para as medidas de dessorção foi necessário construir uma curva de calibração para as lipases de *Rhizopus oryzae* e de *Mucor javanicus*. Foram feitas soluções com concentrações variadas, de 0,5 – 5,0 mg mL⁻¹ para cada lipase. Com a solução de maior concentração determinou-se o comprimento de onda (DIODE Array Spectrophotometer HP 8452A) de maior absorção. Para a LRO foi de 276 nm e para a LMJ 266 nm. Os valores de absorvância obtidos foram graficados em função da concentração e os coeficientes de correlação foram de 0,99995 e 0,99885 para a LRO e LMJ, respectivamente.

4.7. Determinação da quantidade de água.

A quantidade de água presente nos filmes, após evaporação à temperatura ambiente (item 4.2.1) foi determinada por titulação pelo método de Karl Fischer (633 Automatic Karl Fischer titrator, Metrohm AG CH-9100 Herisau). A massa dos filmes previamente triturados utilizada variou de 150-500 mg. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso como média aritmética dos valores.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos polímeros e estabilidade.

Inicialmente foram realizados testes de estabilidade em diferentes solventes e temperaturas com os filmes e blendas citados anteriormente (item 4.2). Os filmes foram cortados e transferidos para um recipiente hermeticamente fechado e deixados em contato com diferentes solventes tais como dioxano, acetona, tetrahidrofurano, diclorometano, éter etílico, clorofórmio, tolueno, tetracloreto de carbono, ciclohexano, n-hexano e n-heptano, à temperatura ambiente por 24h. Os filmes de CMC, PVA e CMC/PVA, em n-hexano, foram mantidos a temperaturas de 25, 37, 40, 45 e 50°C por 24h. Após este período, os filmes foram analisados visualmente e verificados quanto a possíveis alterações macroscópicas causadas pela variação do solvente e da temperatura. Esta análise mostrou que não ocorreu qualquer alteração macroscópica nos filmes frente aos diferentes solventes e variação de temperatura, indicando assim sua estabilidade. Após estes testes, prosseguiu-se com os procedimentos para imobilização de lipases de diferentes fontes e com as reações de esterificação e transesterificação.

5.2. Caracterização dos suportes.

Os suportes selecionados para a caracterização foram CMC, PVA, GAL, XAN, PSS e blendas formadas pela associação de CMC/PVA e GAL/XAN e PSS/PEO(80:20) com as lipases imobilizadas provenientes de *R. oryzae* e *M. javanicus*, pois foram as mais

estudadas neste trabalho. A caracterização destes suportes envolveu análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de termogravimetria (TGA).

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para verificar a homogeneidade dos suportes e a presença das enzimas. Estas foram efetuadas para as lipases de *R. oryzae* e *M. javanicus* imobilizadas em CMC, PVA, PSS, GAL e XAN.

As Figuras 8 e 9, mostram as micrografias da superfície dos polímeros com as lipases imobilizadas. A morfologia da superfície dos suportes com enzima sugere que as lipases estão preferencialmente localizadas na superfície do material polimérico. A superfície dos suportes apresentou uma homogeneidade, indicando que nestes sistemas o processo de imobilização ocorreu por adsorção.

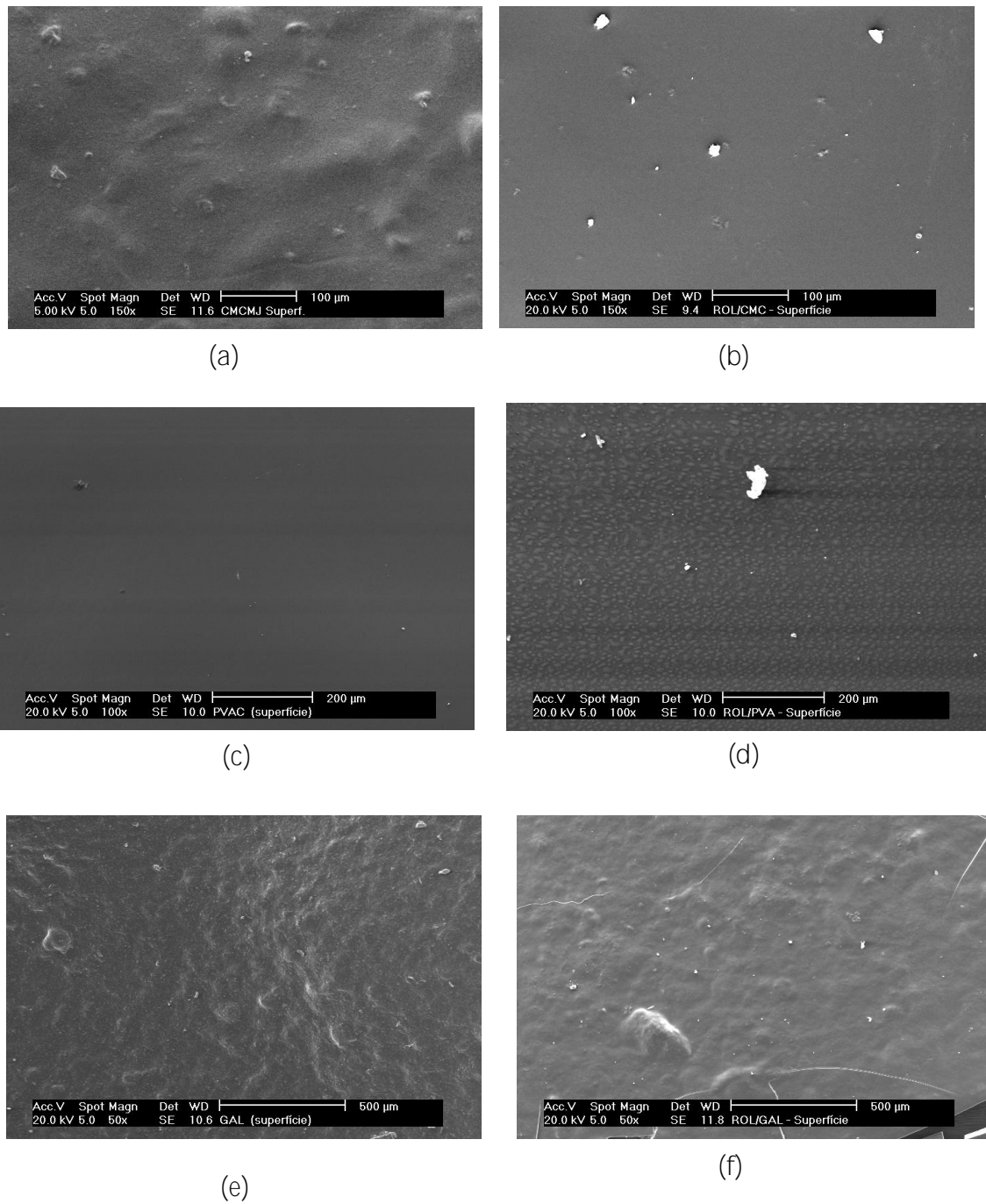


Figura 8 – Micrografias:(a) CMC puro aumento de 150x, (b)LRO immobilizada em CMC aumento de 150x, (c) PVA puro aumento de 100x, (d) LRO immobilizada em PVA aumento de 100x (e) GAL pura aumento de 50x, (f) LRO immobilizada em GAL aumento de 50x

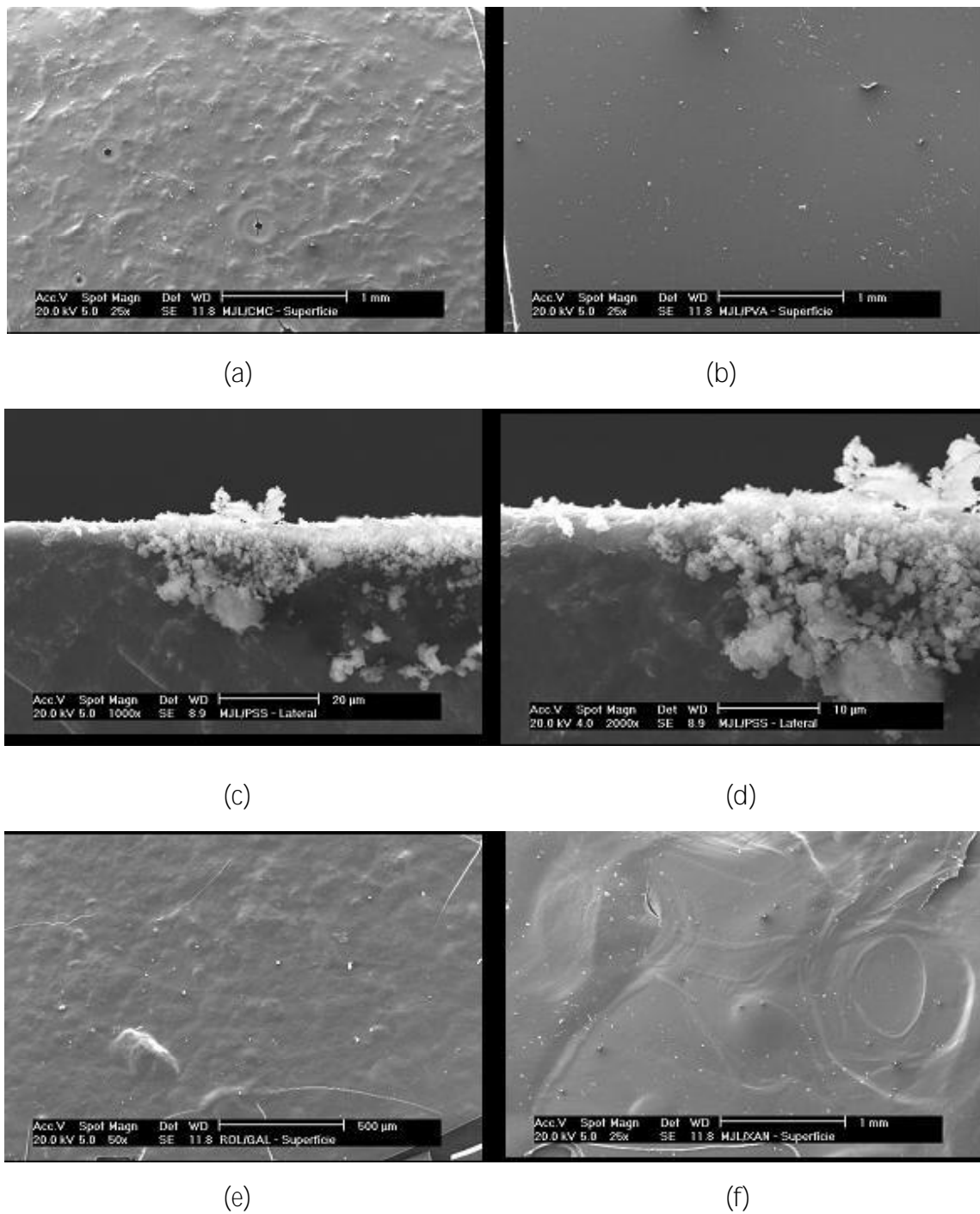


Figura 9 – Micrografia da LMJ immobilizada em (a) CMC aumento de 25x (b)PVA aumento de 25x (c) e (d) PSS aumento 1000x e 2000x (e) GAL aumento de 50x (f) XAN aumento de 25x.

Resultados análogos foram obtidos por Crespo, utilizando o PEO como suporte para imobilizar as lipases provenientes de *C. cylindracea* (atualmente *C. rugosa*) e *P. cepacia* (atualmente *Burkholderia cepacia*).⁸⁷ Mojovic *et al*¹²⁷ utilizaram copolímeros do glicidil metacrilato e etileno glicol dimetacrilato como suportes para imobilizar a lipase de *C. rugosa*. O processo de imobilização também ocorreu por adsorção na superfície dos materiais poliméricos.

As micrografias das fraturas foram efetuadas para os polímeros puros e após imobilização do biocatalisador, e não foram observadas diferenças na morfologia da superfície do filme.

Portanto, através das análises de microscopia eletrônica de varredura verifica-se a presença dos preparado enzimático nos materiais polimérico, e sugere-se que o processo de imobilização ocorreu por adsorção.

5.2.2. Análises Térmicas.

O termo análise térmica é freqüentemente usado para descrever a técnica analítica que investiga o comportamento de uma amostra em função a variação da temperatura. Neste estudo foi utilizado a técnica de TGA que foi realizada com o objetivo de verificar a decomposição, estabilidade e transições térmicas dos suportes LRO/CMC, LRO/PVA, LRO/CMC/PVA e LRO/PSS/PEO (80:20).

As Figuras 10-18 apresentam os resultados de decomposição térmica (TGA) e a derivada da curva de decomposição térmica (DTG) obtidos para a LRO livre, CMC, PVA, CMC/PVA e PSS/PEO (80:20) e para a LRO imobilizada nestes suportes.

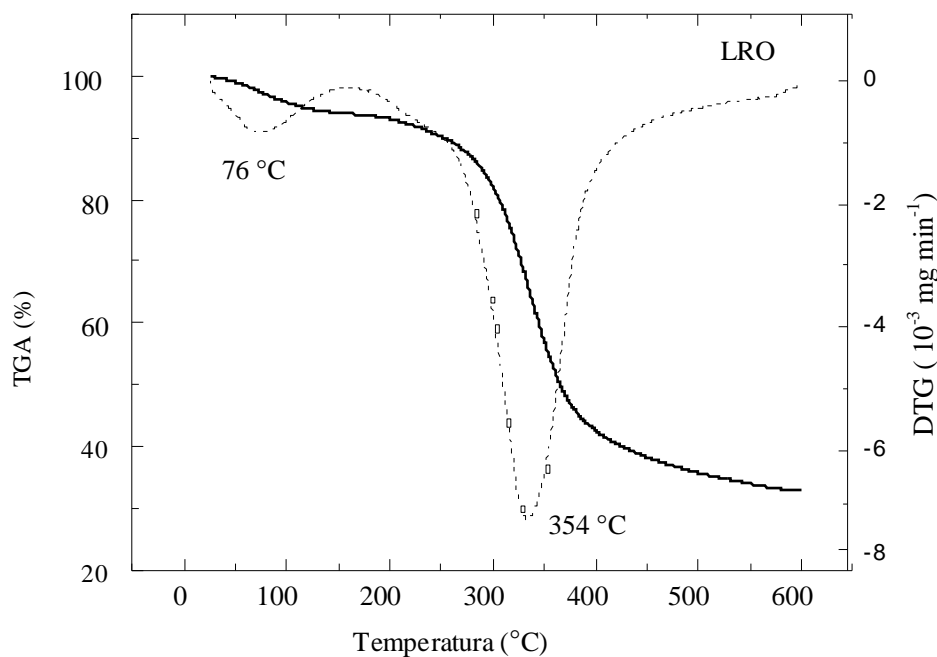


Figura 10 – Curvas de decomposição térmica (TGA) e derivada da curva de decomposição térmica (DTG) da lipase de *R. oryzae* não imobilizada.

A Figura 10 mostra as curvas de TGA e DTG para a LRO na forma livre. Para a LRO foi observado uma perda de massa (5%) em 76°C, devido à presença de água livre e ligada na sua estrutura.¹²⁸ A maior perda de massa (65%) foi observada em 354°C, devido à decomposição da lipase.

Nas Figuras 11 e 12, estão representadas as curvas de TGA e DTG para a CMC e com a presença da lipase de *R. oryzae* imobilizada (LRO/CMC).

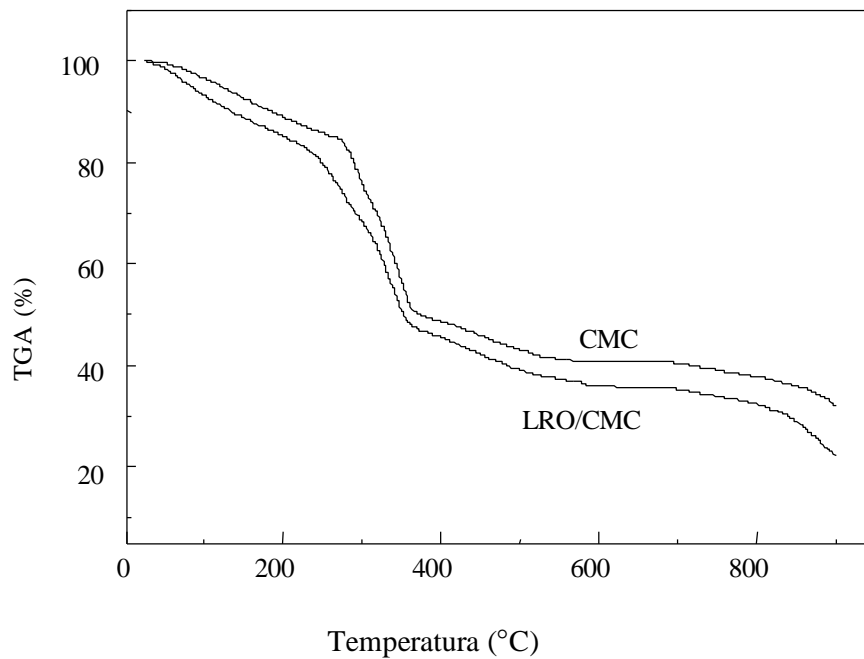


Figura 11 - Curvas de decomposição térmica da carboximetilcelulose (CMC) pura e da *R. oryzae* imobilizada em CMC.

