

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA EM QUITOSANA:
CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL DE APLICAÇÃO
EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE E SÍNTESE**

Ernandes Benedito Pereira
Engenheiro Industrial Químico, FAENQUIL, 1995
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gisella Maria Zanin (DEQ/UEM)
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Heizir Ferreira de Castro (FAENQUIL)

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área de Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil
Novembro de 1999

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Ernandes Benedito Pereira perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 29 de novembro de 1999.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Gisella Maria Zanin, Dr. Eng.

Orientadora


Prof.^a Maria Helena Andrade Santana, Dr. Eng.

Membro


Prof. Flávio Faria de Moraes, Ph.D.
Membro

PEREIRA, ERNANDES BENEDITO

Lipase Livre e Imobilizada em Quitosana: Caracterização e Potencial de Aplicação em Reações de Hidrólise e Síntese [Paraná] 1999

XX, 127 p. 29,7 cm (PEQ/UEM, M.Sc., Engenharia Química, 1999)

Dissertação – Universidade Estadual de Maringá-PEQ

1. Enzima Lipase
 2. Quitosana
- I. PEQ/UEM II. Título (série)

À Memória do meu pai
À minha mãe e minha irmã com carinho e gratidão
À Prof^a Heizir pela oportunidade e segunda chance

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais profunda amizade e gratidão:

À minha mãe Adelaide e minha irmã Solange, pelo amor, simpatia, paciência, estímulo e colaboração recebida em todos os momentos.

Às minhas orientadoras Profa. Gisella Maria Zanin e Profa. Heizir Ferreira de Castro pelo incentivo, apoio e orientação competente antes e durante a execução deste trabalho.

À Profa Célia Regina Granhen Tavares, Coordenadora do Curso de Pós Graduação, pela atenção e presteza na resolução dos problemas surgidos durante a execução deste trabalho.

Aos professores do DEQ/ UEM, pelos ensinamentos que contribuíram na minha formação profissional.

Aos Secretários Marilza e Edival, pela presteza, atenção e amizade.

À M.Sc. Luiza e ao Eng. Lauro, pela amizade e apoio técnico no laboratório durante a execução deste trabalho.

Ao amigo e Eng. Rosemar de Lima, pela colaboração técnica prestada nos ensaios realizados no DEQUI/ FAENQUIL.

À Rosa Maria Ribeiro, pela amizade sincera, paciência, companheirismo e pelos longos papos, tenho certeza, muito me ajudaram nesse período a atingir esta etapa importante da minha vida.

Às minhas amigas Magda e Diovana, obrigado por tudo e pela amizade sincera. Vocês também fazem parte desta etapa.

Ao Fábio, meu companheiro de madrugadas de laboratório, pela amizade e agradável convivência.

Aos amigos Roni, Ana Luisa, Marcos e Larissa, pela simpatia e colaboração.

Ao Prof. André Ferraz (FAENQUIL), que de uma forma indireta incentivou no alcance do objetivo desse trabalho.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5. CONCLUSÕES	95
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
APÊNDICES	113

**LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA EM QUITOSANA:
CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM REAÇÕES
DE HIDRÓLISE E SÍNTESE**

AUTOR: ERNANDES BENEDITO PEREIRA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. GISELLA MARIA ZANIN

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. HEIZIR FERREIRA DE CASTRO

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química;
Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 –
Maringá – PR, Brasil, defendida em 29 de novembro de 1999. 127 p.

RESUMO

Objetivou-se, neste trabalho, a produção de amostras de lipase imobilizada em quitosana (suporte de baixo custo), visando aplicação em reações de hidrólise e síntese. A lipase imobilizada foi obtida por adsorção física ou ligação covalente usando hexano como meio de dispersão. Dois tipos de quitosana (grau analítico e farmacêutico) foram usados para imobilizar a lipase de fonte microbiana (*Candida rugosa*) e de células animais (pâncreas de porco). Os melhores resultados com relação à retenção de proteína (80%) e eficiência de imobilização (15%) foram obtidos para a lipase microbiana imobilizada em quitosana de grau farmacêutico. Este par foi selecionado para estudos de imobilização adicionais, incluindo a caracterização do derivado imobilizado em meio aquoso e não-aquoso.

Em meio aquoso, um estudo comparativo entre lipase livre e imobilizada foi efetuado em termos de pH, temperatura, estabilidade térmica e estabilidade operacional. Mediante o procedimento de imobilização, ocorreram modificações para pH mais ácido (6,0) e para maior valor de temperatura ótima (45°C) quando comparado com os valores originais da lipase na sua forma livre (pH ótimo 7,0 e temperatura de 37°C). Os perfis das curvas de estabilidade térmica sugerem que o procedimento de imobilização tende a

augmentar a estabilidade térmica da enzima lipase. O tempo de meia-vida da lipase livre a 55°C foi da ordem de 0,41 h ($K_d = 1,7 \text{ h}^{-1}$), enquanto para a lipase imobilizada foi encontrado um valor 0,86 h ($k_d = 0,81 \text{ h}^{-1}$). A estabilidade operacional da lipase imobilizada em meio não-aquoso, verificada em bateladas cíclicas de hidrólise do azeite de oliva (37°C/ 10 minutos), revelou um tempo de meia-vida de 5 horas a 37°C.

Na caracterização em meio orgânico, a potencialidade da lipase imobilizada foi inicialmente verificada pela quantificação do seu desempenho na esterificação direta de diversos álcoois alifáticos e ácidos graxos, sendo selecionado para um estudo mais detalhado o sistema butanol (ButOH)/ ácido butírico (Abut), empregando a metodologia de planejamento estatístico. Um planejamento fatorial completo 2^3 em dois níveis foi usado para determinar a influência dos fatores: temperatura (37 e 50°C), massa de lipase (0,25 e 0,5 gramas) e razão molar entre Abut: ButOH (1 e 2) na variável resposta (rendimento de éster). Para cálculo do erro experimental, foram realizados três experimentos no nível médio. Os resultados foram analisados pela técnica da Análise de Variância (ANOVA), sendo verificado como fator mais significativo na formação de butirato de butila a massa de enzima. Dentro da região experimental avaliada, não houve evidência de interação da massa de lipase com os outros dois fatores.

A lipase imobilizada foi usada sucessivamente (24 h/ 37°C) em reações de esterificação do butanol com ácido butírico e ao final do sétimo reciclo foi constatada uma redução significativa no rendimento do éster (83%) apesar de uma perda da atividade hidrolítica de apenas 28%. Isto sugere que não ocorre desligamento da enzima do suporte mas uma alteração das condições de hidratação da preparação imobilizada, afetando diretamente a atividade sintética no novo ciclo. Nesse sentido, técnicas que permitam a remoção de reagentes não consumidos e produto formado da fase sólida da enzima podem melhorar a estabilidade operacional da lipase imobilizada.

Por meio da técnica adotada foi constatado que, além da simplicidade do próprio método, a conformação da enzima e do seu sítio ativo foram preservados por não haver o envolvimento de nenhuma espécie reativa, o que propiciou a obtenção de um sistema imobilizado com atividade média de 50 U/mg de suporte seco, cujas propriedades catalíticas foram consideradas adequadas tanto para conduzir reações de hidrólise (hidrólise de azeite de oliva) como de esterificação (síntese do butirato de butila ou ésteres similares).

**FREE AND IMMOBILIZED LIPASE ON CHITOSAN:
CHARACTERIZATION AND POTENTIAL APPLICATION ON
HYDROLYSIS AND SYNTHESIS REACTIONS**

AUTHOR: ERNANDES BENEDITO PEREIRA

SUPERVISORS: PROF^a. DR^a. GISELLA MARIA ZANIN

PROF^a. DR^a. HEIZIR FERREIRA DE CASTRO

Master Thesis; Chemical Engineering Graduated Program; State University of Maringá;
Av. Colombo, 5790, BL E46-09; ZIP CODE: 87020-900- Maringá-PR, Brazil, presented
on 29th November, 1999. 127 p.

ABSTRACT

The objective of this work was the production of immobilized lipase derivatives on chitosan (cheap support), aiming their application on hydrolytic and synthetic reactions. The derivatives were obtained by physical adsorption and covalent binding using hexane as dispersion medium. Two types of chitosan (analytical and pharmaceutical grade) were used for immobilizing lipase from microbial source (*Candida rugosa*) and animal cell (porcine pancreas). The best results with respect to the recovery of total activity after immobilization (protein retention of 80% and immobilization efficiency of 15%) were obtained for microbial lipase and pharmaceutical grade chitosan. This set was selected for further immobilization studies, including fully characterization of the immobilized derivative under aqueous and non-aqueous media.