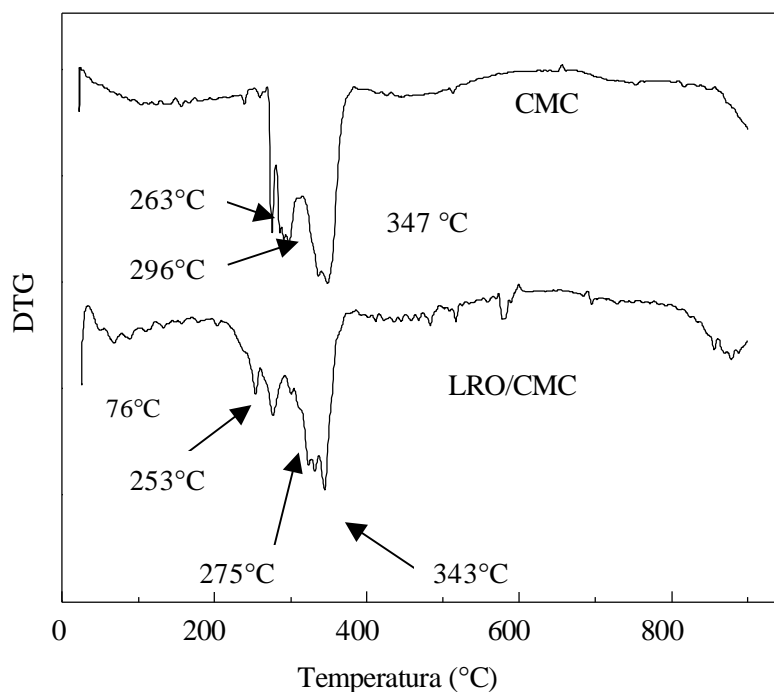


Figura 12 - Derivada da curva de decomposição térmica da carboximetilcelulose (CMC) pura e da *R. oryzae* imobilizada em CMC.

Para a CMC e LRO/CMC verificaram-se perdas de massa abaixo de 200°C referente à presença de água. Para a CMC, a maior perda de massa (41%) correspondeu ao pico $T_{MAX.} = 347^{\circ}C$ ($T_{MAX.}$ = temperatura onde a velocidade de degradação do material polimérico é máxima) na curva de DTG, correspondendo à decomposição do polímero. Para o sistema LRO/CMC ocorreu um pequeno deslocamento deste pico para $T_{MAX.} = 343^{\circ}C$. Esta pequena variação pode estar associada à presença da lipase, visto que a decomposição da enzima ocorreu em temperatura muito próxima (354°C). Esta pequena redução poderia indicar que a presença da lipase estaria provocando uma desestabilização do polímero.

Nas Figuras 13 e 14, estão representadas as curvas de TGA e DTG para o PVA e o da LRO/PVA.

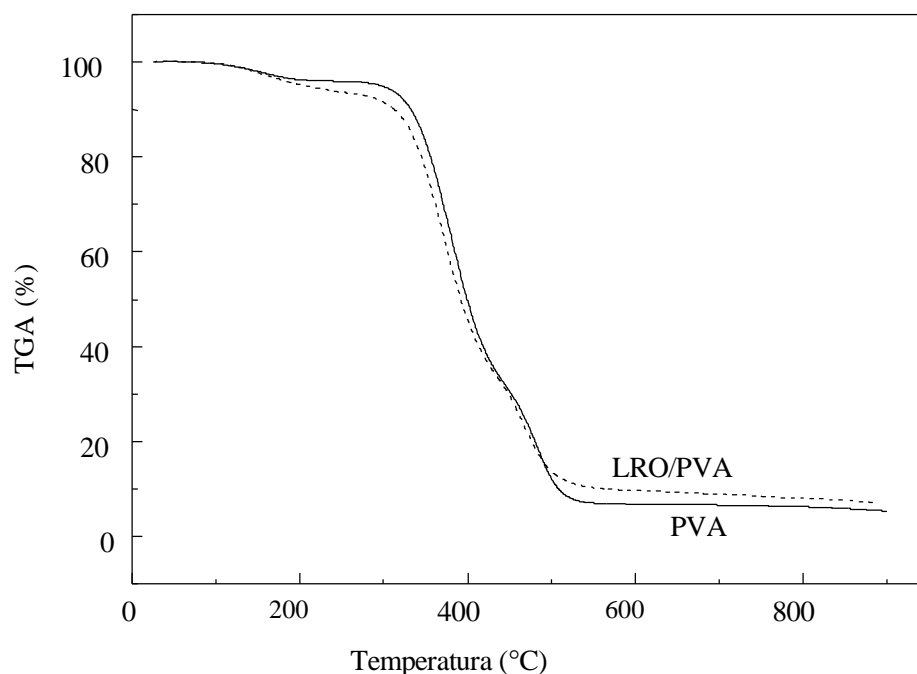


Figura 13 - Curvas de decomposição térmica do poli(álcool vinílico)(PVA) puro e da *R. oryzae* imobilizada em PVA.

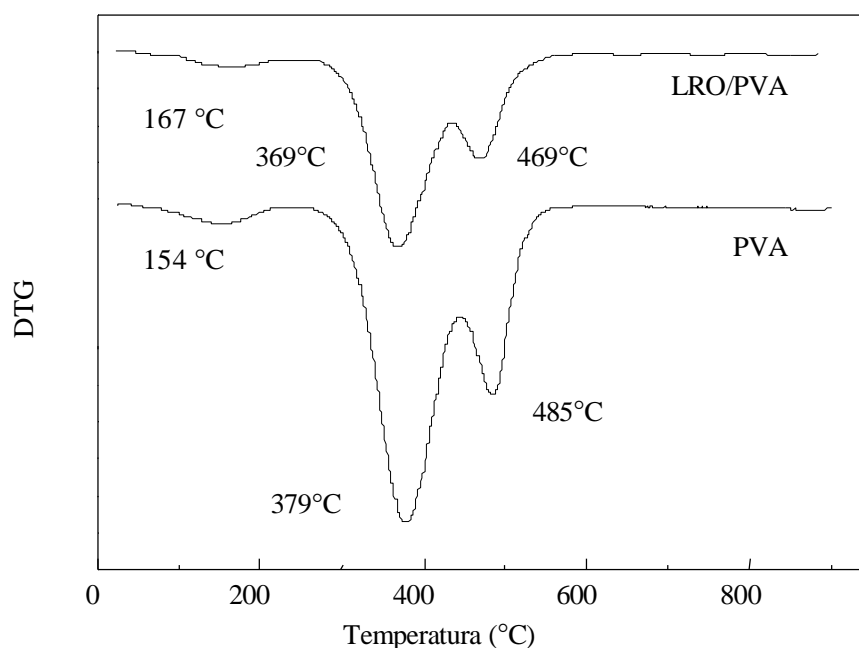


Figura 14 - Derivada da curva de decomposição térmica do poli (álcool vinílico) (PVA) puro e da *R. oryzae* imobilizada em PVA.

O PVA apresentou três estágios de perda de massa em T_{MAX} . de 154°C (4%), 379°C (63%) e 485°C (27%). A perda em 154°C corresponde à água presente e a 379 e 485°C, à decomposição do PVA. A análise das curvas de TGA e DTG para a LRO/PVA mostrou uma redução das temperaturas de decomposição, sendo de 369 e 469°C, que corresponde a uma variação de 10 e 16°C, respectivamente, em comparação com a do PVA. Esta redução provavelmente está associada com a presença da enzima no polímero causando uma desestabilização no sistema.

Nas Figuras 15 e 16, são mostradas as curvas de TGA e DTG para a blenda de CMC/PVA e da LRO imobilizada (LRO/CMC/PVA).

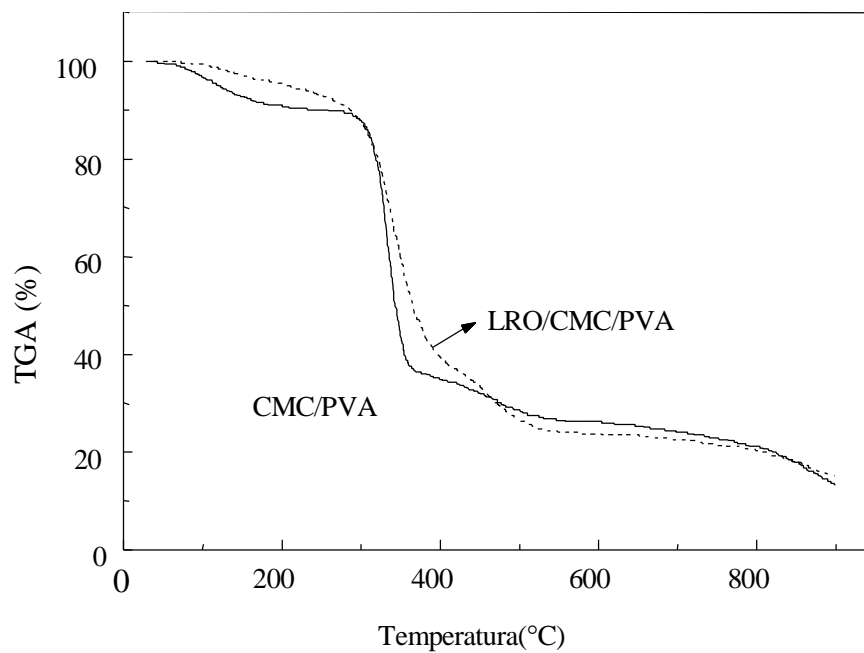


Figura 15 - Curvas de decomposição térmica da blenda de CMV/PVA e da lipase de *R. oryzae* imobilizada na blenda de CMC/PVA.

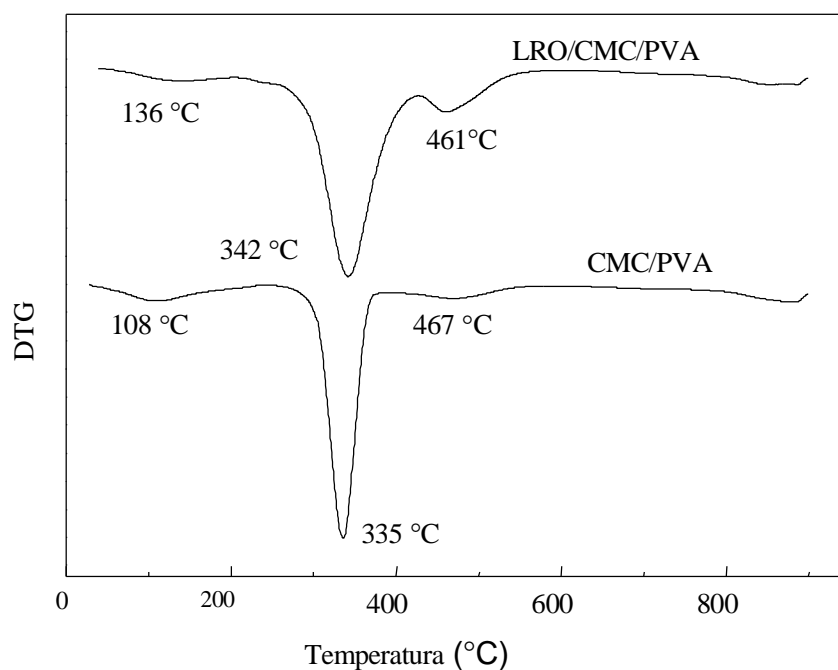


Figura 16 - Derivada da curva de decomposição da blenda CMC/PVA da lipase de *R. oryzae* imobilizada na blenda de CMC/PVA.

Para a blenda observaram-se três estágios de perdas de massa em T_{MAX} . de 108°C (7%) devido a água, em 335°C (55%) e em 467°C. Comparando-se a blenda com os polímeros puros, pode-se verificar uma redução nas temperaturas de decomposição, indicando que a formação da blenda também causou uma pequena desestabilização do sistema. O mesmo ocorreu na presença do biocatalisador.

As Figuras 17 e 18, correspondem as curvas de TGA e DTG para a blenda de PSS/PEO (80:20) e da lipase de *R. oryzae* imobilizada (LRO/PSS/PEO(80:20)).

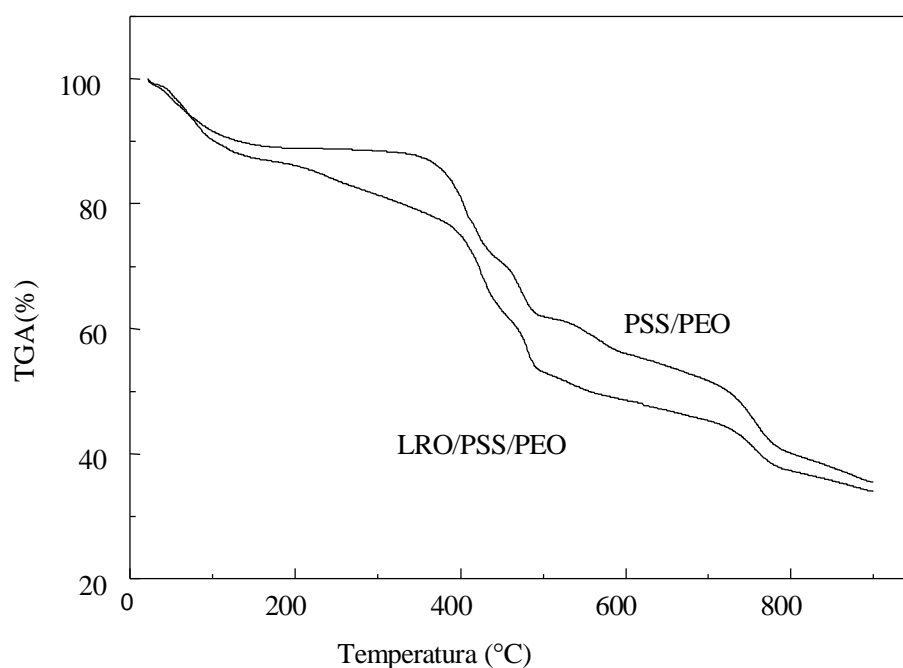


Figura 17 - Curvas de decomposição térmica da blenda de poli(4-estirenosulfonato de sódio):poli(óxido de etileno) (80:20) e da lipase de *R. oryzae* imobilizada na blenda.

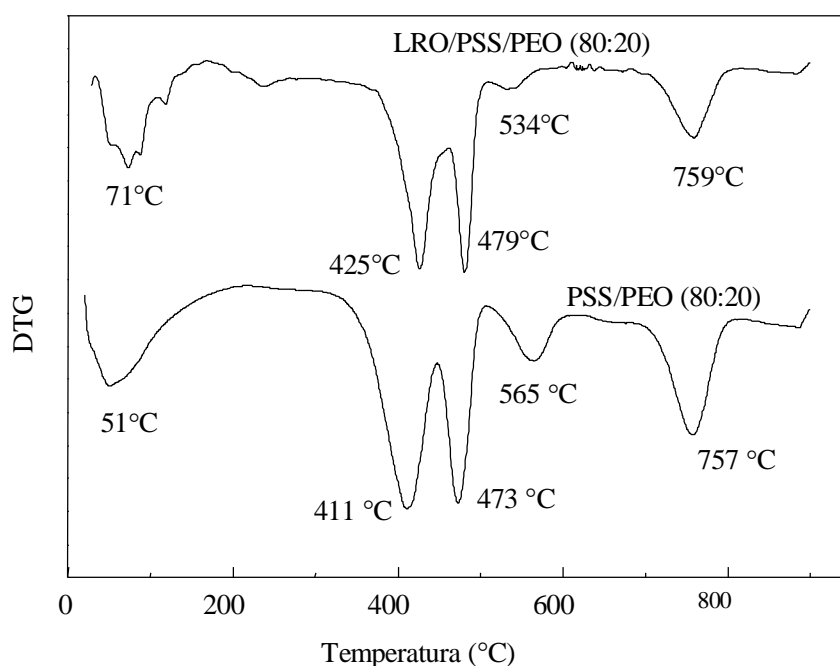


Figura 18 - Derivada da curva de decomposição da blenda de poli(4-estirenosulfonato de sódio):poli(óxido de etileno) (80:20) e da lipase de *R. oryzae* imobilizada na blenda.

Para a blenda PSS/PEO(80:20), verificou-se perda de massa em 51°C referente à presença da água. A perda de massa em 411°C refere-se à decomposição do PEO, e de acordo com Crespo⁸⁷, a decomposição deste polímero ocorreu em $T_{MAX} = 409^{\circ}C$. As perdas de massa em 473, 565 e 757°C, correspondem ao PSS. O PSS apresentou três estágios de decomposição, sendo em 470, 563 e 757°C (dados de TGA e DTG resultados não mostrados).

Na análise das curvas de TGA e DTG para o sistema LRO/PSS/PEO (80:20) pode-se verificar que as temperaturas de decomposição do PSS estão praticamente inalteradas, mas na do PEO ocorreu um aumento de 411 para 425°C. Este aumento poderia estar

associado à formação da blenda ou a presença do biocatalisador, pois não foi verificada a temperatura de decomposição da enzima possivelmente devido a baixa concentração no suporte (50 mg de enzima/ 200 mg do suporte). Experimentos utilizando quantidades maiores de enzima no suporte (100 mg/200 mg suporte), mostraram resultados similares.

5.2.3 Medidas de dessorção.

Quando se realiza um processo de adsorção, é possível ocorrer dessorção do material adsorvido, após estar em contato com um meio que tenha afinidade com a substância adsorvida. A possível dessorção das lipases imobilizadas foi avaliada para os sistemas LRO/CMC, LRO/PVA, LMJ/CMC e LMJ/PVA. O procedimento foi descrito no item 4.6.

Os sistemas foram monitorados nos períodos de 3, 18, 24 e 66h, através das medidas de absorvância nos comprimentos de onda máximo da cada lipase.

Não foi verificada a presença de proteína no solvente testado (n-hexano) ($A < 0,1$), evidenciando que estes sistemas são estáveis e que a quantidade adicionada inicialmente está presente no suporte.

A não dessorção das lipases indicou que estão fortemente adsorvidas por interações hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio nos polímeros utilizados. Este resultado é um forte indicativo de que durante a utilização destes biocatalisadores em reações em meio orgânico não deverão ocorrer perdas para o meio reacional.

Estes dados são de grande importância quando se considera a reutilização destes sistemas, como será discutido no item 5.9, onde serão submetidos a várias lavagens com solvente.