Under aqueous medium, a comparative study between free and immobilized lipase was provided in terms of pH, temperature, thermal stability and operational stability. Slightly lower value for optimum pH (6.0) was found for the immobilized form in comparison with that attained for the free lipase (7.0). The optimal reaction temperature

shifted from 37°C for the free lipase to 50°C for the chitosan lipase. The patterns of heat stability indicated that the immobilization process tends to stabilize the enzyme. The half-life of the free lipase at 55°C was equal to 0.41 h ($K_d = 1.7 \text{ h}^{-1}$), whereas for the immobilized lipase was found to be 0.86 h ($k_d = 0.81 \text{ h}^{-1}$). The operation stability of the immobilized lipase was tested by repeated assays (olive oil hydrolysis for 10 min/ 37°C) and a half-life of 5 hours was observed.

Under organic medium, the potential application of the immobilized derivative was verified by testing its performance on the esterification reaction using several aliphatic alcohols and fatty acids. The system butanol (ButOH)/ butyric acid (Abut) was selected for a detailed study employing statistical experimental design. A full 2^3 factorial design at two levels was used to determine the influence of three factors: temperature (37 and 50°C), amount of lipase (0.25 and 0.5g) and molar ratio between Abut: ButOH (1 and 2) on the variable response (yield of ester). Three runs were carried out at the center point level for experiment error estimation. The results were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) and the most significant main effect on the formation of butyl butyrate was the initial lipase amount. For the experiment range studied, there was no evidence on the interaction of the lipase amount with the other two factors.

The immobilized lipase was used repeatedly (seven times) in batch esterification reactions of butanol with butyric acid and the activity loss in long-term was about 28%, however there was a significant decrease on the esterification yields (83%). This suggested that no desorption of the enzyme from the support occurred. It is therefore likely that reactants and product bind to the solid enzyme phase resulting in drastic changes in the enzyme synthetic activity for the next cycle. In this sense, techniques allowing the removal of these potential inhibitors from the enzyme solid phase, are expected to improve the operational stability of this immobilized derivative.

By using the immobilization procedure, it was verified that besides the simplicity of the technique, the enzyme conformation and its active site were preserved since no chemical species were involved, this provide an immobilized system with an average activity of 50 U/mg dry support , and suitable catalytic properties to conduct either hydrolysis (hydrolysis of olive oil) or esterification reactions (butyl butyrate synthesis or similar esters).

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. ENZIMAS COMO CATALISADORES	3
2.2. ENZIMAS EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS	6
2.3. LIPASES.....	8
2.3.1. <i>Características e Propriedades</i>	8
2.3.2. <i>Estrutura e Mecanismo de Atuação</i>	9
2.3.3. <i>Reações Catalisadas pelas Lipases</i>	12
2.3.4. <i>Especificidade</i>	12
2.3.5. <i>Fatores que Interferem nas Biotransformações com Lipases</i>	13
2.4. ENZIMAS IMOBILIZADAS.....	18
2.4.1. <i>Métodos de Imobilização</i>	20
2.4.1.1. <i>Ligação Cruzada na Ausência de Suportes (Crosslinking)</i>	21
2.4.1.2. <i>Métodos de Ligação em Suportes</i>	23
2.4.1.2.1. <i>Adsorção Física</i>	23
2.4.1.2.2. <i>Ligação Iônica</i>	24
2.4.1.2.3. <i>Ligação Covalente</i>	25
2.4.1.2.4. <i>Encapsulamento</i>	26
2.4.1.2.5. <i>Combinação de Métodos</i>	28
2.4.2. <i>Fatores que Interferem na Imobilização da Enzima</i>	29
2.4.2.1. <i>Mudanças Conformacionais e Efeitos Estéricos</i>	30
2.4.2.2. <i>Efeitos de Partição e Resistências Difusionais</i>	30
2.4.3. <i>Morfologia e Configuração do Suporte</i>	32
2.5. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES	35
2.6. APLICAÇÕES POTENCIAIS DE LIPASES	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1. MATERIAIS	47
3.1.1. <i>Enzimas</i>	47
3.1.2. <i>Suportes</i>	47
3.1.3. <i>Reagentes</i>	47
3.2. EQUIPAMENTOS	48

3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	48
3.3.1. Seleção do Tipo de Quitosana e da Fonte de Lipase	48
3.3.2. Imobilização de Lipase Microbiana em Quitosana por Ligação Covalente.....	50
3.3.3. Determinação da Relação Ótima entre Massa de Lipase Microbiana e Quitosana de Grau Farmacêutico	50
3.4. ANÁLISES.....	50
3.4.1. Determinação do Teor de Proteína.....	50
3.4.2. Determinação da Atividade Hidrolítica	51
3.4.3. Determinação da Atividade de Esterificação	52
3.4.4. Teor de Ácido Graxo	52
3.4.5. Teor de Água.....	52
3.4.6. Teor de Álcool e Éster.....	53
3.5. AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO	53
3.5.1. Massa Seca	53
3.5.2. Recuperação de Proteína (RP %)	53
3.5.3. Rendimento de Imobilização (RI%)	54
3.6. PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA	54
3.6.1. Influência do pH.....	54
3.6.2. Influência da Temperatura	54
3.6.3. Estabilidade Térmica	54
3.6.4. Influência do Tempo de Estocagem na Atividade da Enzima Imobilizada	55
3.7. DESEMPENHO DA LIPASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA NA SÍNTESE DE ÉSTERES.....	55
3.7.1. Influência do Tamanho da Cadeia do Ácido Graxo e do Álcool.....	56
3.7.2. Síntese do Butirato de Butila.....	56
3.7.3. Estabilidade Operacional.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. SELEÇÃO DO TIPO DE QUITOSANA E DA FONTE DE LIPASE	59
4.2. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO EM QUITOSANA POR ADSORÇÃO E LIGAÇÃO COVALENTE.....	61
4.3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SATURAÇÃO DO SUPORTE	62
4.4. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA	64
4.5. CARACTERIZAÇÃO EM MEIO AQUOSO: PROPRIEDADES HIDROLÍTICAS DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA.....	66
4.5.1. Influência do pH.....	66
4.5.2. Influência da Temperatura	69
4.5.3. Estabilidade Térmica	73
4.5.4. Influência da Concentração do Substrato	78

4.5.5. Estabilidade de Estocagem.....	81
4.5.6. Estabilidade Operacional.....	82
4.6. CARACTERIZAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO: APLICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA NA SÍNTESE DE ÉSTERES AROMATIZANTES	84
4.6.1. Seleção do Sistema Reacional.....	84
4.6.2. Síntese do Butirato de Butila.....	87
4.6.3. Estabilidade Operacional.....	90
4.6.4. Comparação do Desempenho da Lipase Livre e Imobilizada na Síntese do Butirato de Butila.....	93
5. CONCLUSÕES	95
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. APÊNDICES	113
8.1. APÊNDICE 1	113
8.2. APÊNDICE 2	114
8.3. APÊNDICE 3	116
8.4. APÊNDICE 4	118
8.5. APÊNDICE 5	120
8.6. APÊNDICE 6	121
8.7. APÊNDICE 7	122
8.8. APÊNDICE 8	123
8.9. APÊNDICE 9	124
8.10. APÊNDICE 10.....	125
8.11. APÊNDICE 11	126
8.12. APÊNDICE 12.....	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Mecanismo chave fechadura (FABER, 1997)	4
Figura 2.2. Mecanismo do encaixe induzido (FABER, 1997)	4
Figura 2.3. A ação catalítica de lipases. Um triglicerídeo pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos, ou a reação reversa (síntese) glicerol e ácidos graxos podem reagir para formar o triglicerídeo.....	8
Figura 2.4. Estrutura da molécula de lipase na conformação inativa com a tampa fechada cobrindo o sítio ativo (esquerdo) e na configuração ativa com a tampa aberta (direita). SVANEBORG, C. Enzyme Division, Novo Nordisk A/S (Home page: http/ www/ fys.risoe.dk./ public/ lipase).....	11
Figura 2.5. Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (BALCÃO <i>et al.</i> , 1996).....	12
Figura 2.6. Classificação dos métodos para imobilização de enzimas	21
Figura 2.7. Representação esquemática da ligação de uma enzima (B) a um suporte por adsorção.....	24
Figura 2.8. Representação esquemática da ligação iônica de uma enzima (B) a um suporte polianiónico.....	25
Figura 2.9. Representação esquemática da ligação covalente da enzima (B) a um suporte com e sem espaçador.	26
Figura 2.10. Ilustração da imobilização de enzimas por encapsulamento	27
Figura 2.11. Comparação das estruturas da quitina e quitosana	34
Figura 2.12. Representação esquemática da enzima adsorvida em um suporte sólido e usada em solvente orgânico (MATTIASSON e ADLERCREUTZ, 1991).	37
Figura 3.1. Esquema de insolubilização de lipase em quitosana	50
Figura 4.1. Etapas de desenvolvimento do estudo realizado.....	58
Figura 4.2. Formação de butirato de butila (BB) catalisada por lipase pancreática (LPP) e microbiana (LCR) imobilizadas em quitosana de grau analítico.....	60
Figura 4.3. Formação de butirato de butila (BB) catalisada por lipase pancreática (LPP) e microbiana (LCR) imobilizadas em quitosana de grau farmacêutico.	61
Figura 4.4. Efeito da quantidade de enzima oferecida por grama de suporte na atividade hidrolítica da lipase imobilizada (●) e no rendimento de imobilização (○) empregando quitosana de grau farmacêutico. O rendimento foi calculado pela divisão da atividade hidrolítica total (Uads) por unidades de atividade oferecida na imobilização.....	63