5.2.4 Determinação da quantidade de água nos polímeros.

Na literatura é mostrado que os biocatalisadores são circundados por camadas de água. A presença destas camadas é considerada um pré-requisito para a retenção da atividade enzimática em meio orgânico, devido à manutenção da estrutura terciária das enzimas. Portanto, este é um parâmetro importante e pode interferir não somente na atividade da enzima, mas também na sua estabilidade.¹²⁹

Em geral, os suportes têm sido considerados como materiais inertes com pouca ou nenhuma interferência no comportamento cinético da enzima. Entretanto, estudos comparativos sugerem que influências marcantes são observadas para as lipases em diferentes suportes. A característica que mais interfere na escolha de um tipo de suporte para imobilização é sua afinidade ou não pela água, ou seja, o caráter hidrofílico ou hidrofóbico.¹⁸

As porcentagens de água presentes nos suportes CMC, CMC/PVA, GAL, XAN, PSS e P(VP-co-AV) com a lipase de *R. oryzae* imobilizada, e PVA, CMC/PVA contendo a lipase de *M. javanicus*, foram determinadas por titulação pelo método Karl Fischer. Os resultados obtidos, como media de três análises, são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de teores de água (%) presentes em diferentes sistemas contendo as lipases de *R. oryzae* e *M. javanicus* imobilizadas.

Material	Teor de água (%)
LRO	5,4
LMJ	10,8
LRO/CMC	11,8
LRO/CMC/PVA	5,5
LMJ/PVA	4,0
LMJ/CMC/PVA	5,8
LRO/GAL	6,2
LRO/XAN	5,5
LRO/GAL/XAN	6,2
LRO/PSS	18,0
LRO/P(VP-co-AV)	12,0

Os dados mostram que o teor de água nos sistemas variou de 4,0-18%, dependendo da estrutura do polímero e/ou blenda. O sistema LRO/PSS apresentou uma maior quantidade de água, 18%. Este valor pode estar associado as características do PSS, que é um polímero iônico (estrutura 4, pág. 50) e muito solúvel em água. Assim, durante o processo de formação do filme este material pode reter uma quantidade maior de água. Para os sistemas LRO/P(VP-co-AV) e LRO/CMC, os teores de água são praticamente iguais, de 12,0 e 11,8% respectivamente.

Na comparação entre os sistemas LRO/CMC e LRO/CMC/PVA, pode-se verificar uma diminuição de 6,3% no teor de água. Este resultado pode estar associado com a formação da blenda entre CMC/PVA, comprometendo assim os grupamentos –OH presentes nas estruturas (estruturas 6 e 8, pags 50 e 51), através da formação de ligações de

hidrogênio entre os polímeros, levando assim à diminuição da quantidade de água no sistema.

Para os sistemas LRO/GAL, LRO/XAN e LRO/XAN/GAL, os teores de água foram de 5,6-6,2%, indicando que a formação da blenda GAL/XAN não influenciou o teor de água devido à grande quantidade de grupamentos –OH. Outro fator que poderia estar contribuindo é o tempo de evaporação durante a formação dos filmes, que foi diferente para cada sistema (8-12h) e isto poderia resultar em materiais com quantidades diferenciadas de água.

Para verificar se o teor de água era alterado pela presença do solvente orgânico, os filmes contendo LRO imobilizada em CMC foram colocados em contato com diferentes solventes de polaridades variadas, indiretamente indicadas pelo log P, por 24h. Após este período, os filmes foram retirados do contato com o solvente e o excesso foi evaporado à temperatura ambiente, e a seguir o teor de água foi determinado. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de teores de água (%) presentes no sistema contendo LRO/CMC após contato com solventes orgânicos^(a).

Material/ Solvente	log P ⁶¹	Teor de água (%)
LRO/CMC – Dioxano	-1,1	11,8
LRO/CMC – Tetraidrofurano	0,49	11,0
LRO/CMC – Éter etílico	0,85	13,0
LRO/CMC – Diclorometano	1,5	9,3
LRO/CMC – Clorofórmio	2,0	12,0
LRO/CMC – Hexano	3,5	11,3
LRO/CMC – sem solvente	-	11,8

(a) 24h.

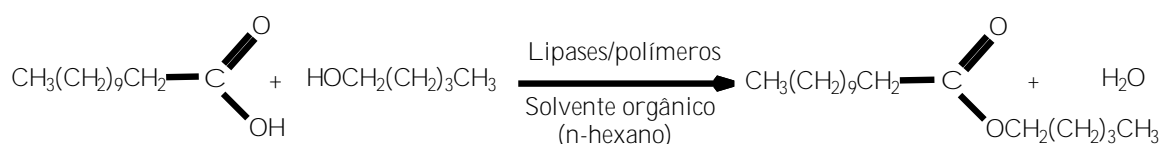
Os dados da Tabela 8 mostram que não houve uma variação significativa ao comparar com o sistema LRO/CMC (dados apresentados na Tabela 7) sem o contato com solvente, indicando boa estabilidade frente a diversos solventes orgânicos.

De acordo com estes resultados, é possível prever que as atividades catalíticas das lipases serão preservadas devido a presença de uma certa porcentagem de água nos sistemas que também é verificada por análises de TGA.

Estes resultados, também são concordantes com os dados de MEV, TGA e dessorção, onde se verificou que após imobilização obtém-se sistemas estáveis com possíveis aplicações na biocatálise.

5.3. Síntese do laurato de n-butila catalisada por lipases de diferentes fontes imobilizadas em filmes poliméricos e blendas.

Inicialmente foi determinada a porcentagem de conversão na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, catalisada por lipases de diferentes fontes e procedências, imobilizadas nos polímeros e blendas citadas no item 5.1 (Esquema 8).



Esquema 8 – Equação geral para a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol.

Estes experimentos foram realizados para selecionar alguns suportes que seriam posteriormente utilizados para avaliar outros parâmetros na síntese destes ésteres. A obtenção de laurato de n-pentila foi considerada como reação “modelo” pois em geral as lipases, possuem uma boa atividade frente a ácidos de cadeia longa¹²⁵.

As reações de esterificação foram realizadas a 37°C por 24 h, utilizando como solvente n-hexano. A massa de preparado enzimático utilizado foi 50 mg nos materiais poliméricos. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando uma mistura n-hexano:acetato de etila (9:1) como eluente. O valor do Rf obtido para o éster foi de 0,70.

A percentagem de conversão foi determinada quantitativamente, através das análises dos espectros de RMN-¹H. O cálculo foi obtido pela comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos do álcool e do éster. Para o n-pentanol e o laurato de n-pentila, observam-se tripletes em 3,65 (2H, CH₂OH) e 4,06 ppm (2H, CH₂O), respectivamente.

Os espectros de RMN-¹H e IV, após purificação do produto, confirmaram a obtenção do laurato de n-pentila. Observaram-se deslocamentos em 4,1 ppm um triplete referente a 2H de CH₂OOC-; em 2,3 ppm um triplete referente a 2H do grupo R-CH₂-COO- (hidrogênios vizinhos a carbonila); em 1,0-1,5 ppm um multiplete referente a 24H dos grupos -CH₂- da cadeia alquilica; e em 0,9 ppm um triplete referente aos 6H dos grupos terminais. Os espectros de IV foram observadas bandas características de estiramento da carbonila (C=O) do éster em 1739 cm⁻¹, as de estiramento da ligação C-H dos carbonos alifáticos na região de 2980-3000 cm⁻¹; a de estiramento do grupo -CH₂-CO-OR em 1200 cm⁻¹; e as de deformação das ligações C-H dos carbonos alifáticos na região de 1000 cm⁻¹. De maneira análoga todos os demais ésteres foram analisados e caracterizados.

As blendas utilizadas apresentaram composição 1:1% (m/m), exceto para a formada pela associação entre o PSS e PEO cuja composição foi 80:20. Esta foi selecionada a partir de um estudo realizado variando-se a composição da blenda (0-100%), utilizando a lipase de *R. oryzae* (LRO) como catalisador na esterificação do ácido láurico com n-pentanol. Os resultados de percentagem de conversão em ésteres utilizando esta lipase imobilizada nas diferentes composições da blenda PSS/PEO estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de percentagem de conversão (C,%) em laurato de n-pentila obtidos com lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em blendas de PSS/PEO.

PSS/PEO (% m/m)	Conversão (%) ^a
100:0	57
98:2	85
95:5	89
90:10	96
80:20	98
70:30	98
50:50	98
40:60	98
20:80	98
0:100	98

(a) 50 mg do preparado enzimático/ g de suporte, 24 h, solvente: n-hexano, 37 °C

A análise dos dados mostra, que quando a LRO foi imobilizada no filme de PSS (PSS/PEO 100:0), esta foi menos efetiva como biocatalisador para a reação estudada obtendo-se o produto com 57% de conversão. Este resultado pode estar associado a fatores de interação entre a enzima e o suporte. Se a interação entre a enzima e o PSS, que apresenta grupamentos sulfonato na sua estrutura (estrutura 4, pg 50), for muito forte poderão ocorrer mudanças conformacionais na estrutura nativa. Uma outra possibilidade, é

que os grupos sulfonatos carregados negativamente, podem interagir com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima. Como resultado, foi observado experimentalmente uma diminuição na porcentagem de conversão do éster nas condições testadas. Na presença de 2% de PEO, a porcentagem aumentou para 85%, indicando que interações de caráter mais hidrofóbico tipo “enzima-polímero” devem predominar neste sistema. A partir da composição da blenda PSS/PEO 80:20, os ésteres foram obtidos com bons rendimentos (98 %), evidenciando que a lipase manteve a sua atividade catalítica.

Portanto, estes resultados mostram que a presença de cargas negativas no suporte influencia na atividade deste biocatalisador. A partir deste estudo, optou-se em trabalhar com a composição 80:20 para a blenda de PSS:PEO.

A seguir, lipases de diferentes procedências e atividades foram imobilizadas nos diversos materiais poliméricos, incluindo a blenda PSS:PEO (80:20). Para fins comparativos, a mesma reação e nas mesmas condições experimentais foram realizadas com os diversos preparados enzimáticos de lipases na forma livre em suspensão de acordo com o método descrito por Klivanov.¹³⁰

As conversões em éster, utilizando os diversos sistemas testados são mostradas na Tabela 10.

Tabela 10 – Percentagem de conversão (%)^a em laurato de n-pentila obtidos com lipases de diferentes fontes e suportes immobilizados.

Lipases	Suportes								
	Carbopol (PAA)	P(VP-co-VA)	PSS	PVA	CMC	GAL	XAN	PSS:PEO (80:20)	CMC
LTL	0	23	13	92	27	73	79	42	8
LPP	0	11	8	19	7	0	0	24	18
LRM	0	58	10	58	34	86	66	80	58
LMM	0	99	15	77	11	99	66	15	99
LAN	0	3	17	3	6	0	14	27	5
LRO	0	99	57	99	99	99	99	98	99
LCR	0	26	15	9	5	30	48	9	8
LMJ	0	93	13	31	70	86	67	6	70
LPS	0	92	59	99	7	0	78	13	99

(a) determinados por RMN-¹H. Condições reacionais: [substratos]=0,1M, massa de preparados enzimáticos = 50 mg, tempo de reação = 24h, temperatura = 30°C, solvente:n-hexano.

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que a porcentagem de conversão, em laurato de n-pentila, catalisada pelas diversas lipases, de modo geral, variou de acordo com o tipo de suporte utilizado quando comparando com a forma não imobilizada.

Destacam-se os resultados obtidos com o Carbopol (PAA) como suporte, que é um polímero sintético e formado por unidades do ácido acrílico, o qual foi o primeiro a ser utilizado. Os dados mostram que não ocorreu a formação do produto nas condições reacionais testadas independente da lipase imobilizada. Experimentos envolvendo o aumento do tempo reacional para 120h, foram realizados com a LMJ, LCR, LAN, LRM e LRO imobilizadas neste suporte. Nestas condições, também não foi verificada a formação do produto.

Estes resultados indicam que as lipases imobilizadas em PAA estão inativas, quando comparadas com os resultados obtidos na mesma reação de esterificação com as lipases não imobilizadas (forma livre). A inativação pode estar associada ao pH da solução polimérica, que é 2,5 e portanto muito ácido. De acordo com VOET *et al.*, a baixa estabilidade conformacional das proteínas nativas tornam-nas muito suscetíveis à desnaturação por alteração do balanço das forças, não de ligação, as quais mantêm a conformação nativa. As enzimas podem ser desnaturadas por uma variedade de condições e substâncias, incluindo o pH do meio. A variação do pH altera as cargas das cadeias iônicas laterais de aminoácidos, modificando a distribuição destas cargas e a presença de ligações de hidrogênio, as quais são fundamentais para a manutenção da estrutura terciária, levando assim a desnaturação.¹

Trabalhos na literatura mostram que a atividade da enzima depende do pH, sendo que a maioria apresenta atividade máxima em pH próximo a neutralidade.^{5, 13, 80, 88}

A correção do pH para 7,0, foi realizada adicionando-se lentamente gota-a-gota trietilamina. Obteve-se assim um gel, e a seguir acrescentou-se a enzima (50 mg) e

evaporou-se o solvente de acordo com o item 4.2.1. Para este estudo utilizaram-se as lipases: LMM, LAN, LRO, LCR e LMJ. As análises de RMN-¹H de alíquotas da reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, indicaram que não houve a formação de produtos.

Portanto, além do efeito do pH, outros fatores devem estar interferindo para a inativação das lipases neste suporte. A imobilização em um suporte ocorre por interações entre as cadeias laterais dos aminoácidos da proteína e grupamentos presentes no material polimérico. Postula-se que estejam formando ligações de hidrogênio e/ou iônicas entre o polímero e o biocatalisador, o que poderá acarretar mudanças conformacionais e inativação das enzimas.

Este efeito foi também observado por Crespo⁸⁷, na esterificação do ácido láurico com n-pentanol, utilizando a lipase da *C. cylindracea* imobilizada em Carbopol a 35°C. Neste trabalho foram utilizadas blendas poliméricas formadas pela associação do Carbopol/PEO em diferentes proporções. Não houve formação de produto com a LCR imobilizada em blendas com composições de 100:0 até 50:50 (Carbopol:PEO). A partir da composição 40/60 até 0/100%, a conversão em éster aumentou de 10 para 86%, mostrando que o aumento da quantidade de PEO levou a uma maior porcentagem de conversão em éster.⁸⁷

De acordo com Bosley⁸¹, não seria correto utilizar a eficiência de um processo comparando-se diferentes lipases imobilizadas no mesmo suporte. Entretanto, pode-se utilizar para comparar a mesma lipase em diferentes suportes. Assim, os resultados obtidos e apresentados na Tabela 10 que se referem aos outros suportes, serão apresentados de forma geral salientando os melhores dados obtidos com cada lipase.

Na esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada pela lipase de *T. lanuginosus*¹³¹ (LTL) observou-se um aumento da atividade após a imobilização em PVA (92%), GAL (73%), XAN (79%), ou nas blendas de PSS:PEO(80:20) (42%) e CMC/PVA (81%), em comparação com a da forma livre (25%). Com os outros suportes ocorreu uma redução da atividade quando comparado com a forma livre.

Para a lipase pancreática de porco (LPP), verificou-se que a imobilização causou uma redução na atividade provocando assim uma redução na porcentagem de conversão em éster com todos os suportes testados (0-24%), e o melhor resultado foi obtido com a LPP não imobilizada (58%).

Com a lipase de *R. miehei* (LRM), verificou-se um aumento da atividade após imobilização em P(VP-co-VA) (58%), PVA (58%), GAL (86%); XAN (66%) e nas blendas PSS:PEO(80:20) (80%) e CMC/PVA (58%) em comparação com a LRM na forma livre que foi de 38%. Para os demais suportes ocorreu uma redução da atividade (0-34%).

Com a lipase de *Mucor miehei* (LMM), verificou-se um aumento da atividade após a imobilização em P(PV-co-VA) (99%), PVA (77%), GAL (99%), blendas de CMC/PVA (99%) e GAL/XAN (99%), em comparação com a forma livre que foi de 66%. Para os sistemas PSS, CMC, PSS:PEO(80:20) e PAA verificou-se uma redução da atividade da lipase (11-15%).

As maiores porcentagens de conversão em éster foram obtidas quando a lipase de *A. niger* (LAN) encontrava-se imobilizada em PSS (17%), XAN (14%) e nas blendas de PSS:PEO(80:20) (27%) e GAL/XAN (10%). Para a forma livre a conversão foi de apenas 5%. Nos demais suportes foi inferior ou igual a forma livre (0-6%).

Na esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada pela lipase de *R. oryzae* (LRO) imobilizada em todos os suportes testados, exceto em Carbopol, apresentaram

porcentagem de conversão superior (57-99%) a forma livre (33%). Estes dados mostram que a imobilização em todos os suportes, exceto em PAA, provocou um aumento da atividade da lipase.

Com a lipase de *C. rugosa* (LCR), a maior conversão em éster foi obtida após imobilização em blenda de CMC/PVA (84%), sendo superior ao resultado obtido com a forma livre (61%). A imobilização nos demais suportes provocou uma redução da atividade obtendo assim porcentagens de conversão inferior a forma livre (0-48%).

Quando a lipase de *M. javanicus* (LMJ) foi imobilizada em P(VP-co-VA) e GAL, observou-se um aumento da atividade com porcentagens de conversão em éster de 93 e 86%, respectivamente, sendo superior a forma livre (70%). Para os demais suportes ocorreu uma redução da atividade obtendo assim o éster com conversão inferior à da forma livre (0-67%), exceto em CMC que apresentou a mesma porcentagem, sendo de 70%.

As porcentagens de conversão obtidas quando a lipase de *Pseudomonas* sp (LPS) foi imobilizada em P(VP-co-VA), PVA, XAN e blenda de CMC/PVA foram de 92%, 99%, 78% e 99%, respectivamente, mostrando assim um aumento da atividade catalítica da lipase quando imobilizadas nestes suportes. Estas conversões foram superiores à obtida com a forma não imobilizada (65%). Para os demais suportes verifica-se uma redução na atividade (0-59%).