- Figura 4.5.** Influência do tempo de incubação na atividade hidrolítica da lipase livre. Ensaios realizados a 37°C, pH 7,0, substrato azeite de oliva 50%65
- Figura 4.6.** Influência do tempo de incubação na atividade hidrolítica da lipase imobilizada. Ensaios realizados a 37°C, pH 7,0, substrato azeite de oliva 50 %65
- Figura 4.7.** Influência do pH na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em quitosana, tomando como parâmetro referencial de 100% as atividades de 1830 U/mg sólido para lipase livre e 123 U/mg suporte seco para a lipase imobilizada. Ensaio realizado a 37°C.....68
- Figura 4.8.** Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em quitosana, tomando como parâmetro referencial de 100% as atividades de 3400 U/mg sólido para lipase livre e 70 U/mg suporte seco para a lipase imobilizada. Hidrólise do azeite de oliva por 5 minutos a pH 7,0.....70
- Figura 4.9.** Gráfico de Arrhenius para a lipase (*Candida rugosa*) livre, solução de azeite de oliva 50%, pH 7,072
- Figura 4.10.** Gráfico de Arrhenius para a lipase imobilizada em quitosana, solução de azeite de oliva 50%, pH 7,0.72
- Figura 4.11.** Estabilidade térmica das lipases livre e imobilizada após 1 hora de incubação nas temperaturas de 37-60°C, tomando como parâmetro referencial de 100%, as atividades de 3400 U/mg para a lipase livre e 51,4 U/mg para a lipase imobilizada..... 74
- Figura 4.12.** Estabilidade térmica das lipases livre e imobilizada após 2 horas de incubação nas temperaturas de 37-60°C, tomando como parâmetro referencial de 100%, as atividades de 3400 U/mg para a lipase livre e 51,4 U/mg para a lipase imobilizada..... 74
- Figura 4.13.** Energia de desnaturação térmica da lipase livre (solução de azeite de oliva 50% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0)77
- Figura 4.14.** Energia de desnaturação térmica da lipase imobilizada (solução de azeite de oliva 50% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0)77
- Figura 4.15.** Atividade hidrolítica da lipase livre em função da concentração de azeite de oliva no substrato (37°C).79
- Figura 4.16.** Atividade hidrolítica da lipase imobilizada em função da concentração de azeite de oliva no substrato (37°C).....79
- Figura 4.17.** Estabilidade operacional da lipase imobilizada em meio aquoso (hidrólise de azeite de oliva, ciclos de 10 minutos a 37°C).82
- Figura 4.18.** Efeito do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo na esterificação com o butanol (conversão molar do butanol, após 24 horas a 37°C).85
- Figura 4.19.** Efeito do tamanho da cadeia carbônica do álcool na esterificação com o ácido butírico (conversão molar do ácido butírico após 24 horas a 37°C)87

- Figura 4.20.** Estabilidade operacional da lipase imobilizada em quitosana, em bateladas consecutivas, na esterificação do n-butanol com ácido butírico a 37°C, bateladas de 24 horas.93
- Figura 4.21.** Comparação do desempenho da lipase livre, imobilizada em quitosana e Lipozyme na síntese do butirato de butila (37°C, substrato constituído de 0,30 M de butanol e 0,3 M de ácido butírico).94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Mercado global da indústria de enzimas	5
Tabela 2.2. Vantagens da catálise enzimática em meio orgânico.....	7
Tabela 2.3. Exemplos de lipases microbianas disponíveis comercialmente	9
Tabela 2.4. Log P de alguns solventes orgânicos.	14
Tabela 2.5. Vantagens das enzimas imobilizadas relativamente às enzimas solúveis.....	19
Tabela 2.6. Comparação dos atributos de diferentes técnicas de imobilização	29
Tabela 2.7. Coeficientes de difusão em água a 20°C	31
Tabela 2.8. Coeficientes de difusão efetiva em aglomerados microbianos e suportes diversos.....	31
Tabela 2.9. Aplicações da quitosana	35
Tabela 2.10. Suportes empregados na imobilização de lipases com seus respectivos métodos de imobilização e fonte enzimática.....	38
Tabela 2.11. Propriedades catalíticas da lipase microbiana antes e após imobilização em diferentes suportes.....	41
Tabela 2.12. Aplicações potenciais das lipases	43
Tabela 2.13. Síntese de ésteres catalisada por lipases.....	45
Tabela 3.1. Variáveis independentes no planejamento experimental 2 ³	57
Tabela 4.1. Imobilização da lipase pancreática e microbiana <i>Candida rugosa</i> em diferentes tipos de quitosanas	59
Tabela 4.2. Imobilização da lipase microbiana <i>Candida rugosa</i> em quitosana por adsorção e ligação covalente	62
Tabela 4.3. Atividade (U/mg) e atividade relativa (%) em função do pH para a lipase (<i>C. rugosa</i>) livre e imobilizada em quitosana (grau farmacêutico). Ensaio realizado a 37°C.	67
Tabela 4.4. Atividade (U/mg) e a atividade relativa (%) em função da temperatura para a lipase livre e imobilizada em quitosana de grau farmacêutico, em pH 7,0.	69
Tabela 4.5. Evolução da atividade residual da lipase livre em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas (Tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,0)	73

Tabela 4.6. Evolução da atividade residual da lipase imobilizada em quitosana em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas (Tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,0).	73
Tabela 4.7. Constantes de inativação térmica da lipase livre e imobilizada em quitosana em meio aquoso (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0), após 1 hora de incubação.	75
Tabela 4.8. Efeitos das condições de estocagem na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada.....	81
Tabela 4.9. Propriedades catalíticas da lipase imobilizada em quitosana	83
Tabela 4.10. Influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo no grau de esterificação do n-butanol (0,30 M); enzima lipase imobilizada (0,5 g massa seca), 37°C, tempo de reação 24 h.....	84
Tabela 4.11. Comparação do consumo butanol e ácido durante a esterificação do butanol com diferentes ácidos orgânicos.	86
Tabela 4.12. Influência do tamanho da cadeia carbônica do álcool no grau de esterificação do ácido butírico. (Ácido butírico 0,30M; lipase imobilizada em quitosana (0,5 g massa seca), 37°C. Tempo de reação 24 h).....	86
Tabela 4.13. Matriz padrão para o experimento de síntese de butirato de butila pela lipase imobilizada em quitosana. Volume de substrato 20 ml; butanol 300mM; 20 h de reação. Lipase imobilizada 23,5 U/mg	88
Tabela 4.14. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 e seus erros padrão'	88
Tabela 4.15. Análise de variância.....	89
Tabela 4.16. Estabilidade operacional da lipase imobilizada em quitosana de grau farmacêutico na esterificação do butanol (0,25 M) com ácido butírico (0,30 M) em heptano, empregando 1,0 grama (massa seca) de lipase imobilizada com uma atividade de 32,83 U/mg suporte seco. Bateladas de 24 horas a 37°C.....	92

1. INTRODUÇÃO

As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e requerem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente, fornecem produtos de composição química mista, ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (DORDICK, 1989). Neste contexto, o enfoque biotecnológico, vem se apresentando como uma opção interessante para sua exploração na síntese orgânica, principalmente quando são consideradas algumas das vantagens dessa rota, tais como: i) maior rendimento do processo; ii) obtenção de produtos biodegradáveis; iii) menor consumo de energia; iv) redução da quantidade de resíduos; v) introdução de rotas mais acessíveis de produção (BRINK *et al.*, 1988).

A área de atuação da biotecnologia, que pode alcançar as metas acima traçadas é denominada de biotransformação. Este termo é aplicado a uma modificação específica ou a uma interconversão de estruturas químicas provocadas por enzimas contidas nas células ou por enzimas livres diferindo assim da fermentação, na qual o substrato é convertido ao produto final por meio de uma complexa via metabólica (VÉZINA, 1987). As biotransformações podem ser realizadas por meio de microrganismos vivos ou materiais biológicos como RNA¹⁷, anticorpos ou enzimas isoladas (PEREIRA, 1995).

Enzimas isoladas ou purificadas possuem diversas propriedades que tornam seu uso atrativo como catalisador em biotransformação (LEUENBERG, 1990). As enzimas são extremamente ativas, versáteis e realizam uma variedade de transformações sob condições brandas e de maneira seletiva. Adicionalmente, desenvolvimentos recentes em enzimologia, principalmente engenharia de proteínas e reações enzimáticas em meios não-aquosos, aumentaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisador em processos industriais (FABER, 1997).

Entre os processos químicos de maior interesse industrial estão as reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente (GITLESEN *et al.*, 1997). O potencial de uso industrial das lipases é destacado pela versatilidade em processos hidrolíticos e de síntese. Além disso, as lipases possuem especificidade comprovada, fornecendo produtos que não poderiam ser obtidos por processos químicos convencionais. Para que a biotransformação

possa competir com a produção química otimizada, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. A imobilização da lipase, por exemplo, é um fator limitante na economicidade do processo. As lipases, devido à sua natureza protéica, podem sofrer ao longo de uma reação um processo de desnaturação como perda progressiva da atividade funcional. Por meio da imobilização em suportes sólidos, entretanto, pode ocorrer um aumento na estabilidade do catalisador, prolongando sua vida útil. A imobilização facilita a recuperação da enzima do meio reacional, possibilitando sua posterior reutilização (TANAKA e SONOMOTO, 1990).

Os métodos e suportes disponíveis atualmente são inúmeros e a escolha é uma estratégia baseada em processos específicos de catálise, incluindo parâmetros como atividade enzimática, utilização efetiva da lipase, desativação e características de regeneração, custo, toxicidade dos reagentes de imobilização, propriedades finais da lipase imobilizada (MALCATA *et al.*, 1990; BALCÃO *et al.*, 1996; YAHYA *et al.*, 1998; OLIVEIRA, 1999).

Este trabalho está inserido em amplo projeto de pesquisa que visa o desenvolvimento de técnicas de imobilização de lipases para aplicação em meios altamente polares. Este projeto vem sendo desenvolvido desde 1996, envolvendo a colaboração técnica entre os Departamentos de Engenharia Química desta Universidade e da Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Os trabalhos, até o momento, realizados empregaram suportes inorgânicos para imobilização de lipases pancreática e microbiana (CASTRO *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 1999). Para execução desta dissertação, optou-se pela imobilização da lipase em suportes orgânicos (quitosana). A simplicidade do método e a possibilidade de obter facilmente este tipo de suporte a partir de fontes naturais (por exemplo, rejeitos da indústria pesqueira) foram fatores determinantes para a seleção desta metodologia.

Neste trabalho, quitosana foi utilizada como suporte para imobilizar lipase de origem animal e microbiana por adsorção física e ligação covalente. A preparação de lipase imobilizada mais ativa foi caracterizada e aplicada em reações de hidrólise e síntese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENZIMAS COMO CATALISADORES

Enzimas são catalisadores biológicos, constituídos de proteínas ou glicoproteínas, que participam de muitas reações químicas nos seres vivos (BAILEY e OLLIS, 1986). Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas catalisam as reações em condições brandas, em soluções aquosas/ou não-aquosas, temperatura e pressão ambientes (CONN e STUMPF, 1972; DIXON e WEBB, 1979). As enzimas também se caracterizam pela especificidade em relação ao substrato, algumas atuando num limitado grupo de compostos, enquanto outras agem sobre um único substrato.

As enzimas, como toda proteína natural, são constituídas de uma ou mais cadeias de L-aminoácidos ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas. A composição em aminoácidos e a seqüência destes na cadeia são características particulares de cada enzima e, de certa forma, induzem uma conformação tridimensional própria, essencial à atividade catalítica. Esta atividade é exercida pelo centro ativo, que pode ser definido como a(s) parte(s) da estrutura da enzima que atua (m) em contato direto com a substância (substrato) a ser transformada. O modo de reagir está associado ao conceito de formação inicial de um complexo enzima-substrato [ES]. A existência deste complexo ES, foi deduzida: 1) pelo alto grau de especificidade apresentado pelas enzimas; 2) pela forma da curva de velocidade em função da concentração de substrato; e, 3) pelo fato de que os substratos freqüentemente protegem as enzimas de inativação (FABER, 1997).

O alto grau de especificidade das enzimas sugeriu EMIL FISCHER em 1894, a propor a hipótese do modelo chave-fechadura. Esse modelo assume que a enzima possui uma região, sítio ativo, a qual é complementar em tamanho, forma e natureza química à molécula de substrato (Figura 2.1). Já a hipótese de KOSHLAND, mais moderna, ou seja, da enzima flexível ou do encaixe induzido considera que o sítio ativo não precisa pré-existir sob uma forma geométrica rígida, devendo contudo existir um arranjo espacial preciso e específico dos grupamentos R dos aminoácidos, arranjo esse que é induzido pelo contato com o substrato (Figura 2.2) (FABER, 1997).

O sítio ativo de uma enzima contém os radicais de aminoácidos, conhecidos como grupamentos catalíticos, os quais são responsáveis pela formação e ruptura de ligações. Em

função da conformação tridimensional da molécula, os sítios ficam de uma forma espacial bem próximos, definindo assim uma estrutura peculiar que confere às enzimas propriedades distintas e específicas. Apesar das enzimas diferirem em estrutura, especificidade e modo de catálise, algumas considerações de seus centros ativos devem ser observadas, tais como: 1) o sítio ativo ocupa uma parte relativamente pequena do volume total de uma enzima; 2) o sítio ativo é uma forma tridimensional; 3) os substratos ligam-se às enzimas por múltiplas atrações fracas; e, 4) a especificidade de ligação depende do arranjo definido com precisão pelos átomos no centro ativo (STRYER, 1992).

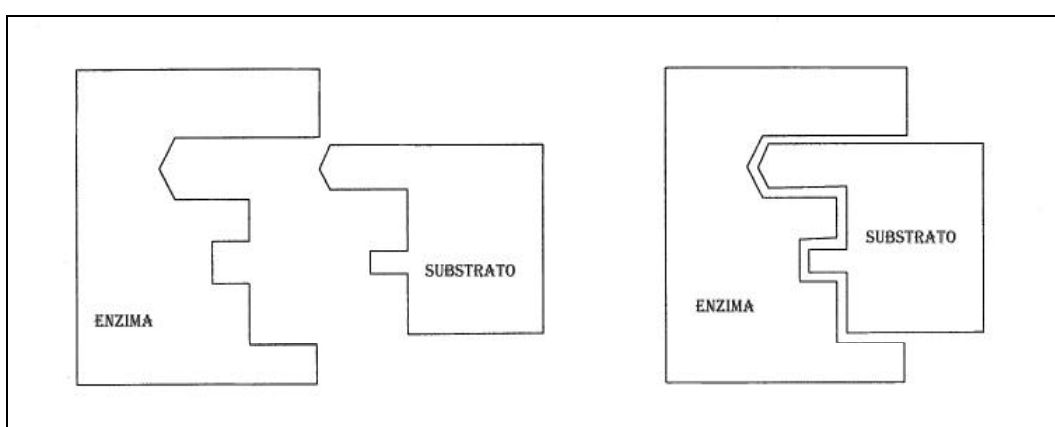


Figura 2.1. Mecanismo chave fechadura (FABER, 1997)