De modo geral, para a maioria dos suportes testados foi observado um aumento da atividade das lipases, verificado pelo aumento da porcentagem de conversão em éster quando comparada com a forma livre. Estes resultados provavelmente estão relacionados com a modificação do microambiente das enzimas devido à imobilização, e isso interfere na sua estabilidade e conseqüentemente, na conversão em produtos. As baixas conversões podem estar associadas também às condições reacionais utilizadas, que podem não ser

ideais para que as lipases atuem com sua atividade máxima. Outro fator que contribui é as atividades diferenciadas das lipases, como mostrado na Tabela 5.

Comparando-se as lipases imobilizadas em PSS e na blenda formada por PSS:PEO (80:20) (Tabela 10), pode-se verificar que após imobilização as porcentagens de conversão foram superiores com a maioria das lipases na blenda. As baixas porcentagens de conversão com as lipases imobilizadas em PSS podem estar associadas a efeitos de interação entre enzima/polímero como discutido anteriormente para a LRO imobilizada em blendas de PSS:PEO (Tabela 9, pg.79).

Crespo⁸⁷ imobilizou estas mesmas lipases em filmes de PEO e utilizou estes biocatalisadores na esterificação do ácido láurico com n-pentanol em n-hexano a 35°C. Comparando-se o PEO com PSS e a blenda de PSS:PEO(80:20), a imobilização em filme de PEO foi superior como suporte, formando o éster em maiores porcentagens. Isto confirma a preferência das lipases em interagir melhor com o PEO, que apresenta um caráter mais hidrofóbico que o PSS.

A partir destes resultados foram selecionados quatro polímeros: PVA, CMC, GAL e XAN e três blendas PSS:PEO(80:20), CMC:PVA e GAL/XAN para prosseguir os estudos. Entre estes, o PVA a CMC e blenda de CMC/PVA (1:1 % m/m), foram os mais utilizados neste trabalho.

O PVA foi selecionado por ser um polímero sintético bastante solúvel em água, biodegradável, apresentar várias aplicações industriais e excelente resistência química. A CMC, GAL e XAN foram selecionadas por serem biopolímeros e pouco explorados na literatura como suportes para imobilização de enzimas.

5.4 Influência do tempo reacional.

As lipases LRO e LMJ na forma livre e imobilizada em CMC foram utilizadas na esterificação do ácido láurico com n-pentanol com o intuito de se verificar o tempo mínimo para obtenção do produto em máxima conversão.

Nos tempos de 1, 3, 6, 9, 12 e 24 h, foram retiradas alíquotas do meio reacional, e estas foram submetidas à análises de RMN-¹H para determinação da porcentagem de conversão. Os valores de obtidos em função do tempo estão mostrados na Figura 19.

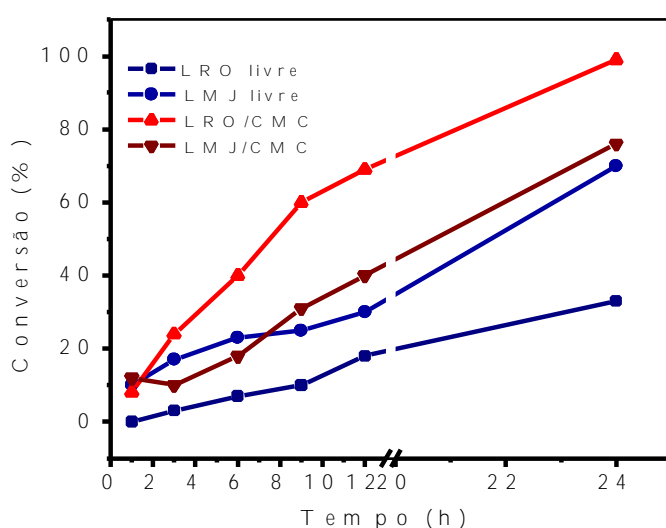


Figura 19. Efeito da variação do tempo de reação para a esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada por LRO e LMJ livre e imobilizada em CMC. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 37°C em n-hexano.

Pode-se observar que após 24h de reação, as maiores porcentagens de conversão foram obtidas quando a LRO e a LMJ estavam imobilizadas em CMC, sendo de 99 e 76%, respectivamente. Nestas condições, utilizando-se a LRO livre a conversão foi 33% e imobilizada 99%. Portanto, pode-se verificar que a LRO quando imobilizada mostrou uma

eficiência três vezes superior à da forma livre. A LMJ apresentou um aumento pouco considerável obtendo-se 70% de produto com a forma livre, e 76% após imobilização. A partir deste estudo, optou-se em fixar o tempo das reações em 24h.

5.5 Estudo da variação de massa da lipase.

O efeito da quantidade de biocatalisador na percentagem de conversão foi estudado variando-se a massa de 5-100 mg de lipases nos filmes. Esta quantidade corresponde a uma faixa de 1-16%(m/m) em relação a massa enzima/suporte. A lipase utilizada neste estudo foi a LRO imobilizada em CMC, PVA e blenda de CMC/PVA. Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na Figura 20.

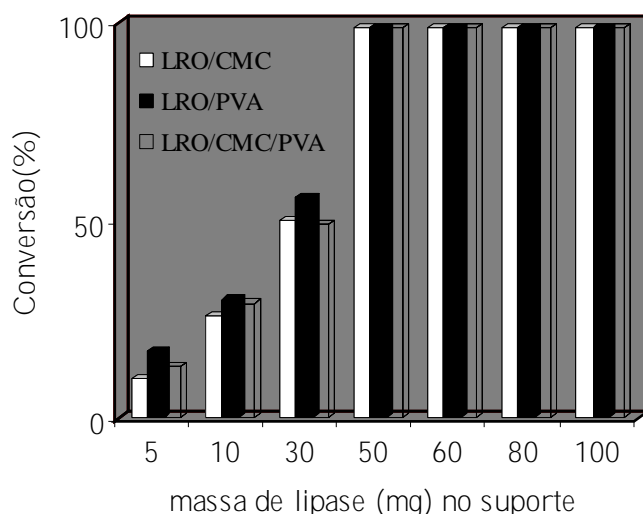


Figura 20. Efeito da variação de massa da LRO em diferentes sistemas de imobilização na esterificação do ácido láurico com n-pentanol. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 24h, 37°C em n-hexano.

A análise dos dados mostrou que ocorreu um aumento da conversão com o aumento da massa de lipase com todos os suportes testados. Com quantidades de 50-100 mg, a conversão permaneceu constante, sendo de 99% em 24h de reação. Este experimento mostrou que, com uma massa de 50 mg de enzima, obtém-se o produto com conversão quantitativa, indicando que o número de sítios disponíveis é suficiente para a quantidade de substrato utilizado.

Comparando-se as atividades das lipases utilizadas, pode-se verificar que a atividade da LRO, declarada pelo fabricante, é menor do que a LMJ, 150.000 U g^{-1} e $10\ 000\ 000 \text{ U g}^{-1}$ (Tabela 5, pg. 53). Com este experimento, verificou-se que a afinidade da LRO pelos substratos é maior, pois com a mesma massa, a conversão foi igual a da LMJ, que apresenta atividade muito superior.

A partir destes dados em todos os estudos subseqüentes foram utilizados 50 mg de enzima, o que corresponde a 10% em massa nos suportes. Esta quantidade é suficiente para atuar sobre todo o substrato utilizado, conforme discutido anteriormente.

5.6. Efeito da variação da temperatura.

Trabalhos na literatura mostram que a imobilização pode alterar a temperatura de atividade máxima. Motero *et al.*⁵ utilizaram a lipase da *C. rugosa* imobilizada em polipropileno e verificaram a sua atividade relativa na hidrólise do óleo de oliva. A hidrólise foi estudada utilizando-se a lipase na forma livre e imobilizada, em função do aumento da temperatura. Os autores verificaram que a lipase na forma livre apresentou

atividade relativa máxima a 37°C, enquanto que na forma imobilizada foi de 45°C, mostrando assim que a imobilização provocou uma mudança no perfil de temperatura.

Para avaliar o efeito da temperatura na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, as lipases pancreática de porco, *Pseudomonas* sp, *A. niger*, *C. rugosa*, *R. miehei*, *M. miehei*, *M. javanicus* e *R. oryzae* imobilizadas em CMC foram testadas em diferentes temperaturas, 25 e 37°C. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 21.

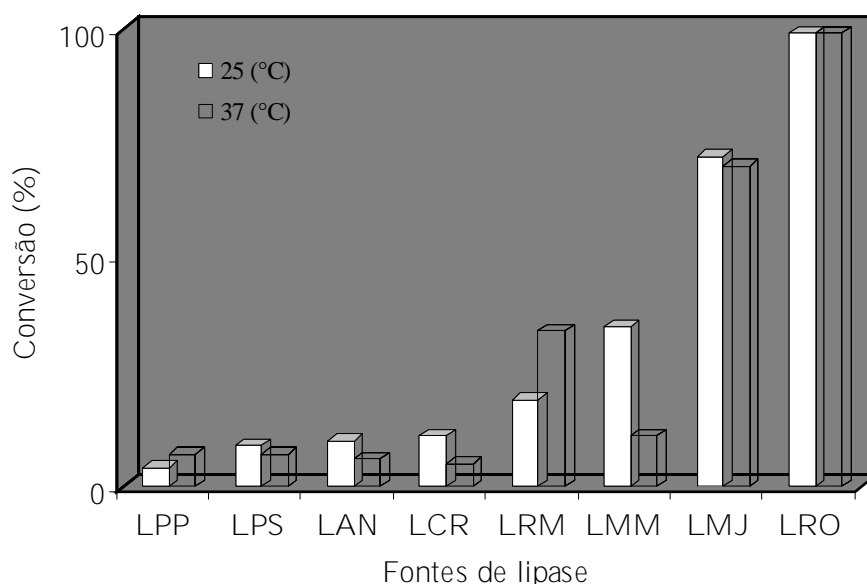


Figura 21. Influência da variação de temperatura na esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada por lipases de diferentes fontes imobilizadas em CMC. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 24h, em n-hexano.

Os resultados mostraram que os maiores valores de conversão foram obtidos utilizando-se as lipases da *M. javanicus* (72 e 70%) e *Rhizopus oryzae* (99 e 99%) a 25 e

37°C, respectivamente e que não houve variação significativa em função da temperatura para estas lipases.

Crespo⁸⁷ estudou a esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada por LRO e LMJ imobilizadas em PEO a 25 e 35°C. Foi verificado que as duas lipases também foram as mais eficientes na catalise da reação, quando imobilizadas neste sistema, obtendo-se altas porcentagens de conversão nas duas temperaturas (ver Tabela 3, pg. 29). Neste mesmo trabalho foram testadas lipases de diferentes fontes tais como pancreática de porco, *Pseudomonas sp*, *A. niger*, *C. rugosa*, *R. miehei* e *M. miehei*, imobilizadas em PEO. Estas lipases também foram utilizadas neste trabalho de tese.

Comparando-se os dois suportes, PEO (estudado por Crespo⁸⁷) e CMC, pode-se verificar que o PEO apresentou-se superior para todas as lipases testadas, independente da temperatura. A diferença nas porcentagens de conversão poderia estar associada às características de cada suporte.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os dados de temperatura onde a atividade é máxima para LRO e LMJ, na forma livre (Tabela 5, pg. 53). De acordo com as especificações do fornecedor, a atividade máxima é 37-40°C para LRO e LMJ.¹²⁶

Utilizando as outras lipases, as conversões foram baixas e isto pode estar associado às condições experimentais, onde utilizaram-se temperaturas abaixo da temperatura ideal para a atividade máxima de cada lipase. Pode-se verificar, que a temperatura ideal para estas lipases é superior a utilizada em nossos estudos (Tabela 5, pg. 53).

Para verificar a influência de temperaturas superiores a 37°C, foram determinadas as conversões em laurato de n-pentila utilizando a LRO e LMJ imobilizada em CMC, PVA

e blenda de CMC/PVA (1:1% m/m) nas temperaturas de 40, 45 e 50°C. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 22 e 23.

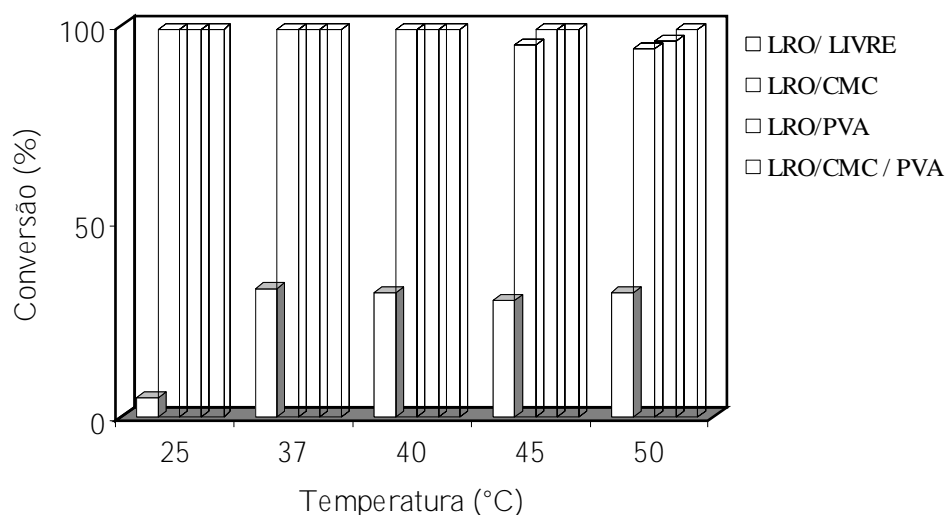


Figura 22. Influência da temperatura na esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada pela LRO na forma livre e imobilizada em CMC, PVA e blenda CMC/PVA. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 24h, em n-hexano.

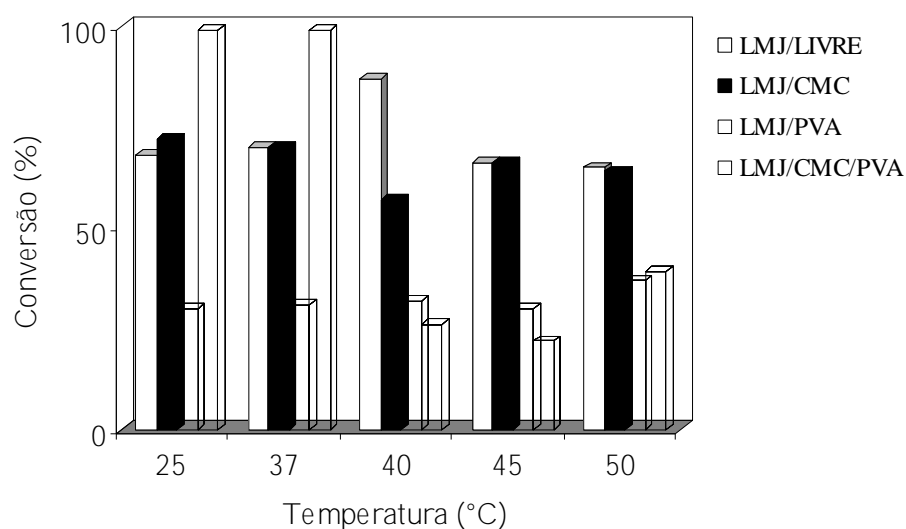


Figura 23. Influência da temperatura na esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada pela LMJ na forma livre e imobilizada em CMC, PVA e blenda de CMC/PVA. [ácido] e [álcool] = 0,1M, 24h, em n-hexano.

A análise das Figuras 22 e 23 mostra que com a LMJ o efeito da temperatura na conversão foi mais pronunciado. Para a LRO imobilizada em todas as temperaturas e em todos os suportes, as porcentagens de conversão em éster foram altas, 99%, enquanto que na forma livre foi de 5% a 25°C, e de 30-33% entre 37-50°C.

Comparando-se a LRO livre e imobilizada nos três suportes, e na temperatura de atividade máxima (37-40°C)¹²⁶, verificou-se que com a LRO imobilizada a porcentagem de conversão foi de 66%, que é superior a forma livre (33%).

Isto confirma que a imobilização provocou um aumento na atividade da enzima. Outro dado muito importante é o aumento da temperatura ótima para a atividade da lipase nos três suportes. De acordo com a ficha técnica¹²⁶ em temperaturas superiores a 40°C a atividade diminui. Este efeito não foi verificado para a LRO imobilizada nestes suportes, pois a porcentagem de conversão se manteve em valores altos, na faixa de 94-99%, mostrando que a imobilização com CMC protege da termoinativação.

Os resultados obtidos para LMJ mostraram uma variação maior na atividade dependendo do suporte e da temperatura. Com a LMJ na forma livre, as porcentagens de conversão foram de 68, 70, 66 e 65% nas temperaturas de 25, 37, 45 e 50°C, respectivamente, e de 87% a 40°C, que corresponde à temperatura onde a atividade da LMJ é máxima para a forma livre. As maiores conversões, 99%, foram obtidas com a LMJ imobilizada em CMC/PVA(1:1 % m/m) nas temperaturas de 25 e 37°C; em temperaturas superiores, a conversão foi entre 30-37%.

Comprando-se a LMJ imobilizada em CMC e PVA, verificou-se que esta lipase imobilizada em CMC apresentou-se superior à imobilizada em PVA, com porcentagens de conversão em éster de 64-72% e 30-37%, respectivamente.

Para a LMJ, de acordo com as especificações técnicas, em temperaturas superiores a 40°C a atividade diminui¹²⁴. Isto foi verificado neste trabalho, em temperaturas acima de 40°C.

5.7 Estudo da variação da concentração dos substratos.

Na síntese química de ésteres, geralmente é empregado excesso de ácido. Esta metodologia também pode ser aplicada na catálise enzimática em reações de esterificação. Foi verificado o efeito da variação da concentração dos substratos, na esterificação do ácido láurico com n-pentanol com o sistema LRO/CMC.

Inicialmente, foram utilizadas quantidades equimolares dos substratos com concentração de 0,01 – 1,00M. Os resultados são mostrados na Figura 24.

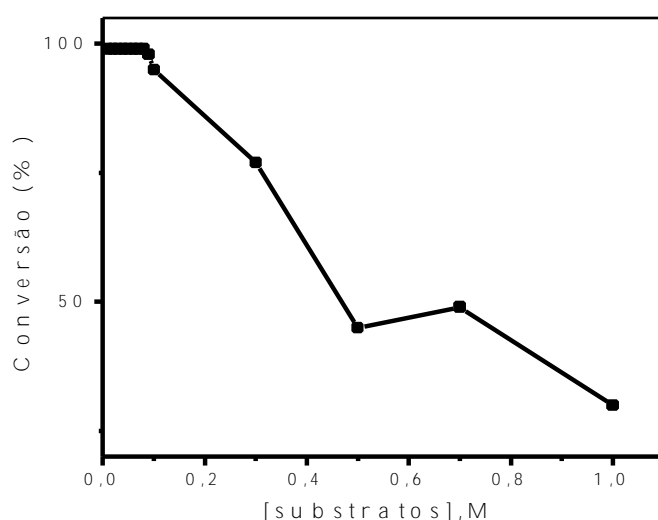


Figura 24. Efeito da concentração dos substratos em quantidades equimolares na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol catalisada pela LRO/CMC, em n-hexano a 37°C, 24h.

Os dados mostram que nestas condições, a conversão permaneceu praticamente constante e o produto foi obtido com 99%. Para concentrações acima de 0,1M (95%), observou-se uma diminuição na conversão de 77% para 30% com as razões molares de 0,30 e 1,00M, respectivamente.

Com o intuito de verificar qual dos substratos estaria causando esta inibição realizaram-se dois estudos. No primeiro, a concentração do álcool foi mantida constante (0,1M) e a do ácido variou de 0,08 – 1,00M, e no segundo a concentração do ácido permaneceu constante (0,1M), e a do álcool variou de 0,08 – 0,9M.

Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

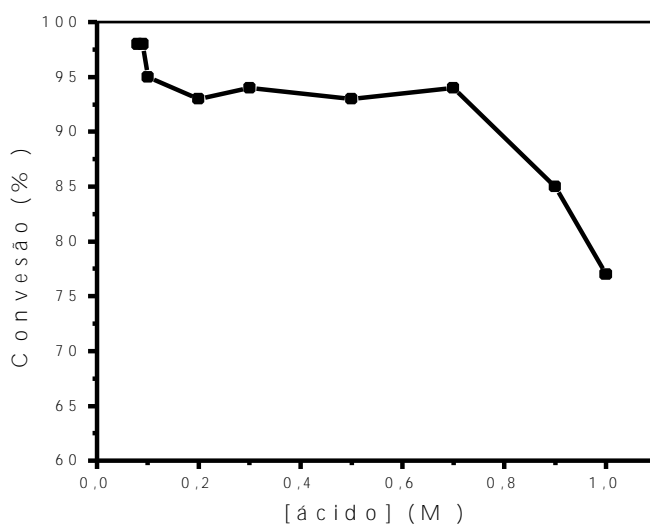


Figura 25. Efeito da concentração de ácido láurico na reação de esterificação catalisada pela LRO/CMC. [álcool] = 0,1 M em n-hexano a 37°C, 24 h.

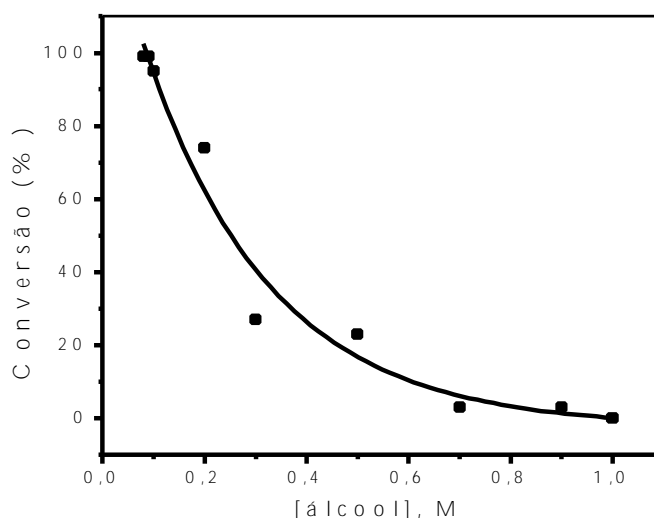


Figura 26. Efeito da concentração de n-pentanol na reação de esterificação catalisada pela LRO/CMC. [ácido láurico] = 0,1 M em n-hexano a 37°C, 24h.

Os dados reportados na Figura 25 mostram que quando se utilizou um excesso de ácido láurico nenhum efeito inibitório foi detectado, sendo que a conversão manteve-se na faixa de 77 – 99%. De fato, o progresso da reação de esterificação não foi influenciado pelo aumento da concentração de ácido láurico no meio reacional e que um excesso de ácido garantiu a formação do complexo acil-enzima, de acordo com o mecanismo citado na página 12, para posterior reação com o álcool, conduzindo assim à formação do éster.

Ao analisar a influência da concentração do n-pentanol (Figura 26), observou-se que o aumento na concentração diminuiu a atividade e conseqüentemente foi verificada uma diminuição na porcentagem de conversão. Este resultado provavelmente pode ser atribuído à formação de um complexo inativo entre a enzima e o n-pentanol.

Resultados análogos foram obtidos por Yadav e Lathi⁵⁶, no estudo da variação da concentração dos substratos na esterificação do ácido iso-butírico com n-butanol catalisada

pela Novozyme SP 435 a 30°C, em n-heptano. Os autores verificaram que para concentração de ácido constante (0,01M) e variando-se a concentração de álcool de 0,01, 0,02 e 0,03M, a conversão em éster foi de 56, 51 e 48%, com tempo reacional de 7h.

Portanto, utilizando-se concentrações equimolares de ácido:álcool até 0,10M, obtém-se o produto com alta conversão (99%), de acordo com os dados mostrados na Figura 24.

5.8. Efeito do solvente externo

As bioconversões em sistemas multifásicos dependem da escolha do solvente mais adequado para o sistema biocatalítico. Os principais critérios a serem considerados na seleção de um solvente foram mostrados na introdução (Tabela 2, pg 19).

O efeito tóxico do solvente pode ser devido a dois processos: um resultante da difusão de moléculas do solvente através da membrana citoplasmática no caso de microrganismos (toxicidade molecular); e outro associado ao contato direto entre o biocatalisador e o solvente orgânico (toxicidade de fase). A toxicidade do solvente é usualmente avaliada através do logaritmo do coeficiente de partição do solvente em um sistema padrão n-octanol/água ($\log P$), conhecido como parâmetro de Hansch, o qual é um indicador do grau de hidrofobicidade do solvente.⁶²

A ação tóxica de solventes orgânicos hidrófobos é essencialmente devido à toxicidade de fase, devido à sua baixa partição para o filme aquoso que rodeia o biocatalisador. Este fator minimiza a possibilidade de ser atingido um valor de

concentração crítica do solvente, a partir da qual é observada a ação tóxica. A imobilização do biocatalisador e a utilização de membranas hidrófobas, que evitem o contato do biocatalisador com a interface líquido-líquido, e a engenharia do biocatalisador através do “*design*” de biocatalisadores mais resistentes e apropriados a solventes orgânicos, são alternativas possíveis para diminuição da toxicidade de fase.⁶²

Para verificar os efeitos causados por diferentes solventes na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol foram selecionados três sistemas CMC, PVA e PSS:PEO (80:20) com duas lipases, LRO e LMJ. Os solventes utilizados com seus respectivos log P foram: tetrahydrofurano (0,49), éter dietílico (0,85), diclorometano (1,5), clorofórmio (2,0), tolueno (2,5), tetracloreto de carbono (3,0), ciclohexano (3,2), n-hexano (3,5) e n-heptano (4,0). Os resultados obtidos estão reportados na Figura 27.

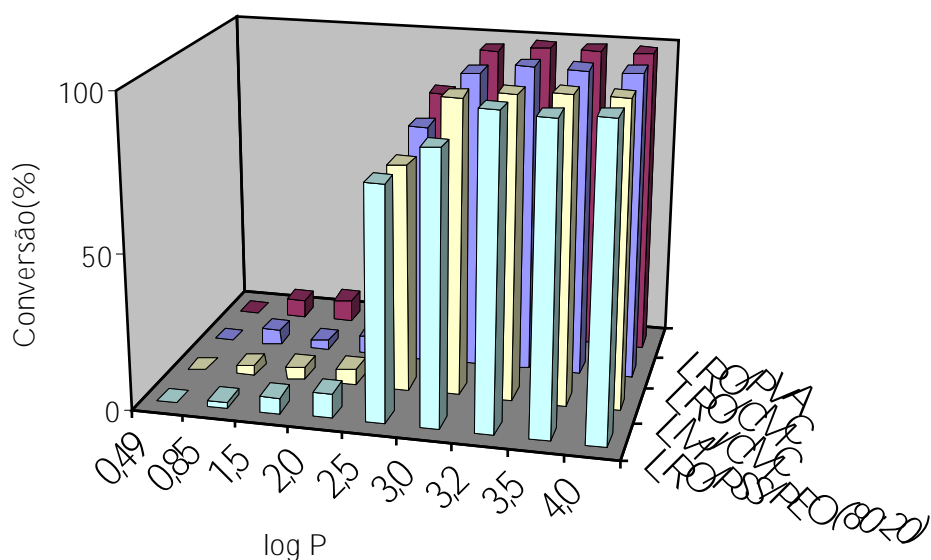


Figura 27. Efeito da variação da polaridade do solvente na esterificação do ácido láurico com n-pentanol com lipases imobilizadas em diferentes polímeros. [ácido] e [álcool] = 0,1 M, [enzima] = 50mg, 24h, 37°C.

Os resultados obtidos mostram claramente que a percentagem de conversão da reação estudada, com todos os sistemas, foi dependente do tipo de solvente utilizado. Ocorreu um aumento da percentagem de conversão com a hidrofobicidade do solvente expressada pelo log P. A conversão foi alta com solventes no qual os valores de log P encontram-se na faixa de 2,5 a 4,0.

Estes resultados estão de acordo com os mostrados por Laane *et al* onde foi verificado que existe uma tendência generalizada para a relação entre a atividade catalítica e a hidrofobicidade do solvente. É recomendado utilizar solventes com $\log P \geq 4,0$ (apolar) para obter altas taxas de conversão.⁶³

Os dados apresentados na Figura 27, mostram que solventes com log P acima de 2,5 são excelentes como meio reacional e os mais polares levam à formação do produto em menores conversões. A baixa atividade das lipases em solventes com log P baixo, comparado com os acima de 2,5, seria devido ao fato de que o tetrahidrofurano, éter dietílico, diclorometano e clorofórmio provavelmente retirariam a camada de água essencial ao redor da enzima causando uma distorção na conformação cataliticamente ativa da enzima.

Klibanov salientou que é requerida uma quantidade mínima de água para preservar a conformação cataliticamente ativa em solventes hidrofóbicos. Por outro, lado solventes mais hidrofóbicos tais como tolueno, tetracloreto de carbono, ciclohexano, n-hexano e n-heptano preservam a atividade catalítica sem provocar distúrbios na microcamada aquosa em torno da enzima.¹³²

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com os mostrados por vários autores.

Krishna e Basri, mostraram que foi obtida uma baixa porcentagem de conversão para a reação de esterificação do ácido acético com o álcool iso-amílico com solventes com $\log P < 2,5$.¹³³

Ottosson *et al.* mostraram que a resolução cinética do 3-metil-2-butanol catalisada pela lipase de *C. antarctica* B, foi altamente dependente do solvente utilizado. A melhor enantioseparação foi obtida com solventes de alta hidrofobicidade tal como n-hexano.⁶⁸

Yadav *et al.* utilizaram a Novozyme 435 na obtenção do iso-butirato de butila, e a conversão foi dependente do solvente utilizado. Solventes tais como tolueno, heptano, iso-octano, 1,4-dioxano e n-hexano foram usados, e a maior porcentagem de conversão, 57% foi obtida com o solvente mais hidrofóbico, o n-heptano.⁵⁶

Jesus *et al.* estudaram o efeito de solvente na reação de esterificação do ácido oléico com 1-pentanol, catalisada pela *C. viscosum* imobilizada em organo-gel de gelatina formado com microemulsão água-óleo (MBGs). A conversão em éster foi dependente do solvente utilizado, sendo de 78-88% para solventes com $\log P$ na faixa de 3,5-4,5.⁷⁰

Estes resultados mostram a grande importância da escolha do solvente nas biotransformações para obter produtos com altas porcentagens de conversão.

5.9. Reutilização e tempo de estocagem do biocatalisador.

A estabilidade e estocagem de um biocatalisador imobilizado são parâmetros importantes que podem determinar a viabilidade econômica de um processo biosintético.

A estabilidade da LRO na forma livre e imobilizada em CMC, PVA, GAL, XAN, e blends CMC/PVA, GAL/XAN e PSS/PEO (80:20), foi verificada através de sucessivas sínteses do laurato de n-pentila nas quantidades descritas no item 4.3.

Ao final de cada reação, a qual teve um período de 24h, a lipase livre e imobilizada nos diversos suportes, foi removida do meio reacional e lavada repetidas vezes com o solvente, n-hexano, para remover os substratos e produtos que eventualmente ficaram retidos na matriz. A seguir, adicionou-se novamente a matriz limpa em um novo meio reacional, contendo os substratos nas quantidades descritas e este ciclo foi repetido por 10 vezes. Neste estudo analisou-se também o tempo de estocagem do biocatalisador imobilizado, sendo o total de 80 dias. Os resultados são mostrados na Figura 28.

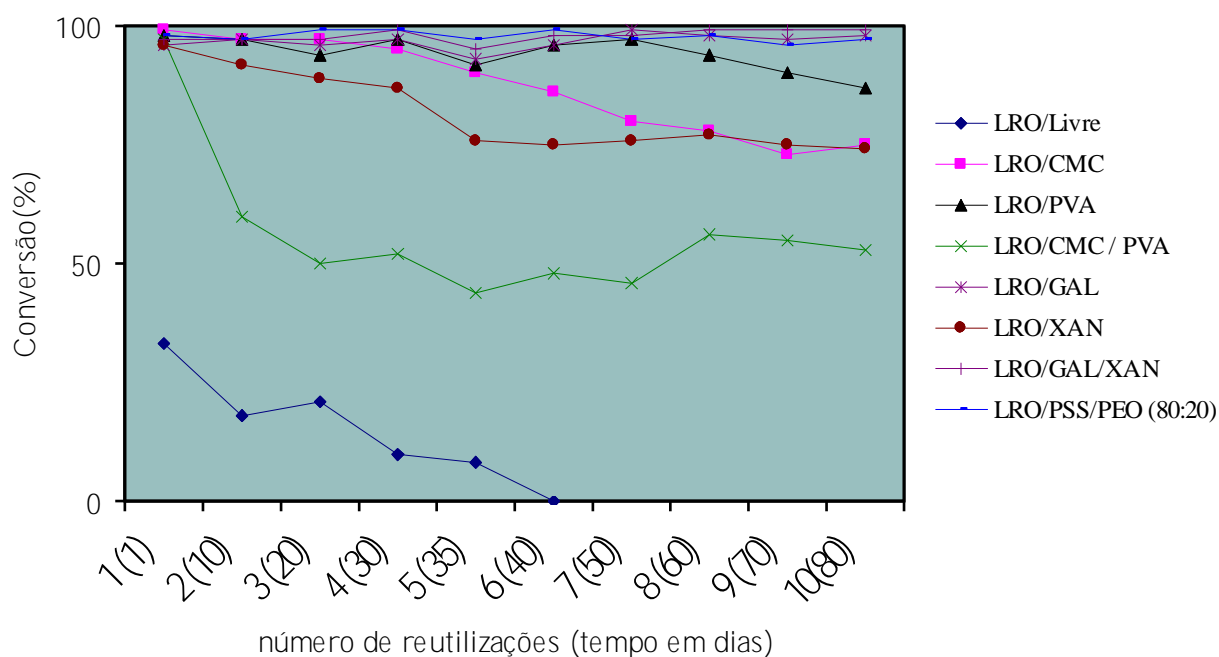


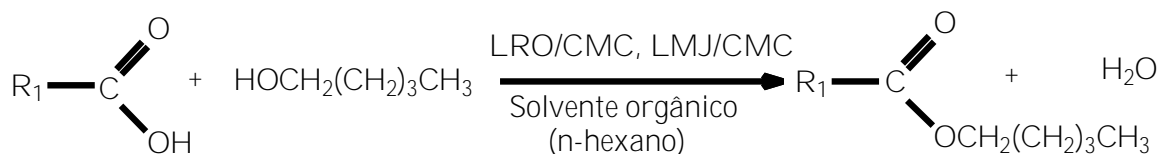
Figura 28. Influência do tempo de estocagem e reutilização na esterificação do ácido láurico com n-pentanol com a LRO na forma livre e imobilizada em diferentes suportes. [ácido] e [álcool] = 0,1 M, [LRO] = 50 mg, 24h, 37°C em n-hexano.