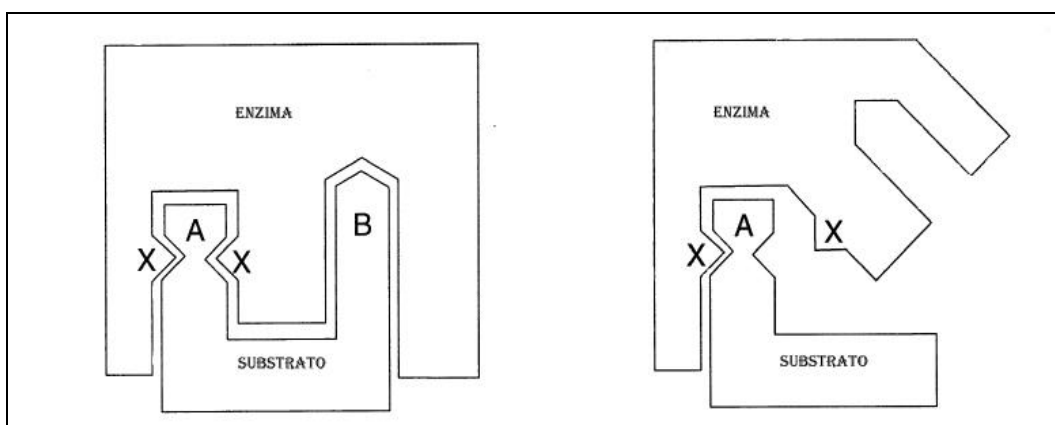


Figura 2.2. Mecanismo do encaixe induzido (FABER, 1997)

Portanto, a característica mais importante de uma enzima é o seu alto poder catalítico. Deste modo, o nome de uma enzima não especifica a estrutura mas, contrariamente, define a principal reação catalisada. As enzimas são classificadas em 6 classes: 1) oxidoredutases; 2) transferases; 3) hidrolases; 4) liases; 5) isomerases, e 6) ligases (sintetases). Essas classes são posteriormente subdivididas em subclasses, para especificar o tipo de reação mais pormenorizadamente e para indicar a natureza química dos reagentes. Cada enzima recebe então um número EC (Enzyme Commission) consistindo em quatro partes, as três primeiras definindo os três níveis de classificação e a quarta única para a enzima em particular. Deste modo, por exemplo EC 3.1.1.3, refere-se a uma enzima que catalisa a hidrólise de éster, sendo esta uma reação reversível. O nome tradicional é lipase.

Dados referentes ao mercado das enzimas são baseados em critérios bastante diferentes para estimativas e avaliações, o que resulta em conclusões muito divergentes umas das outras. Num estudo realizado por SHANLEY (1998) foi efetuada uma estimativa do volume de mercado das enzimas mais importantes. Cerca de US\$ 1.350 bilhões/ ano são investidos em biocatalisadores, conforme é mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Mercado global da indústria de enzimas

<i>Setor</i>	<i>Enzimas</i>	<i>Milhões de Dólares (US\$)</i>
Produção de amido	α -amilase, glucoamilase glucose isomerase	500
Detergentes	Protease, lipase, amilase	450
Têxteis	Amilases	150
Tratamento de couro	Enzimas diversas	25
Papel e celulose	Celulases	25
Laticínios	Rennet e lactase	150
Papaína	-	25
Pectinesterases	-	30
Total		US\$ 1.355 bilhões

Fonte: SHANLEY (1998).

Enquanto o número de companhias que comercializam enzimas está próximo do milhar, o número de produtores é muito inferior. Ao todo, nos Estados Unidos e parte oeste da Europa existem apenas cerca de 30 indústrias produtoras de enzimas. Muitos produtores são do ramo da indústria químico-farmacêutica, para os quais o lucro proveniente das

enzimas desempenha um papel pouco significativo na sua produção anual. Cerca de 90% da produção anual de enzimas provém dos dez maiores produtores.

Na gama de indústrias nas quais as enzimas são aplicadas, as indústrias de detergentes e do amido são de longe as mais importantes. Juntas elas consomem quase 2/3 da produção mundial de enzimas. As enzimas, com o seu papel de catalisadores específicos, tornam possível um grande número de processos cujos produtos possuem um valor de mercado muito superior ao das próprias enzimas.

Embora nos últimos 20 anos, a utilização de enzimas na indústria esteja aumentando rapidamente, ainda existe um grande campo para a sua expansão. Novas enzimas vão criando oportunidades e, em alguns ramos da indústria a utilização das enzimas está apenas começando. Um exemplo típico é uso de enzimas em síntese orgânica (SOLEWICK, 1987; MONOT, 1994; FABER, 1997).

2.2. ENZIMAS EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS

No passado, tinha-se a concepção que as enzimas possuíam pouca utilidade em síntese orgânica, tendo em vista que o meio reacional necessário para realizar esse tipo de processo é de natureza orgânica e suponha-se que as enzimas eram inativas em contato com esse meio. Entretanto, estudos recentes demonstram que as enzimas podem ser efetivamente usadas em alguns tipos de meios orgânicos contendo baixo teor de água (menor que 200 ppm) e em alguns casos em ausência total de água. Isto é importante, pois o equilíbrio termodinâmico de muitos processos de síntese, tais como a produção de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e álcool não são formados em presença de água (CASTRO *et al.*, 1999). Em síntese orgânica, existem inúmeras vantagens do uso de enzimas que apresentam especificidade significativa para a formação de produto de tal forma que, custo de separação, purificação e tratamento de resíduos sejam minimizados (LIMA e ANGNES, 1999). O estudo de enzimas em meio orgânico tem evoluído significativamente nos últimos vinte anos (VULFSON, 1994). Tais estudos começaram com a investigação do comportamento das enzimas em sistemas predominantemente aquosos, os quais continham pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água. Posteriormente, desenvolveu-se sistemas enzimáticos para misturas de duas fases aquosa/ orgânica e, em seguida, em meio orgânico contendo uma fase aquosa dispersa (microemulsões).

Atualmente observa-se, em um grande número de aplicações, a utilização de suspensões enzimáticas em solventes orgânicos praticamente anidros. Uma das principais vantagens da catálise em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos formados por reagentes pouco solúveis em água. Além disso, é possível deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que seriam impossíveis em meio aquoso, pela extração dos substratos e/ ou produtos para a fase aquosa e/ ou orgânica ou pela diminuição da quantidade de água do meio reacional. Desta forma, reações como a esterificação e as interesterificações tornam-se viáveis industrialmente. Algumas vantagens da catálise enzimática em meio orgânico são apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Vantagens da catálise enzimática em meio orgânico

Aumento da disponibilidade de substratos pouco solúveis em água;
Deslocamento do equilíbrio das reações;
Diminuição do número de reações indesejáveis;
Simplificação dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador;
Controle da estereosseletividade das reações enzimáticas;
Diminuição de eventuais inibições por substratos e produtos;
Aumento da estabilidade da enzima.

Fonte: MONOT (1994).

O uso de enzimas como catalisadores na síntese orgânica têm sido estudado, principalmente, com o objetivo de preparar substâncias biologicamente ativas. Entretanto, os processos catalisados por enzimas tendem a se tornar um procedimento rotineiro em trabalhos de síntese, como ilustrado recentemente no livro “Biotransformations in Organic Chemistry”, que reúne exemplos de reações catalisadas por diferentes classes de enzimas, sob o ponto de vista sintético (FABER, 1997). A frequência do uso de uma particular classe de enzima segue um perfil definido por suas vantagens técnicas e versatilidade de aplicação (BRINK *et al.*, 1988; DORDICK, 1989; MARGOLIN, 1991), na qual a participação das hidrolases (lipases, esterases e proteases), perfazem um total de aproximadamente 75%. Este fato é uma consequência direta da disponibilidade comercial dessas enzimas o que permite a seleção da enzima mais adequada para a síntese desejada (ZAKS *et al.*, 1988; FABER, 1997).

2.3. LIPASES

2.3.1. Características e Propriedades

As lipases (EC 3.1.1.3) catalisam ambas as reações: hidrólise e síntese de éster a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas (Figura 2.3). Essas reações usualmente são processadas com alta regio e/ou enantiosseletividade, tornando as lipases um importante grupo de biocatalisadores em química orgânica. As razões para o enorme potencial biotecnológico das lipases incluem fatos relacionados com: 1) alta estabilidade em solventes orgânicos; 2) não requererem a presença de co-fatores; 3) possuem uma larga especificidade pelo substrato; e, 4) demonstrarem uma alta enantiosseletividade.

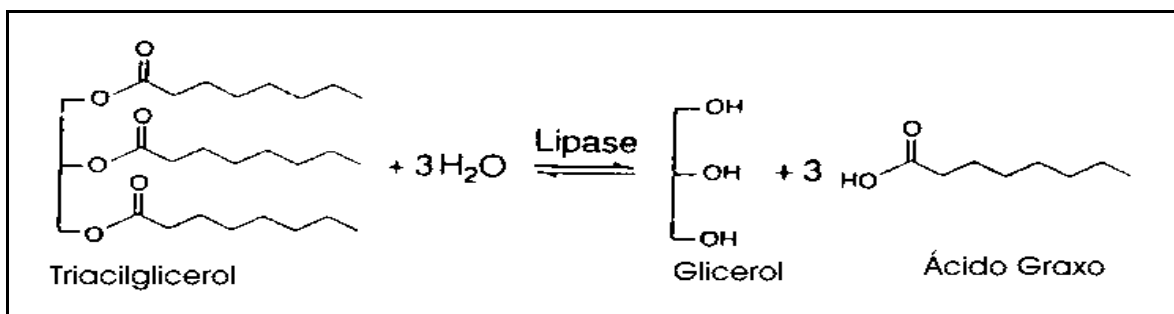


Figura 2.3. A ação catalítica de lipases. Um triglicerídeo pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos, ou a reação reversa (síntese) glicerol e ácidos graxos podem reagir para formar o triglicerídeo.