A análise dos dados mostra que a LRO na forma livre perde sua atividade totalmente em quarenta dias de armazenagem no solvente, ou seja, após o sexto ciclo de reutilização. A redução na conversão pode estar associada à perda de massa de enzima a cada ciclo, pois era lavada com o solvente orgânico e filtrada ou poderia estar ocorrendo a perda da atividade catalítica devido a desnaturação. Quando a LRO está imobilizada em todos os suportes testados, ocorreu a formação do éster com altas porcentagens de conversão, mesmo após oitenta dias de armazenagem no solvente e com dez ciclos reacionais. Para os sistemas LRO/CMC, LRO/PVA, LRO/GAL, LRO/XAN, LRO/GAL/XAN, LRO/PSS/PEO(80:20), a conversão se manteve na faixa de 74-99%. A diminuição de aproximadamente 54% da conversão inicial foi observada para o sistema CMC/PVA após os dez ciclos e oitenta dias de armazenagem.

Os resultados comprovam a eficiência catalítica da LRO na síntese de laurato de n-pentila e confirmam a estabilidade destes sistemas para a imobilização de lipases. Outro fator extremamente importante é o aumento da eficiência da lipase imobilizada nos diversos polímeros. Durante o período de duração do experimento não foram observadas mudanças na aparência macroscópica dos filmes.

5.10. Efeito do doador acila

O estudo da variação do comprimento da cadeia do doador acila foi realizado utilizando o n-pentanol e ácidos com cadeias alquílicas variando de C3-C18, e com a presença de insaturações, ácidos 2-octenóico, 4-pentanóico e 8-octadecenóico (Esquema 9).



$\text{R}_1 = \text{CH}_3\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-$; $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2-$; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2-$

Esquema 9 – Equação geral para as reações de esterificação de diferentes ácidos com n-pentanol.

Os sistemas utilizados para este estudo foram LRO/CMC e LMJ/CMC, as reações foram efetuadas a 37°C e 24h. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 29.

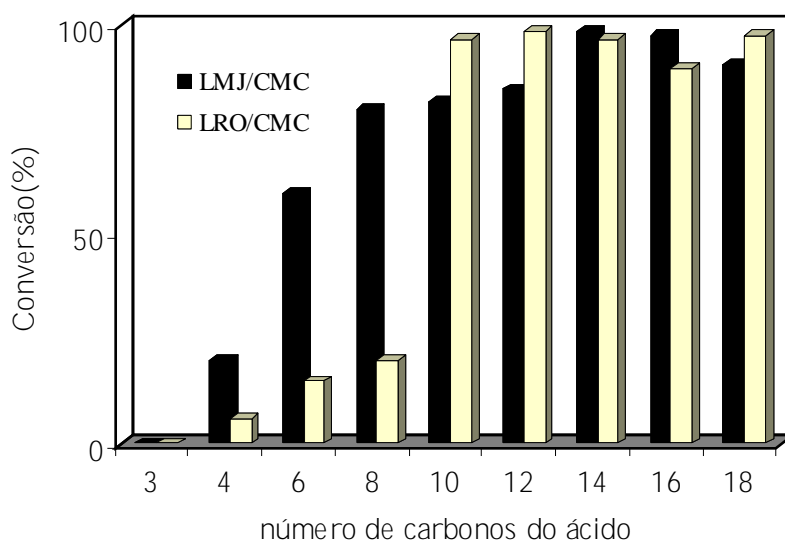


Figura 29 – Efeito do comprimento da cadeia do doador acila na reação de esterificação com n-pentanol: [ácido] 0,1M. [álcool] 0,1M, solvente: n-hexano, 37°C, 24h.

Os resultados mostram que a conversão é função do tamanho da cadeia do ácido após 24h de reação. Pode-se verificar que à medida que o comprimento da cadeia aumenta de C3 para C18, a conversão em éster tende a aumentar para as duas lipases estudadas.

O efeito da variação da cadeia do doador acila na esterificação catalisada por lipases é mostrado por vários autores. González-Navaro e Braco, mostraram que velocidade inicial para a esterificação do geraniol, catalisada pela lipase pancreática de porco (PPL) na forma livre, foi dependente do tamanho do doador acila. Quando o doador acila foi o ácido esteárico (C18) ou oleico (C18:1), a reação de esterificação foi 20 vezes mais eficiente do que com o ácido mirístico (C14).¹³⁴

O aumento na conversão com a cadeia do ácido, também foi verificada por Pereira *et al* com a lipase da *Candida rugosa* imobilizada em quitosana. Os autores testaram a seletividade da lipase na reação de esterificação de ácidos de C2-C12 com butanol e após 24h as conversões foram de 40-45%.¹³⁵ Shintre *et al*, verificaram que a conversão em ésteres benzílicos com os ácidos C8, C10, C12 e C14 também aumentou como o aumento da cadeia do ácido.¹³⁶

O aumento da cadeia do ácido nem sempre leva a um aumento na conversão. Peter e Preda verificaram que o aumento da cadeia causou uma diminuição na constante de velocidade para a reação de esterificação de ácidos com n-pentanol catalisada pela LPP, na forma livre, em n-hexano. Os ácidos utilizados foram de C3-C18 e C18:1. Os resultados indicaram uma alta especificidade da LPP pelos ácidos butirico (C3) e valérico (C5) e uma velocidade muito baixa para ácidos com cadeias maiores tais como palmítico (C16) e esteárico (C18), sendo que estes não foram considerados os melhores substratos. Para os ácidos com o mesmo tamanho de cadeia (C18) a presença de uma insaturação (C18:1), causou uma leve diminuição na especificidade.¹³⁷

Abbas *et al.* mostraram que a velocidade de reação aumentou com o aumento do número de carbonos do ácido. Por exemplo, o caprato de butila foi sintetizado mais rapidamente do que o butirato de butila, o qual foi obtido com velocidade maior que o propionato de n-butila.⁸⁶

Os resultados deste trabalho mostram que a LRO apresentou uma maior atividade com ácidos entre C10 – C18, com conversões entre 97-99%. Entretanto, a LMJ apresentou uma maior atividade com ácidos de C6-C18, com conversões em éster de 60-99%.

Os resultados obtidos, bem como os reportados na literatura, demonstram que a seletividade dos ácidos graxos é, usualmente, dependente das propriedades da enzima nativa, e é equivalente para a reação de hidrólise. A reação de síntese catalisada por lipases envolve, como primeira etapa, a formação de um intermediário acil-enzima tetraédrico (ver Figura 2, pg. 12), e a formação deste complexo seria considerada como dependente da afinidade entre o ácido e a enzima. Como o ácido está envolvido na primeira etapa da reação, qualquer mudança na sua estrutura afeta a velocidade de formação do complexo.¹³⁵

De acordo com Faber, estas etapas envolvidas no mecanismo podem explicadas através do modelo de encaixe induzido para ação da enzima, em termos de energia de ligação, a qual é liberada quando o substrato liga-se ao sítio ativo. A habilidade de vários substratos em se ligar ao sítio da lipase e liberar uma quantidade suficiente de energia, a qual é requerida para ocorrer mudanças na conformação para tornar um catalisador mais eficiente é diferente. Substratos pequenos, que não possuem a habilidade de liberar energia suficiente, não são hábeis em mudar a conformação da lipase para uma forma cataliticamente desejada e a reação se processa lentamente. Entretanto, substratos com cadeias grandes são hábeis em liberar energia suficiente para provocar as mudanças

desejadas e a reação se processa rapidamente com valores de conversão altos. Outro fator importante, que deve ser considerado é a toxicidade do ácido sobre o biocatalisador.³

É citado na literatura⁸⁶ que ácidos com cadeias pequenas, tais como o acético(C2) e propiônico (C3) são inibidores potentes para a atividade de lipase causando a “morte” e a inibição por reagir preferencialmente com o resíduo de serina do sítio ativo. Este mesmo efeito foi observado para ambas as lipases estudadas, sendo que com o ácido C3 não foi houve a formação do produto.

O efeito da presença de insaturação na cadeia do ácido na atividade enzimática também foi verificado. Para este estudo também foram utilizadas a LRO e LMJ imobilizadas em CMC. Os dados obtidos são mostrados na Figura 30.

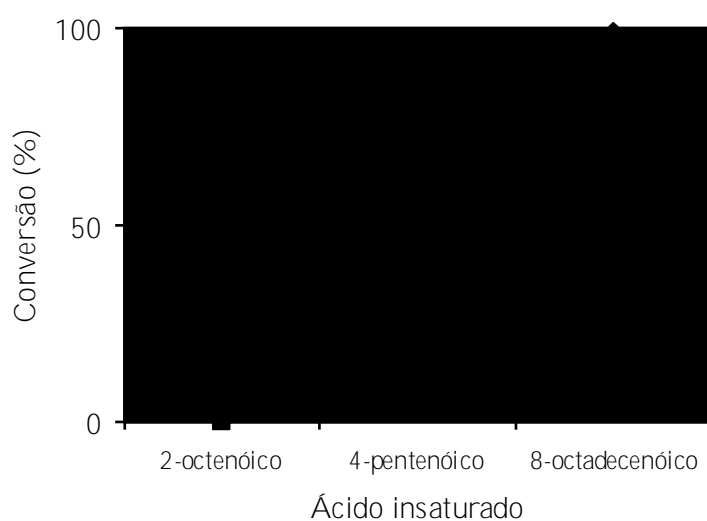


Figura 30 – Efeito da posição da insaturação e tamanho da cadeia do doador acil na reação de esterificação com n-pentanol: [ácido] 0,1M. [álcool] 0,1M, solvente: n-hexano, 37°C, 24h.

De acordo com os dados mostrados na Figura 30, observa-se que a posição da insaturação na cadeia influenciou na conversão em éster. Quando a insaturação está posicionada próxima ao grupamento carboxila, como no ácido 2-octenóico, não houve a formação de produto. À medida que a insaturação se afastou, a conversão aumentou e isto pode ser justificado através do melhor encaixe do ácido no sítio ativo.

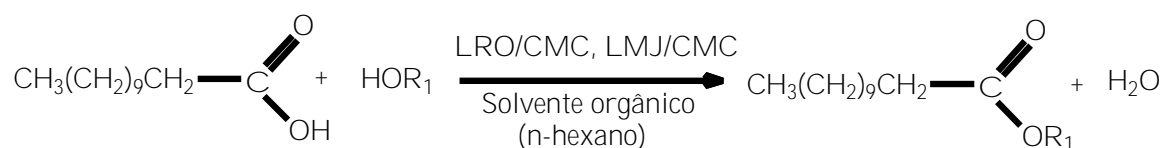
Quando a dupla ligação está muito próxima ao grupo carboxila ela causaria um impedimento estéreo e um enrijecimento da molécula, visto que os carbonos são híbridos sp^2 , e isso dificultaria a entrada do ácido no sítio ativo. Pode-se propor também que a ligação dupla estaria em ressonância com o grupamento carbonila e isso deixaria este carbono menos eletrofílico, o que dificultaria o ataque nucleofílico do resíduo de serina, que é a primeira etapa da reação (Figura 2, pg 12). À medida que a posição da dupla se afasta, estes efeitos são minimizados, e observou-se um aumento na conversão em éster com as duas lipases testadas.

Portanto, o tamanho da cadeia e a posição da dupla ligação também influenciam nos resultados obtidos nas reações biocatalisadas.

5.11 – Efeito do tamanho da cadeia do álcool.

Foi sintetizada uma série de ésteres utilizando o ácido láurico e álcoois variando-se o tamanho da cadeia alquílica. Foram realizados experimentos com álcoois contendo 2 a 18 átomos de carbono, de cadeia normal e saturada. Em seguida, utilizaram-se álcoois com ramificações próximas e afastadas da hidroxila (Esquema 10). A esterificação foi realizada a 37°C com tempo de incubação 24h em n-hexano. Os sistemas utilizados para este estudo

foram LRO/CMC e LMJ/CMC. Os resultados obtidos no estudo para os álcoois de cadeia normal são mostrados na Figura 31. A formação dos produtos foi confirmada por RMN-¹H pela presença de um triplete em 4,1 ppm correspondente ao CH₂ do éster obtido. Os demais hidrogênios localizaram-se na região de 0,9 – 2,4 ppm.



R₁ = CH₃CH₂-; CH₃CH₂CH₂-; CH₃CH₂CH₂CH₂-; CH₃(CH₂)₃CH₂-; CH₃(CH₂)₄CH₂-; CH₃(CH₂)₆CH₂-; CH₃(CH₂)₈CH₂-; CH₃(CH₂)₁₆CH₂-; CH₃CH(CH₃)-; CH₃CH(CH₃)CH-; (CH₃)₃C-

Esquema 10 – Equação geral para as reações de esterificação do ácido láurico com diferentes álcoois.

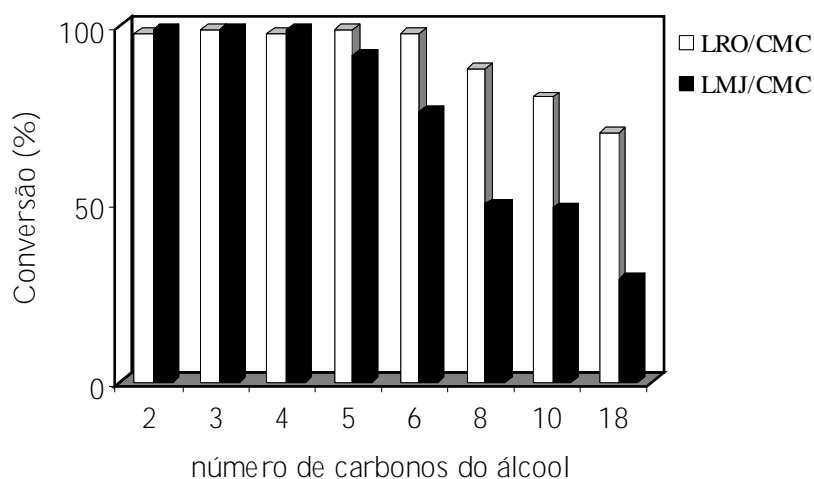


Figura 31 – Efeito do comprimento da cadeia do álcool na reação de esterificação do ácido láurico catalisada por LRO/CMC e LMJ/CMC: [ácido]= 0,1M. [álcool]= 0,1M,[enzima]=50 mg, solvente: n-hexano, 37°C, 24h.

As lipases imobilizadas exibiram altas atividades com álcoois de até 5 carbonos, para os superiores houve um decréscimo na porcentagem de conversão. As lipases de *R. oryzae* e *M. javanicus* imobilizadas em CMC são mais acessíveis para álcoois com cadeias variando de C2-C6 e C2-C5, respectivamente, obtendo-se os ésteres com conversão superior a 90%. Com o aumento da cadeia, de C8 para C18, observou-se uma diminuição gradual da porcentagem de conversão em éster para as duas lipases utilizadas. Para a LRO foram verificadas porcentagens de conversão de 88, 80 e 70% e para a LMJ porcentagens de 50, 50 e 29% para os álcoois C8, C10 e C18 respectivamente.

Um efeito contrário foi observado na reação de esterificação do ácido oléico com diferentes álcoois catalisada pela *C. viscosum* (LCV) imobilizada em organo-gel. Foi observado que para os álcoois possuindo de dois a seis carbonos, as conversões foram de 60 a 72%, enquanto que para álcoois com C8, C10 e C18 as conversões foram de 80, 82 e 75%, respectivamente.¹³⁸

As lipases de *R. oryzae* e *M. javanicus* apresentam alta atividade para álcoois com cadeias curtas. Baseado na hipótese do complexo intermediário acil-enzima, Esquema 1 (pg. 12) no sentido de formação do éster, o álcool está envolvido na etapa de desacetilação e atua como um nucleófilo atacando a ligação acila. A velocidade de esterificação, para um ácido em particular, seria dependente da acessibilidade do sítio ativo, enquanto que a seleção do álcool para a síntese, catalisada por uma enzima, não é tão dependente do sítio ativo, mas sim mais da região que o circunda. Visto que os álcoois não estão envolvidos no processo de acilação para a formação do complexo acil-enzima, a velocidade de formação de um éster é então determinada pela difusão da molécula de álcool para dentro do sítio ativo.¹³⁹

Álcoois alifáticos com cadeias pequenas apresentam vantagens por se difundirem mais rapidamente até o sítio ativo em comparação com os de cadeias grandes, que causam uma diminuição na reatividade da enzima. Esta tendência geral foi observada para outras lipases tais como as de *M. miehei*, *Aspergillus* sp, *C. rugosa* e *R. arrhizus*¹⁴⁰, onde a atividade máxima foi observada para álcoois com C4 e C6. O mesmos efeitos foram observados por Pereira *et al.*¹³⁵ com a lipase da *C. rugosa* imobilizada em gotas de quitosana na esterificação do ácido butírico com álcoois variando a cadeia de C2 a C10, sendo que a maior atividade foi para álcoois entre C4 e C6.

Esta diferença na atividade de uma lipase pela variação do álcool, pode ser entendida também em termos de energia de ligação quando um substrato se liga ao sítio ativo. Poucos substratos que se ligam ao sítio podem realizá-lo com quantidade de energia suficiente para provocar mudanças conformacionais na estrutura da lipase, tornando-as catalisadores mais eficientes (modelo do encaixe induzido para ação das enzimas).⁴³

Na literatura é mostrado que substratos tais como metanol e etanol, os quais são pequenos, não são capazes de liberar energia suficiente e provocar mudanças conformacionais na estrutura nativa, para assim obter a atividade catalítica desejada, por isso a reação se processa lentamente.^{43,80,135,139} Este efeito também foi observado para ácidos, como citado anteriormente (item 6.13)

Um dado contraditório obtido refere-se a obtenção, com alta taxa de conversão, de éster etílico. Trabalhos na literatura mostraram que quando o etanol é utilizado, a velocidade de formação do laurato de etila é muito baixa, como discutido anteriormente, pois pode ocorrer desnaturação da enzima devido a remoção da camada de água essencial.

80,135,139

Porém, este efeito não foi observado com as duas lipases utilizadas, mostrando que cada uma apresenta características próprias ou até mesmo que este resultado pode ter sido causado pela imobilização nos polímeros e/ou perda do etanol durante o processo de evaporação do solvente.

O efeito estéreo é também um fator importante na síntese de ésteres. Assim, foi realizada a esterificação do ácido láurico com iso-propanol, iso-butanol e terc-butanol catalisada pela LRO e LMJ imobilizadas em CMC. Para os três álcoois testados não ocorreu a formação de produtos em 24h de reação para as duas lipases testadas. No intuito de verificar se com o aumento do tempo de reação ocorreria a formação de produtos, os reagentes e os sistemas foram deixados em contato por 72h, e o mesmo efeito foi verificado.

A não formação dos produtos pode ser atribuída ao efeito de reconhecimento da enzima, ou seja, estes substratos mais impedidos estericamente não são alojados efetivamente no sítio ativo. Como citado anteriormente, a velocidade de formação de um éster depende da difusão do álcool até o sítio ativo, e como estes álcoois apresentam ramificações, estas podem dificultar a entrada no sítio e não formam os produtos.

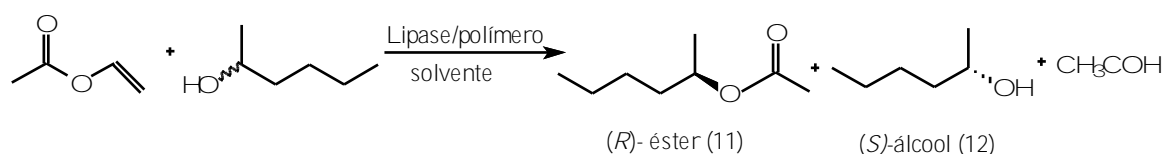
Este efeito foi verificado por Lai e O'Connor na esterificação do ácido hexanóico com sec-butanol, iso-butanol e terc-butanol catalisada pela lipase pancreática de cabra (LPC). Os autores verificaram que a presença de ramificações próximas à hidroxila, diminuiu a velocidade de formação de produtos aproximando-se de zero no caso do terc-butanol.¹³⁹

Portanto, o efeito da estrutura do álcool utilizado na síntese de ésteres catalisada por enzimas pode ser previsto pelas propriedades tais como tamanho da cadeia carbônica e efeito estéreo.

5.12 Aplicações preliminares em resolução

A habilidade das enzimas para discriminar enantiômeros de substratos racêmicos está bem documentada. Na última década vem crescendo o número de trabalhos na área de resolução enzimática não só de álcoois, mas também de aminas, amidas e ácidos carboxílicos, devido à regiosseletividade e especificidade enantiomérica das enzimas.¹⁴¹

Inicialmente a reação de transesterificação enantiosseletiva do acetato de vinila (3 mmol) com (*R,S*)-2-hexanol (1,0 mmol) foi realizada em n-hexano a 37°C, utilizando as lipases de *R. miehei*, *M. miehei*, *C. rugosa*, *R. oryzae*, *M.javanicus*, *A. niger* e *Pseudomonas* sp todas na forma livre no intuito de verificar qual das lipases apresentava discriminação quiral (Esquema 11). As reações foram monitoradas por CG com coluna quiral nos tempos de 24, 48 e 72h. Entre as lipases testadas somente a *Pseudomonas* sp apresentou discriminação quiral em 24h.



Esquema 11 – Equação geral para a resolução do (*R,S*)- 2-hexanol.

A seguir a lipase selecionada foi imobilizada em três suportes GAL e em blendas de CMC/PVA e GAL/XAN e utilizada na resolução do (*R,S*)-2-hexanol, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Alguns trabalhos publicados relacionados a resolução de álcoois racêmicos catalisada por lipases, mostram que a preferência na catálise é, em geral, pelo isômero que tem a configuração absoluta *R*^{87, 141, 142}.

Neste trabalho obteve-se o éster (11) com configuração *R* e o álcool que não reagiu (*S*)-12 (Esquema 11, p 115)

Os excessos enantioméricos (ee) foram determinados pela razão da área dos picos obtidos na separação por cromatografia gasosa com coluna quiral e determinados utilizando a Equação 1 (pág. 41). As razões enantioméricas (E) foram determinadas a partir das Equações 2 e 3 (pág. 41).

A Figura 32 apresenta: o cromatograma de (a) o padrão racêmico do (*R,S*)-hexanol mostrando a separação dos isômeros, (b) o cromatograma dos ésteres obtidos via química tradicional (reação do (*R,S*)-2-hexanol com cloreto de acetila mostrando a separação do (*R*)-éster e (*S*)-éster e (c) uma alíquota da reação após 24h, catalisada pela lipase de *Pseudomonas* sp imobilizada em GAL. Observa-se a obtenção do éster (*R*) preferencialmente ao (*S*). A partir de 24h de reação pode-se observar o aparecimento do éster (*S*), como mostra o cromatograma (c).

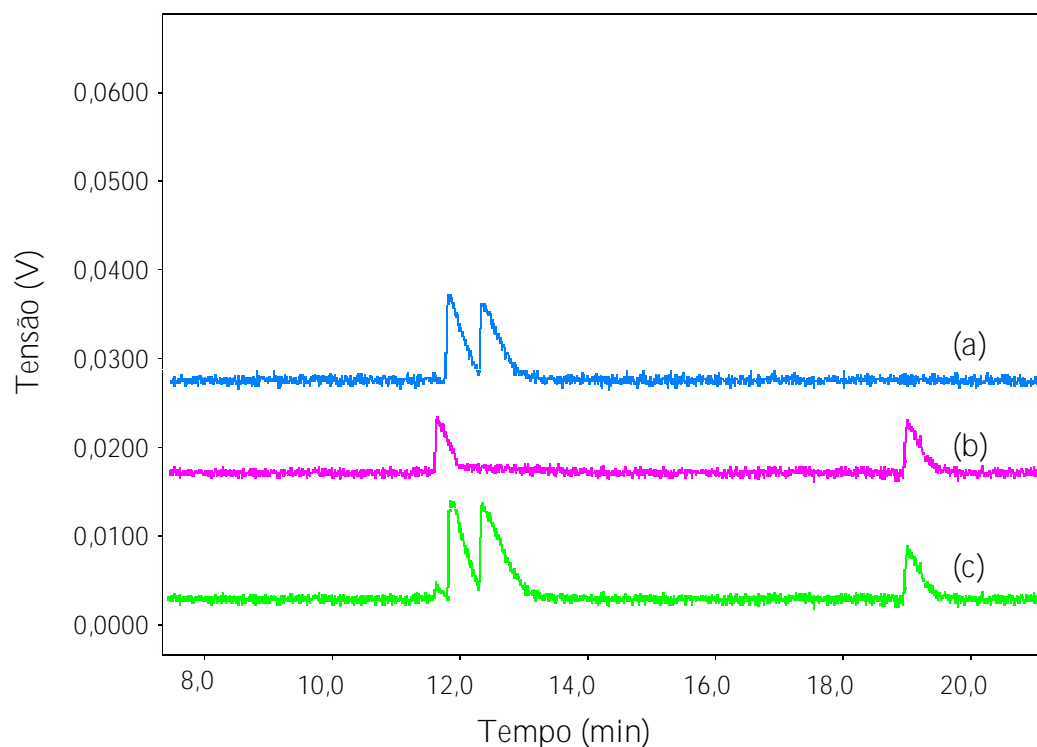


Figura 32. Cromatogramas de (a) (*R,S*)-2-hexanol; (b) acetato racêmico (preparado via química); (c) alíquota da reação de transesterificação do acetato de vinila com (*R,S*)-2-hexanol a 37°C, 24h catalisada pela LPS/GAL. Condições experimentais: Inj.= 250°C, Det. 280°C, $T_i = 40^\circ\text{C}$, $T_f = 58^\circ\text{C}$ (3 min), $\Delta_{\text{aq}} = 0,5^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_f = 150^\circ\text{C}$ (5 min), $\Delta_{\text{aq}} = 3^\circ\text{C}/\text{min}$. $P_{\text{H}_2} = 75 \text{ Kpa}$.

Os resultados da reação de transesterificação do acetato de vinila com (*R,S*)-2-hexanol, utilizando a LPS livre e imobilizada em CMC/PVA, GAL/XAN e GAL com os valores de excessos enantiomérico do substrato (ees), excessos enantiomérico do produto (eep), percentagem de conversão (%C) e razão enantiomérica (E), são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Resolução biocatalítica do (*R,S*) – 2-hexanol com acetato de vinila calisada pela lipase de *Pseudomonas* sp imobilizada em diferentes sistemas.

Sistemas ^a	C (%) ^b	eep ^c	ees ^c	E
LPS/Livre	35	95	52	65
LPS/CMC/PVA	5	86	8	13
LPS/GAL/XAN	41	87	61	26
LPS/GAL	29	90	36	27

(a) 37°C, n-hexano, 24h, [enzima]=100 mg

(b) calculado de acordo com a Equação 1 (pág.41)

(c) calculados de acordo com as Equações 2 e 3 (pág. 41)

Os dados obtidos mostram que a enantiosseletividade (expressa por valores de E) foi sempre maior usando a LPS livre (E=65), quando comparada com a enzima imobilizada nos diversos suportes.(E = 13-27). Os valores de E entre 15 a 30 podem ser considerados de moderados a bom, e acima destes são excelentes para propósitos sintéticos assimétricos.³ Portanto, nos experimentos citados acima, foi obtida uma enantiosseletividade moderada usando os sistemas LPS/GAL/XAN e LPS/GAL.

Através destes resultados, pode-se sugerir que estes sistemas podem ser utilizados como suportes de enzimas em reações de resoluções de misturas racêmicas. Estudos envolvendo a variação do tempo reacional, solvente e suportes podem ser sugeridos para melhorar e aumentar a enantioseletividade da LPS em materiais poliméricos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram obter-se as seguintes conclusões:

F A preparação dos filmes mostrou-se como um método simples e eficaz, e apresentando ótima estabilidade frente a diferentes solventes e variação de temperatura;

F As micrografias dos preparos enzimáticos contendo lipase de *R. oryzae* e *M. javanicus* imobilizadas nos suportes CMC, GAL, PVA e PSS mostraram uma completa homogeneidade superficial. Os preparados enzimáticos contendo as lipases estão localizadas preferencialmente na superfície dos suportes, e sugere-se que o processo imobilização ocorreu por adsorção;

F Os resultados obtidos de análise térmica (TGA) para os sistemas LRO/CMC, LRO/PVA, LRO/CMC/PVA e LRO/PSS/PEO(80:20) indicaram que a presença da enzima provocou uma pequena desestabilização nos polímeros e blendas;

F Através das medidas de absorvância para os sistemas LRO/CMC, LRO/PVA, LMJ/CMC e LMJ/PVA não foi verificada a presença de proteína no solvente (n-hexano), após 66h de contato entre filme/solvente. Isto evidenciou que a enzima adsorvida não sofreu dessorção;

F O teor de água presente nos sistemas CMC, CMC/PVA, GAL, XAN, GAL/XAN, PSS e P(VP-co-AV) com as lipases de *R. oryzae* e *M. javanicus* imobilizadas variou de 4-18%, dependendo da estrutura do polímero e/ou blenda. Com esta quantidade pode-se garantir que a camada essencial de água em torno dos biocatalisadores é preservada;

F Não foi possível obter o laurato de n-pentila com lipases de diferentes fontes imobilizadas em filmes de poli (ácido acrílico) (PAA), possivelmente devido às interações suporte/enzima ou à desnaturação dos bicatalisadores devido ao pH da solução polimérica;

F Em um período de 24h foi possível obter o laurato de n-pentila com altas porcentagens de conversão, 99 e 76%, utilizando a LRO e LMJ imobilizadas em CMC. O sistema LRO/CMC mostrou eficiência 20 vezes superior a forma não imobilizada;

F Uma massa de 50 mg de LRO imobilizada em CMC foi suficiente para obter o produto com conversão quantitativa (99%);

F O estudo da variação da temperatura (25-37°C) para as lipases de diferentes fontes imobilizadas em CMC, indicou a dependência deste parâmetro na porcentagem de conversão em laurato de n-pentila. As melhores conversões foram obtidas com LRO e LMJ nas duas temperaturas;

F A imobilização da LRO em CMC, PVA e CMC/PVA levou a um aumento na estabilidade da enzima;

F No estudo da variação da concentração dos substratos, verificou-se um decréscimo da porcentagem de conversão para razões molares superiores a 0,10M . Provavelmente, isto é atribuído a formação de um complexo inativo entre a enzima e o n-pentanol, pois com um excesso de ácido láurico nenhum efeito inibitório foi verificado;

F A reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol mostrou-se dependente do solvente orgânico externo. As maiores porcentagens de conversão em éster foram obtidas utilizando-se solventes com $\log P \geq 2,5$ tais como tolueno, tetracloreto de carbono, ciclohexano, n-hexano e n-heptano com os suportes LRO/PVA, LRO/CMC, LRO/PSS:PEO (80:20) e LMJ/CMC;

F A LRO imobilizada em CMC, PVA, GAL, XAN, CMC/PVA, GAL/XAN e PSS/PEO(80:20) pode ser reutilizada, obtendo-se altas porcentagens de conversão em éster, mesmo após oitenta dias de armazenagem no solvente e com dez ciclos experimentais;

F O efeito do doador acila em reações de esterificação foi dependente do tamanho da cadeia e da posição da insaturação na cadeia alquílica com os sistemas LRO/CMC e LMJ/CMC. A LRO apresentou maior afinidade com ácidos com cadeias saturadas entre C10-C18 (97-99%), enquanto que a LMJ com os ácidos de cadeias entre C6-C18 (60-99%);

F Foi verificado o efeito do tamanho da cadeia do álcool com os suportes LRO/CMC e LMJ/PVA. A LRO foi mais acessível para álcoois de cadeia entre C2-C6 e a LMJ com cadeias entre C2 e C5 obtendo conversões superiores a 90%. Não ocorreu formação de produtos para os álcoois com ramificações próximas à hidroxila para as duas lipases testadas;

F Através dos resultados obtidos pode-se sugerir que vários dos sistemas estudados neste trabalho podem ser utilizados como suportes de enzimas para efetuar reações em solventes orgânicos.

7.PERSPECTIVAS

- Determinar a atividade relativa para todas as lipases imobilizadas em todos os suportes estudados neste trabalho com a variação de temperatura;
- Promover um estudo da influência da atividade da água (a_w) nos sistemas e em reações tais como esterificação, amidação e transesterificações etc;
- Realizar estudos de análises térmicas para os sistemas não estudados neste trabalho;
- Testar os suportes com enzimas imobilizadas em resolução de compostos racêmicos.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, cp. 4, p. 77-121, 2000.
2. NELSON, D. L.; COX, M.M. Lehninger - Principles of Biochemistry. 3. ed. , 2000,332p.
3. FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. Berlin: Springer-Verlag, 1997, cap. 1, p. 1- 26.
4. <http://www.rcsb.org/pdb>. Acessada em 10/08/2002.
5. MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M. D. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. Enzyme Microb. Technol., v. 15, p. 239-247, 1993.
6. ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. Science, v. 224, p. 1249-1251, 1984.
7. ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalysed processes in organic solvents. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 82, p. 3192-3196, 1985.
8. ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. J. Biol. Chem., v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.
9. ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymic catalysis in non-aqueous solvents. J. Biol. Chem., v. 263, p. 3194-3201, 1988.
10. KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature, v. 409, n. 11, p. 241-246, 2001.
11. VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. et al. Customizing lipase for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. J. Mol. Catal. B: Enzym., v. 9, n.4, p. 113-148, 2000.
12. SCHIMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. Angew.Chem. Int. Ed., v. 37, p. 1608-1633, 1998.
13. BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipase: state of the art. Enzyme Microb. Technol., v. 18, p. 392-416, 1996.
14. LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em Química Analítica. Quim. Nova, v. 22, n. 2, 229-245, 1999.

15. JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 53, p. 315-351, 1999.
16. ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO; GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding in esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnol. Lett.*, v. 21, p.313-319, 1999.
17. SARDA, L. E.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 30, p. 513-521, 1958.
18. CASTRO, H. F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Quím. Nova*, v. 18, n. 5, n.6, p. 544-554, 1995.
19. DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; WEI, Y. et al. Conformational lability of lipase observed in the absence of an oil-water interface: Crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J. Lipid. Res.*, v. 35, p. 524-533, 1994.
20. SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S. et al. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, v. 351, p. 761-764, 1991.
21. SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. 1.8 Å Refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.*, v. 230, p. 575-591, 1993.
22. BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S. et al. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature*, v. 343, p. 767-770, 1990.
23. DEREWENDA, Z. S.; DEREWENDA, U.; DODSON, G.G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucos miehei* triglyceride lipase at 1.0 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, v. 227, p.818-839, 1993.
24. CLEASBY, A.; GARMAN, E.; EGMOND, M. R. et al. Crystalization and preliminary X-ray study of a lipase from *Pseudomonas glumae*. *J. Mol. Biol.*, v. 224, p. 281-282, 1992.
25. GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J.D. et al. Insights into interfacial activation from an open struture of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p.12843-12847, 1993.

26. GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D. et al. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.*, v. 3, p.82-91, 1994.
27. UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S. et al. The sequence crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase from *Candida antactica*. *Structure*, v. 2, p.293-308, 1994.
28. LANG, D.; HOFMANN, B.; HAALCK, L. et al. Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, v. 259, p. 704-717, 1996.
29. BOURNE, Y.; MARTINEZ, C.; KERFELEC, B. et al. Horse pancreatic lipase. The crystal structure refined at 2.3 Å resolution. *Nature*, v. 238, p. 709-732, 1994.
30. WINKLER, F. K.; GUBERNATOR, K. Structure and mechanism of human pancreatic lipase. In: *Lipases, Their Structure, Biochemistry and Application*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 139-157, 1994.
31. WANG, X.; WANG, C. S.; TANG, J. et al. The crystal structure of bovine bile salt activated lipase: Insights into the salt activation mechanism. *Structure*, v. 5, p. 1209-1218, 1997.
32. FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purification and properties of lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 75, n. 7, p. 569-576, 2000.
33. MAYORDOMO, I.; RANDEZ, G. F.; PRIETO, J. A. Isolation, purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 1, p. 105-109, 2000.
34. UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T. et al. Crystalization an preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida Antarctica*. *J. Mol. Biol.*, v. 235, p. 790-792, 1994.
35. JAERGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, v. 16, p. 396-403, 1998.
36. CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol.*, v. 284, parte A, p. 3-27, 1997.
37. CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Bioch. Biophysica Acta.*, v. 1441, p. 205-214, 1999.

38. PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 29, p. 119-131, 1999.
39. GANDHI, N. N. Applications of lipase. *J. Am. Org. Chem. Soc.*, v. 74, n.6, p. 621-634, 1997.
40. CHIOU, S-H.; WU, W-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, v. 25, p. 197-204, 2004.
41. SOARES, C. M.; HEIZIR, F. C.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled silica. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v. 77-79, p. 745-757, 1999.
42. BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials*. v. 23, p. 3627-3636, 2002.
43. GANDHI, N. N. Applications of lipase. *J Am. Oil. Chem. Soc.*, v.74, 621-634, 1997.
44. <http://www.cape.canterbury.ac.nz/Archive/IMMOB/immob.htm>, acessada em 17/08/2003.
45. ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media. *J. Biotechnol.*, v. 66, p. 61-67, 1998.
46. LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification. *Bitechnol. Advances*, v. 15, n.1, p.1-15, 1997.
47. BASHEER, S.; MOGI, K.; NAKAJIMA, M. Surfactant-modified lipase for the catalysis of the interesterification of triglycerides and fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 45, p. 187-195, 1995.
48. CARTA, G.; GAINER, J. L.; BENTON, A. H. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 37, p. 1004-1009, 1991.
49. TRIANTAFYLLOU, A. O.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. et al. Effects of sorbitol addition on the action of free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 45, p. 406-414, 1995.
50. HALLING, P. J. Organic liquids and biocatalysis: Theory and practice. *TIBTECH*. v. 7, p. 50-51, 1989.

51. DUDAL, Y.; LORTIE, R. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 45, p. 129-134, 1995.
52. KONTOGIANNI, A.; SKOURIDOU, V.; SERETI, V.; STAMATIS, H.; KOLISIS, F. N. Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 21, p. 59-62, 2003.
53. CHOWDARY, G. V.; PRAPULLA, S. G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochem.*, v. 38, p. 393-397, 2002.
54. REJASSE, B.; MOUGARD, T.; LEGOY, D. M. Enzymatic procedures for the synthesis of water-soluble retinol derivatives in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* v. 32, p. 312-320, 2003.
55. SIVALINGAM, G.; CHATTOPADHYAY, S.; MADRAS, G. Solvent effects on the lipase catalyzed biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) in solution. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 79, p. 413-418, 2003.
56. YADAV, G. D.; LATTHI, P. S. Kinetics and mechanisms of synthesis of butyl isobutyrate over immobilized lipases. *Biochem. Eng. J.*, v. 3724, p. 1-8, 2003.
57. VIRTO, C.; SVENSSON, I.; ADLERCREUTZ, P. Enzymatic synthesis of lysophosphatic acid and phosphatidic acid. *Enzyme Microb. Technol.* v. 24, p. 651-658, 1999.
58. GULATI, R.; ARYA, P.; MALHOTRA, B.; PRASAD, A. K.; SAXENA, R. K.; KUMAR, J.; WATTERSON, A. C.; PARMAR, V. S. Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acid: synthesis of sorbitol 1(16)-monostearate. *ARKIVOC*, v.iii, p. 159-170, 2003.
59. AFFLECK, R.; HAYNES, C. A.; CLARK, D. S. Solvent dielectric effects on protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 89, p. 5167-5170, 1992.
60. AFFLECK, R.; XU, Z. F.; SUZAWA, V. et al. Enzymatic catalysis and dynamics in low water environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 89, p. 1100-1104, 1992.
61. GUPTA, M. N. Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Bio. Chem.*, v. 203, p. 25-32, 1992.

62. AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solvente orgânico. *Boletim de Biotecnologia*, v. 72, p.2-12, 2002.
63. LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 30, p. 81-87, 1987.
64. VALIVETY, R. H.; JOHNSTON, G. A.; SUCKLING, C. J. et al. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: equilibrium position and rates of lipases catalyzed esterification. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 38, p. 1137-1143, 1991.
65. BRINK, L. E. S.; TRAMPER, J. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 27, p. 1258-1269, 1985.
66. SCHNEIDER, L. V. A Three dimensional solubility parameter approach to nonaqueous enzymology. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 37, p. 627-638, 1991.
67. COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influencia do solvente. *Quim. Nova*, v. 22, p. 863-873, 1999.
68. OTTOSSON, J.; FRANSSON, L.; KING, J. W.; HULT, K. Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1594, p. 325-334, 2002.
69. HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N. N. Lipase catalysed transesterification of 2-o-benzylglycerol with vinyl acetate: solvent effect. *Chem. Eng. J.*, v.94, p. 1-10, 2003.
70. JESUS, P. C.; JOÃO, J. J.; SILVA, P. L. F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M. G. Organo-gel: Um novo sistema para imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica.. *Quim. Nova* . v. 20, p. 664 -672,1997.
71. GRAY, C. J.; NARANG, J. S.; BARKER, S. A. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* and its use in the synthesis of menthol esters by transesterification. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 12, p. 800-807, 1990.
72. MACRAE, A. R. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v. 60, p. 291-294, 1983.
73. VERMUE, M. H.; TRAMPER, J. Biocatalysis in non-conventional media: Médium engineering aspects. *Pure Appl. Chem.*, v. 203, p. 346-373, 1995.

74. RESLOW, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. On the importance of the support material for bioorganic synthesis: Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. *Eur. J. Biochem.*, v. 172, p. 573-578, 1988.
75. PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F., X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 27, p. 187-204, 2000.
76. KOGUSI, Y.; TAKAHASHI, K.; LOPEZ, C. Large scale immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I and application for sardine oil hydrolysis. *J. Am. Oil. Chem.*, v. 72, p. 1281- 1285, 1995.
77. WEHJTE, E.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Improved activity retention of enzymes deposited on solid supports. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 41, p. 171-175, 1992.
78. RUCKENSTEIN, E.; WANG, X. A novel support for the immobilization of lipase and the effects of the details its preparation on the hydrolysis of triacylglycerides. *Biotechnol. Tech.*, v. 7, p. 117- 120, 1993.
79. MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M. D. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 15, p. 239-247, 1993.
80. BASRI, M.; YUNUS, W. Md. Z. W.; YOONG, W.S. et al. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in synthesis of fatty esters. *J. Chem. Biotechnol.*, v. 66, p. 169-173, 1996.
81. BOSLEY, J.; PEILOW, A. D. Immobilization of lipase on porous polypropylene:Reduction in esterification efficiency at low loading. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v. 74, n. 2, p. 107-111, 1997.
82. NASCIMENTO, M. G.; LIMA, C.; SILVA, P. L. F. et al. The use of immobilized lipase on chrysotile for esterification reactions. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 28, n. 15, 1998.
83. MAUGARD, T.; LEGOY, M. D. Enzymatic synthesis of derivatives of vitamin A in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 8, p. 275-280, 2000.

84. SALUNKHE, M. M.; NAIR, R. Mild and efficient enzymatic oximolysis by supported *Pseudomonas cepacia* lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 10, p. 535-538, 2000.
85. SALUNKHE, M. M.; NAIR, R. Novel route for the resolution of both enantiomers of dropropizine by using oxime esters and supported lipase of *Pseudomonas cepacia*. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 28, p. 333-338, 2001.
86. ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 32, p. 589-595, 2003.
87. CRESPO, J. S., Imobilização de lipases em materiais poliméricos. Florianópolis, 1999. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
88. GRIFFITHS, M.; BOSLEY, J. A.; Assessment of macroporus polystyrene-based polymers for the immobilization of *Citrobacter freundii*. *Enzyme Microb. Technol.* v.15, p. 109-113, 1993.
89. RUCKA, M.; TURKIEWICZ, B.; ZUK, J. S.; Polymeric membranes for lipase immobilization. *J. Am. Oil Chem.*, v. 67, n. 12, p. 887-889, 1990.
90. MUZZARELLI, R. A. A; BARAONTINI, G.; ROCCHETTI, R. Immobilized enzyme on chitosan columns: α -chymotrypsin and acid phosphatase. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 18, p. 1445-1454, 1976.
91. GUO, Z; BAI, S.; SUN, Y. Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. *Enzyme. Microb. Technol.*, v. 32, p. 776-782, 2003.
92. MATSUSHIMA, A.; KODERA, Y.; HIROTO, M. et al. Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 2, p. 1-17, 1996.
93. PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNANDES-LORETE, G., et al. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v.21, p. 201-210, 2003.

94. KILINÇ, A.; ÖNAL, S.; TELEFONCU, A. Chemical attachment of porcine pancreatic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride. *Process Biochem.*, v. 38, p. 641-647, 2002.
95. TAN, T.; WANG, F.; ZHANG, H. Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. *J. Mol. Catal B: Enzym.*, v.18, p. 325-331, 2002.
96. ZACCHIGNA, M.; DI LUCA, G.; LASSIANI, L.; VARNAVAS, A.; BOCCÙ, E. Properties of methoxy(polyethylene glycol)-lipase from *Candida rugosa* in organic solvents. *IL FÁRMACO*, v. 53, p. 758-763, 1998.
97. AMORIM, R.V.S; MELO, E.S; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; LEDINGHAM, W.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. *Bioresour. Technol.*, v. 89, n. 1, p. 35-39, 2003.
98. ARICA, M. Y.; KAÇAR, Y.; ERGENE, A. et al. Reversible immobilization of lipase on phenylalanine containing hydrogel membranes. *Process Biochem.* v. 36, p. 847-854, 2001.
99. QUEIROZ, N.; NASCIMENTO, M. G. *Pseudomonas* sp lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate. *Tetrahedron Letters*, v. 42, p. 5225-5227, 2002.
100. REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipase by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 49, p.527-534, 1996.
101. JENTA, T. R. -J.; BATTIS, G.; REES G. D. et al. Biocatalysis using gelatin microemulsion-based organogels containing immobilized *Chromobacterium viscosum* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* v. 53, p. 121-131, 1997.
102. QUEIROZ, N.; NASCIMENTO, M. G. Organo-gel de heptano: Diagrama de fases e aplicações sintéticas. *Quim. Nova*, v. 22, p. 335-338, 1999.
103. REES, G. D.; NASCIMENTO, M. G.; TUAN, R.J; ROBINSON, B. H. Reversed enzymes synthesis in microemulsion-based organo-gels. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1073, p. 493-501, 1991.

104. JESUS, P. C.; REZENDE, M. C.; NASCIMENTO, M. G. Enzymatic resolution of alcohols via lipases immobilized in microemulsion-based gels. *Tetrahedron; Asymmetry*, v.6, p. 63-66, 1995.
105. ZHOU, G. W.; LI, G. Z.; XU, J.; SHENG, Q. Kinetic studies of lipase-catalyzed esterification in water-in-oil microemulsions and the catalytic behavior of immobilized lipase in MBGs. *Colloids Surf., A*, v. 194, p. 41-47, 2001.
106. STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Biocatalysis using microemulsion-based polymer containing lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 6, n. 4, p.399-406, 1999.
107. DALY, M. M.; KNORR, D. Chitosan-Alginate complex coacervate capsules: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability. *Biotechnol. Progress*, v. 4, p. 76-81, 1988.
108. HERTZBERG, S.; KVITTINGEN, L.; ANTHOSEN, T. et al. Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in two phases liquid system: application in lipase-catalyzed reaction. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 14, p. 42-45, 1992.
109. HEDSTRÖM, G.; BACKLUND, S.; ERIKSSON, F. Influence of diffusion on the kinetics of enzyme-catalyzed reaction in gelatin-based gels. *J. Colloid. Interface Sci.*, v. 239, p. 190-195, 2001.
110. MUZZARELLI, R. A. A.; BARAONTINI, G.; ROCCHETTI, R. Immobilized enzyme on chitosan columns: α -chymotrypsin and acid phosphatase. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 18, p. 1445-1454, 1976.
111. VECCHIA, R. D.; REBELO, A. M.; RODRIGUES, C. A. Reações de esterificação catalisada pela Palatase M encapsulada em gel de quitosana. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 21.,1998, Poços de Caldas. Livro de Resumos, QO-117.
112. EL RASSY, H.; PERRARD, A.; PIERRE, A., C. Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: Bi-Bi Ping-Pong kinetics. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* v. 30, p. 137-150, 2004.
113. KARLSSON, S.; BACKLUND, S.; ERIKSSON, F. et al. Enzymatic esterifications and transesterifications in AOT-based gels with different composition. *Colloids Surf. ,B*, v. 10, p. 137-147, 1998.

114. LEE, K. K. B.; POPPENBORG, L; H., STUCKEY, D. C. Terpene ester production in a solvent phase using a reverse micelle-encapsulated lipase. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 23, p. 253-260, 1998.
115. MATSUMOTO, M.; SUMI, N.; OHMORI, K. et al. Immobilization of lipase in microcapsules prepared by organic and inorganic materials. *Proc. Biochem.*, v. 33, n. 5, p. 535-540, 1998.
116. CUI, Y. -M.; WEI, D. -Z.; YU, J. -T. Lipase-catalyzed esterification in organic solvent to resolve racemic naproxen. *Biotch. Letters*, v. 19, n. 9, p. 865-868, 1997.
117. www.qmcweb.ufsc.br. Prêmio Nobel de Química 2001. Acessada em 10/01/2004.
118. MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILLA, R. R.; RAMACHNDRAN, V. N., et al. Resolution of (R,S)-proglumide using lipase from *Candida cylindraceae*. *Bioorganic Med. Chem.*, v. 10, p. 1471-1475, 2002.
119. STRAATHOF, A. J. J.; JONGEJAN, J. A. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 21, p.559-571, 1997.
120. SOLOMONS, T. W. G. *Organic Chemistry*, 5 ed. New York:John Wiley & Sons, 1992.
121. A guide to using cyclodextrin bonded phases for chiral separations by capillary gas chromatography. *Chiraldex Handbook*. Advanced Separation Technologies Inc. 5th Ed., USA, 1996-1997.
122. MACHIDA, Y.; NISHI, H.; NAKAMURA, K.; NAKAI, H.; SATO, T. Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. *J. Chromatogr., A*. v. 805, p.85-92, 1998.
123. AITKEN, R.A., KILÉNYI, S. N., *Asymmetric synthesis*, 1 ed. Ed. L.C. Hall. , p. 233. 1992.
124. <http://www.sigma.sial.com>; Ficha técnica da lipase da *Candida cylindracea* e lipase Pancreática de Porco. Acessado em 07/03/2003.
125. Ficha Técnica da *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus oryzae* e *Mucor miehei*, fornecida pela Novozyme.
126. Ficha Técnica da *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* e *Pseudomonas* sp, fornecida pelo Amano S/A.

127. MOJOVIC, L.; KNEZEVIC, Z.; POPADIC, R.; JOVANOVIC, S. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support. Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 50, p.676-681, 1998.
128. HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. Thermal Analysis: Fundamentals and applications to polymer Science. John Wiley & Sons Ltd., 1994.
129. KLIBANOV, A. M. Enzymes that work in organic solvents. CHEMTEC, p. 354-359, 1986.
130. KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic reactions in organic media. Blackie Academic & Professional, 1996, 314p.
131. CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Quim. Nova. v.27, p. 146-156, 2004.
132. KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. TIBS, 1989.
133. KRISHNA, H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. J. Biotechnol. v. 87, p. 193-201, 2001.
134. GONZÁLEZ-NAVARRO, H.; BRACO, L. Lipase-enhanced activity in flavour ester reactions by trapping enzyme conformers in the presence of interfaces. Biotechnol. Bioeng. v. 59, p. 122-127, 1998.
135. PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.de.; MORAES, F. F. de; ZANIN, G. M. Esterification activity and stability of *Candida rugosa* lipase immobilized into chitosan. Appl. Biochem. Biotechnol. v. 98-100, p. 977-986, 2002.
136. SHINTRE, M. S.; GHADGE, R.S.; SAWANT, S.B. Lipolase catalyzed synthesis of benzyl esters of fatty acids. Biochem. Engineering. v. 3620, p. 1-11, 2002.
137. PETER, F.; PREDA, G. Characterisation of pancreatic lipase substrate specificity in organic reaction media by a kinetic method. J. Mol. Catal. B: Enzym.. v. 19, p. 467-472, 2002.
138. DALLA-VECCHIA, R. Síntese de ésteres alifáticos catalisada pela CV lipase imobilizada em microemulsão água-óleo em sistema de organo-gel. Florianópolis, 1994. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

139. LAI, D. T.; O'CONNOR, C. J.; Studies on synthesis of short chain alkyl esters catalyzed by goat pregastric lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* V. 6, p.411-420, 1999.
140. LANGRAND, G.; RONDOT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Short chain flavor esters synthesis by microbial lipases. *Biotechnol. Lett.* V. 12, p.581-586, 1990.
141. QUEIROZ, N. Síntese enantiosseletiva de amidas e ésteres catalisada por lipases. Tese (Doutorado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
142. BIANCHI, D.; BOSETTI, A.; CESTI, P.; GOLINI, P. Enzymatic resolution of 1,2-diols: preparation of optically pure dropropizine. *Tetrahedron Lett.* v. 33, p. 3231-3234, 1992.
143. KLIBANOV, A. M.; CAMBOU, B. Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media. *J. Am. Chem. Soc.* v. 106, p. 2687-2692, 1984.