Um grande número de lipases têm sido produzidas comercialmente, sendo a maioria de origem de fungos e bactérias. Uma publicação recente sobre a disponibilidade comercial de lipases triacilgliceróis, listou enzimas de 34 diferentes fontes, incluindo 18 a partir de fungos e 7 de bactérias (JAEGER e REETZ, 1998); a Tabela 2.3, apresenta as lipases microbianas que parecem ser as mais usadas em biotecnologia. Nota-se que existe uma confusão considerável sobre a origem de algumas lipases em particular, resultando em mudanças nos nomes sistemáticos de cepas fúngicas e bacterianas que produzem estas enzimas: *Candida rugosa* era formalmente denominada de *Candida cylindracea*; *Thermomyces lanuginosus* era denominada de *Humicola lanuginosa*; *Pseudomonas glumae* e *Pseudomonas cepacia* foram renomeadas como *Burkholderia glumae* e *Burkholderia cepacia*, respectivamente. Além disso, a lipase *B. glumae* é idêntica à *Chromobacterium*

viscosum. O interesse crescente em lipases microbianas pode ser constatado pelo aumento no número de excelentes monografias e artigos de revisão cobrindo aspectos referentes à biologia molecular, propriedades bioquímicas e em particular, às aplicações biotecnológicas destas enzimas (MARGOLIN, 1991; GILBERT, 1993; CASTRO e ANDERSON, 1995; BALCÃO *et al.*, 1996; GANDHI, 1997; YAHYA *et al.*, 1998).

Tabela 2.3. Exemplos de lipases microbianas disponíveis comercialmente

<i>Origem</i>	<i>Organismos produtores de lipases</i>	<i>Comercialização</i>
Fúngica	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Rhizomucor javanicus</i> <i>Rhizomucor miehei</i>	Aldrich, Amano, Altus, Biocatalysts Fluka, Novo (SP526) Amano (L), Biocatalysts, Fluka Amano (GC-20, GC-4), Biocatalysts Novo Nordisk
Bacteriana	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Chromobacterium viscosum</i>	Genencor Amano Aldrich, Amano, Biocatalysts Towa Koso Asahi, Biocatalysts, Sigma

Fonte: FABER (1997).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular entre 20 a 60 KDa e serem ativas na faixa de pH 4 a 9. São usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente sendo que, a maioria apresenta uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 a 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (MACRAE e HAMMOND, 1985).

2.3.2. Estrutura e Mecanismo de Atuação

A estrutura tridimensional (3D) da lipase fúngica de *Rhizomucor* e da lipase pancreática foram determinadas em 1990 (JAEGER e REETZ, 1998). Desde então, mais de onze estruturas de lipases já foram determinadas, das quais, com exceção da lipase

pancreática, são todas de origem microbiana. Estas enzimas, apresentam massa molecular ao redor de 20 a 60 KDa e todas mostram uma característica padrão conhecida como o entrelaçado de α/β hidrolase.

O sítio da lipase é composto de uma folha β central consistindo de 8 diferentes fitas β (β 1- β 8) conectados com seis α hélices (A-F). O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina; o resíduo nucleofílico serina é localizado no C-terminal da fita β 5 de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal “ β em torno de α ”, designada como o canto nucleofílico.

A hidrólise do substrato inicia-se com o ataque nucleofílico pelo oxigênio da serina no átomo de carbono carbonílico na ligação éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico estabilizado pelas ligações do hidrogênio a átomos de nitrogênio de resíduos da cadeia principal pertencente a cavidade de oxianion. Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação dos ácidos graxos e regeneração da enzima.

As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo, podendo em alguns casos impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten. As equações de Michaelis-Menten só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea. Substratos lipolíticos usualmente formam um equilíbrio entre os estados monoméricos, micelar e emulsificados, resultando na necessidade de um modelo de sistema adequado ao estudo da cinética da lipase. A técnica de camada única tem sido usada extensivamente e mais recentemente, a tecnologia gota-óleo foi proposta para estabelecimento da cinética da lipase, a qual é monitorada pela análise automática do perfil de uma gota de óleo suspensa em água; a redução na tensão superficial entre o óleo e a água causada pela hidrólise da lipase é medida em função do tempo (JAEGER e REETZ, 1998).

O fenômeno mais conhecido, originado de estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas é a “ativação interfacial”, o qual relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis que formam uma emulsão. Lipases, diferentemente das esterases, são então definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados.

A determinação da estrutura tridimensional (3D) da lipase fornece uma explicação elegante para a ativação interfacial: o sítio ativo de lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, o qual é denominado de tampa (ou borda). Quando da ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato; e ao mesmo tempo, expõe uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface. A molécula da lipase na conformação inativa com a borda fechada cobrindo o sítio ativo e na configuração ativa com a borda aberta é mostrada na Figura 2.4 (SVANEBORG, 1999).

Recentemente, revelou-se que a presença de uma estrutura em forma de uma tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998), lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *B. glumae* e *Candida antarctica* B) e uma específica lipase pancreática não mostraram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfílica cobrindo seus sítios ativos. Esta observação sugere que a presença de uma tampa dominante e ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase. Portanto, a definição atual é bastante simples: uma lipase é uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa.

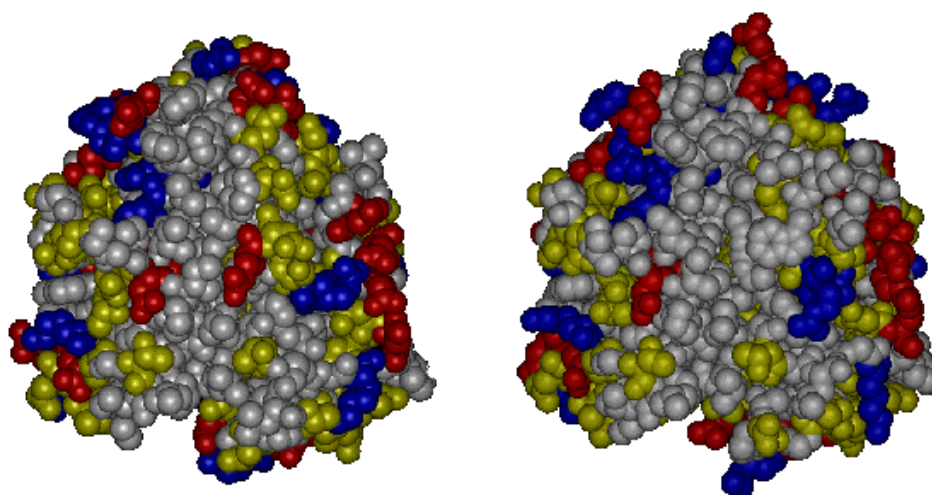
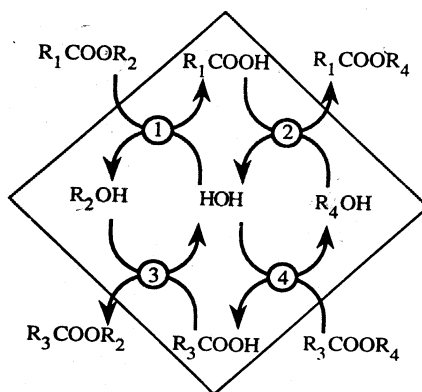


Figura 2.4. Estrutura da molécula de lipase na conformação inativa com a tampa fechada cobrindo o sítio ativo (esquerdo) e na configuração ativa com a tampa aberta (direita). SVANEBORG, C. Enzyme Division, Novo Nordisk A/ S (Home page: <http://www/fys.risoe.dk/public/lipase>).

2.3.3. Reações Catalisadas pelas Lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. De fato, embora sua função natural seja a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster a partir de álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (Figura 2.5, BALCÃO *et al.*, 1996).



- 1: Hidrólise
- 2: Síntese de éster
- 1 + 2: Alcoólise
- 1 + 3: Acidólise
- 1 + 2 + 3 + 4: Transesterificação

Figura 2.5. Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (BALCÃO *et al.*, 1996).

2.3.4. Especificidade

A especificidade da lipase é um fator crucial para sua aplicação industrial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. Em geral, as lipases podem ser classificadas, em dois grupos (MACRAE, 1983): não-regiosseletiva e regiosseletiva.

Lipases pertencentes ao primeiro grupo, não apresentam regioespecificidade e liberam ácidos graxos das três posições do glicerol. Os produtos formados pela catálise desse tipo de enzima, contém uma distribuição de grupos acila de composição similar aos obtidos por catálise química.

Lipases do segundo grupo, liberam ácidos graxos da posição 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes, daquelas obtidas pelas lipases não-regiosseletivas ou catalisador químico. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triglicerídeos, utilizando lipases regiosseletivas, é uma das características mais interessantes da lipase para sua aplicação no setor industrial.

Uma outra propriedade da lipase é referente à sua habilidade em discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica. Esta metodologia tem sido usada com bastante sucesso na separação seletiva de compostos contendo misturas racêmicas, tarefa de difícil execução por métodos químicos convencionais (JENSEN *et al.*, 1990). A lipase tem sido empregada para resolução de racematos resultando em rendimentos elevados, para obtenção de ésteres, álcoois e ácidos opticamente puros (JONES, 1986). Este tipo de reação, pode ter uma importância fundamental, pois isômeros de alguns compostos apresentam diferentes propriedades. No caso específico dos medicamentos, o enantiômero indesejável pode ter até uma ação completamente diferente do composto opticamente ativo ou pode mesmo causar efeitos colaterais. No campo alimentício, sabe-se que, a forma R do aspartame tem um sabor adocicado enquanto a forma S tem um sabor amargo (WELSH *et al.*, 1989).

2.3.5. Fatores que Interferem nas Biotransformações com Lipases

2.3.5.1. Influência da Polaridade dos Solventes

A seleção do solvente orgânico é um fator importante na catálise enzimática em meio não aquoso, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima (Tabela 2.4). Os solventes menos nocivos às enzimas são os mais hidrofóbicos, por não interagirem significativamente com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos tendem a retirar a água essencial da

camada protéica, levando à perda da atividade enzimática. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos requerem substancialmente uma menor quantidade de água para obtenção de sua atividade em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos (ZAKS e KLIBANOV, 1988).

Tabela 2.4. Log P de alguns solventes orgânicos.

<i>Solvente</i>	<i>Log P</i>	<i>Solvente</i>	<i>Log P</i>
Triglima	-1,9	Clorofórmio	2,0
Diglima	-1,3	2-4-Dimetil-3-pentanol	2,3
N-N-Dimetilformamida	-1,0	3-Etil-3-pentanol	2,3
Monoglima	-0,75	Heptanol	2,4
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	-0,34	Tolueno	2,5
Acetonitrila	-0,33	Trifluorotricloroetano	2,8
Acetona	-0,23	Octanol	2,9
2-Butanona	0,28	Hexano	3,5
Diclorometano	0,60	Pentiléster	3,9
2-Metil-2-propano	0,79	Heptano	4,0
2-Pentanona	0,80	Pentilbenzoato	4,2
n- Butanol	0,80	Feniléter	4,3
Ácido butírico	0,81	Octano	4,5
1,2-Dicloroetano	1,2	Decano	5,6
2-Metil-2-butanol	1,3	Undecano	6,1
4-Metil-pentanona	1,3	Dodecano	6,6
tert-Butilmetiléter	1,4	Tetradecano	7,6
2-Metil-2-pentanona	1,8	Hexadecano	8,8
Hexanol	1,8	Butiloleato	9,8

Fonte: LAANE *et al.* (1987).

Os solventes mais utilizados nas reações catalisadas por lipases são: benzeno, tolueno, n-hexano, heptano, ciclohexano, octano, e outros. As taxas de reações enzimáticas mostram que tais solventes são afetados drasticamente pela polaridade no meio orgânico. Portanto, a polaridade do solvente (afinidade do solvente pela água) se apresenta como um dos critérios mais importantes para uma condução eficiente de uma reação enzimática em meio orgânico. Nesse sentido, logaritmo do coeficiente de partição de um composto entre n-octanol e água (log P), tem sido largamente empregado para predizer o rendimento de uma reação, em presença de um determinado solvente. Conforme modelo proposto por

LAANE *et al.* (1987), a reação se processa em maior extensão na presença de solventes mais hidrofóbicos ($\log P > 3,0$) e em menor extensão em presença de solvente hidrofílicos ($\log P < 2,0$). Exemplos de $\log P$ de alguns solventes orgânicos estão ilustrados na Tabela 2.4.

Entretanto, para garantir um adequado grau de biocompatibilidade do solvente com o catalisador, utilizam-se critérios adicionais, tais como: densidade, viscosidade, toxicidade, ponto de ebulição e a natureza química do solvente (PEREIRA *et al.*, 1994).

2.3.5.2. Efeitos da Água

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para manter seu estado conformacional tridimensional ativo mesmo quando fixadas em suportes. A água contribui para a integridade estrutural, a polaridade do centro ativo e a estabilidade protéica. Isto fornece interações hidrofóbicas dos resíduos polares com a molécula da enzima, a qual poderia de outra maneira interagir uma com outra, criando uma conformação estrutural incorreta. A água pode também limitar a solubilidade dos substratos hidrofóbicos ao redor da enzima. A quantidade de água necessária varia significativamente dependendo da origem da lipase. Alguns pesquisadores sugerem uma monocamada de água ao redor da molécula da enzima enquanto outros propõem quantidades mínimas embebidas na molécula da enzima (ZAKS *et al.*, 1988; YAHYA *et al.*, 1998).

Quando a lipase é usada nas reações de esterificação, é necessário um rígido controle do teor de água no meio reacional e um compromisso entre a insolubilidade dos substratos em solventes apolar e o grau de desnaturação da enzima. Os mecanismos que envolvem o controle destes parâmetros são extremamente complexos, principalmente com relação ao teor de água presente no meio reacional, que pode ter origem a partir de diversas fontes (HALLING, 1992): i) água oriunda do substrato e solvente (se presente); ii) água presente na enzima; iii) água no suporte de imobilização (se presente) e iv) água formada durante a reação.

Por esta razão, um controle do teor de água no meio reacional deve ser efetuado, por meio de uma seleção adequada dos parâmetros de reação. Uma das grandes dificuldades nessas reações é a remoção de água produzida no progresso da síntese,

evitando o aumento do teor de água no meio reacional e, conseqüentemente, a inversão do sentido desejado da reação. Neste caso específico, são comuns procedimentos de remoção desse subproduto por técnicas adequadas como: borbulhamento de nitrogênio ou ar, evaporação simples, utilização de agentes dessecantes (peneiras moleculares ou pares de sais conjugados), destilação simples ou à pressão (HALLING, 1990; CASTRO e ANDERSON, 1995; YAHYA *et al.*, 1998).

Numa reação de esterificação catalisada por Lipozyme em heptano, CASTRO *et al.* (1992b), testaram diferentes técnicas de remoção de água (por borbulhamento de ar, lavagem com acetona seguido por borbulhamento e adição de peneira molecular). Todas as três estratégias resultaram em quantidades similares de remoção de água da fase sólida (enzima e suporte). Apesar das peneiras moleculares terem reduzido a quantidade de água no meio reacional, a água formada durante a reação foi incorporada à enzima e teve um pequeno efeito no produto de conversão. Um decréscimo da conversão foi reportado para a reação de esterificação quando o período de contato da peneira molecular com a enzima foi maior que 12 horas (CASTRO e JACQUES, 1995).

Em escala industrial de bioconversão, a secagem com peneiras moleculares é impraticável devido à sua saturação, o que exige um esforço intenso para sua regeneração. Adicionalmente a forte afinidade das peneiras moleculares pela água pode causar uma excessiva desidratação da enzima. MUKESH *et al.* (1997), descreveram todos esses problemas usando uma lipase em reator tubular de reciclo com uma coluna de separação com peneira molecular. A regeneração da coluna de adsorção pode ser realizada independente da saturação sem o rompimento da coluna.

Perevaporação é considerada um método atrativo para a remoção de água em sistemas orgânicos e livre de solvente especialmente em processos contínuos e em larga escala. Enzimas podem ser imobilizadas para reduzir o risco de perda da membrana. Água é removida a partir do sistema reacional por sorção seletiva por uma membrana homogênea polimérica e não porosa. Isto é seguido pela difusão seletiva através da membrana e evaporação até a fase vapor. A diferença nas pressões parciais entre os dois tipos de membranas fornecem uma força de empuxo para o processo enquanto as diferenças de solubilidade dos componentes de reação na membrana fornecem esta seletividade.

Este método foi testado com grande sucesso por KWON *et al.* (1995), na reação de esterificação do ácido oléico e n-butanol catalisada pela Lipozyme em isooctano a 25°C.

Uma conversão final de 92% foi obtida com a evaporação do processo através da membrana de acetato de celulose comparado com 61% sem evaporação, depois de 140 minutos.

2.3.5.3. Influência do Uso de Lipases Imobilizadas

Quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias (α -hélice e a conformação β) acarretando, desta maneira, a sua desestabilização. Com o objetivo de assegurar uma conformação enzimática cataliticamente ativa em meio orgânico, a molécula de enzima deve ter uma camada de hidratação definida (CASTRO e ANDERSON, 1995), separando o solvente do contato com a superfície da proteína e contribuindo para o aumento da sua flexibilidade interna. Uma outra maneira de proteger a configuração nativa da enzima, é por meio de sua insolubilização em suportes sólidos. A imobilização da enzima, tem um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização, também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial, para a condução de reações enzimáticas (TANAKA e SONOMOTO, 1990; CASTRO e ANDERSON, 1995; YAHYA *et al.*, 1998).

Há uma vasta quantidade de trabalhos na literatura que tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meios aquosos e não-aquosos. Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, foram estudados para a imobilização de lipases (MALCATA *et al.*, 1990; BALCÃO *et al.*, 1996).

Atualmente diversas preparações de lipase imobilizada, já estão disponíveis comercialmente, entre as quais destaca-se a preparação comercializada pela NOVO NORDISK (1986), sob a denominação de Lipozyme. As boas características da Lipozyme, como alta atividade e estabilidade para temperatura de até 60°C, tornaram esta preparação comercial uma das mais bem testadas em escala de laboratório (CASTRO e ANDERSON, 1995; LANGONE, 1998). Lipozyme é fornecida para o mercado consumidor com o teor de

umidade de 10%. O suporte utilizado, permite que sejam efetuadas alterações no estado de hidratação da enzima, ou por secagem ou pela adição de água. Apesar dessas vantagens, seu grande poder hidrofílico tem imposto algumas limitações para a condução de processos contínuos ou mesmo para o emprego de substratos altamente polares, incentivando pesquisas para o desenvolvimento de técnicas de imobilização de lipases.

2.4. ENZIMAS IMOBILIZADAS

O uso de enzimas tem muitas aplicações industriais, sendo, no entanto, limitado por sua relativa instabilidade em solução, custos elevados de isolamento e purificação e a dificuldade técnico-econômica de recuperação para reutilização da enzima ativa da mistura reacional após a finalização do processo catalítico. Este inconveniente pode ser minimizado quer pela síntese química de compostos que possam reproduzir a atividade e a especificidade das enzimas possuindo melhores estabilidade (enzimas sintéticas-sinenzimas ou análogos enzimáticos), quer pelo uso de técnicas de imobilização, tornando as enzimas mais estáveis cataliticamente e simplificando as etapas de recuperação do produto (CHIBATA e WINGARD, 1983).

As enzimas são geralmente muito menos resistentes que os catalisadores industriais comuns, e requerem um cuidado consideravelmente superior na sua manutenção. A atividade enzimática é influenciada por fatores ambientais, como a temperatura, pH do meio e concentração do substrato.

Nas duas últimas décadas houve um desenvolvimento muito rápido no uso de enzimas como catalisadores para fins industriais, analíticos e farmacêuticos. Nesta área, enzimas ativas e estáveis têm sido imobilizadas, de modo a tornar possível o seu uso da mesma forma que os catalisadores sólidos nas reações químicas (LIMA e ANGNES, 1999). Algumas das principais vantagens das enzimas imobilizadas relativamente à sua forma solúvel são resumidas na Tabela 2.5.

Além da sua principal aplicação que é a industrial, as enzimas imobilizadas têm sido consideradas como modelos, com interesse acadêmico, no estudo da relação entre a atividade catalítica e a estrutura protéica. Também muitas enzimas existem ligadas naturalmente a membranas celulares ou a organelas celulares nos organismos, razão pela qual as enzimas imobilizadas podem ser utilizadas para simulação destas enzimas ligadas.

Tabela 2.5. Vantagens das enzimas imobilizadas relativamente às enzimas solúveis

-
1. As enzimas podem ser reutilizadas.
 2. Os processos podem ser operados continuamente e controlados com facilidade.
 3. Os produtos são facilmente separados.
 4. Os problemas de efluentes e de manuseamento de materiais são minimizados.
 5. Em alguns casos as propriedades enzimáticas (atividade e estabilidade) podem ser alteradas favoravelmente pela imobilização.
-

As enzimas imobilizadas são definidas como “enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço, com retenção das suas atividades catalíticas e que podem ser utilizadas repetidamente e continuamente”. O termo enzimas imobilizadas inclui: (1) enzimas modificadas a uma forma insolúvel em água por técnicas adequadas, (2) enzimas solúveis usadas em reatores equipados com membranas de ultrafiltração não-permeáveis que retêm as moléculas enzimáticas dentro do reator e (3) enzimas cuja mobilidade foi restringida por ligação a outras macromoléculas, sendo o composto resultante solúvel em água (CHIBATA, 1978).

Um critério vital em processos industriais é um alto rendimento por espaço e tempo, que pode também ser expresso como a produtividade volumétrica (kg de produto por volume do reator, em m³, por hora). A imobilização permite alcançar e manter uma alta atividade catalítica num volume pequeno. Isto conduz não só a altas produtividades volumétricas mas também a condições mais suaves para substratos e produtos, pela redução do tempo de exposição e das condições de reação (CHIBATA, 1978; ZANIN, 1989).

As enzimas imobilizadas estão sempre em competição com as enzimas nativas. A decisão da forma mais adequada deve ser efetuada tomando por base uma análise cuidadosa de cada situação em particular. No caso de enzimas de baixo custo e com alta atividade, a imobilização raramente apresenta vantagens técnicas. Esta é uma das razões pelas quais as hidrolases imobilizadas, por exemplo, não se tornaram comuns na hidrólise do amido, uma das aplicações clássicas das enzimas (CLARK, 1994).

A natureza do substrato também desempenha um grande papel na decisão se enzimas nativas ou imobilizadas devem ser usadas. Na indústria do couro ou para amaciamento da carne, por exemplo, o uso de enzimas imobilizadas dificilmente é vantajoso. Entretanto, se o substrato formar uma solução límpida e possuir baixa massa molecular, a imobilização de enzimas poderá ser empregada sem receio de surgimento de

problemas. As razões são que a turbidez complica a separação dos biocatalisadores do substrato e que grandes moléculas de substrato, devido à sua imobilidade relativa, são convertidas mais rapidamente por moléculas nativas (móveis) do que por enzimas imobilizadas (ZANIN, 1989).

Para um catalisador imobilizado, a hipótese de ser selecionado para um procedimento particular depende, em larga escala se as suas propriedades melhoram quando comparadas com a forma nativa. É sabido que a imobilização pode provocar alterações significativas na estabilidade, pH, temperatura e na constante de Michaelis - Menten (K_m).

A manufatura de enzimas imobilizadas foi efetuada pela primeira vez nos princípios deste século com o trabalho de NELSON e GRIFFIN (1916) referente à adsorção da invertase em carvão ativado e alumina, com retenção da sua atividade catalítica. Contudo, o desenvolvimento da química de imobilização veio apenas a processar-se a partir dos princípios da década de sessenta.

Atualmente as enzimas imobilizadas podem ser produzidas em diferentes formas: partículas, membranas (as enzimas são imobilizadas por aprisionamento dentro de uma membrana semipermeável polimérica), tubos (enzimas em tubos são produzidas usando nylon e tubos de poliacrilamida como suporte) e filtros (as enzimas são imobilizadas pelo aprisionamento em fibras para formar fibras enzimáticas). Contudo, as enzimas imobilizadas são mais encontradas na forma de partículas devido à facilidade de manuseio e de fácil aplicação (HARTMEIER, 1988; CHIBATA e WINGARD, 1983).

2.4.1. Métodos de Imobilização

Existem vários métodos de imobilização de enzimas, cuja aplicação depende da solubilidade da enzima. A Figura 2.6 apresenta uma das possíveis formas de classificação dos métodos de imobilização de enzimas. Esta foi sugerida por KENNEDY e ROIG (1995), e procura combinar a natureza das interações entre enzima e suporte, responsáveis pela imobilização.

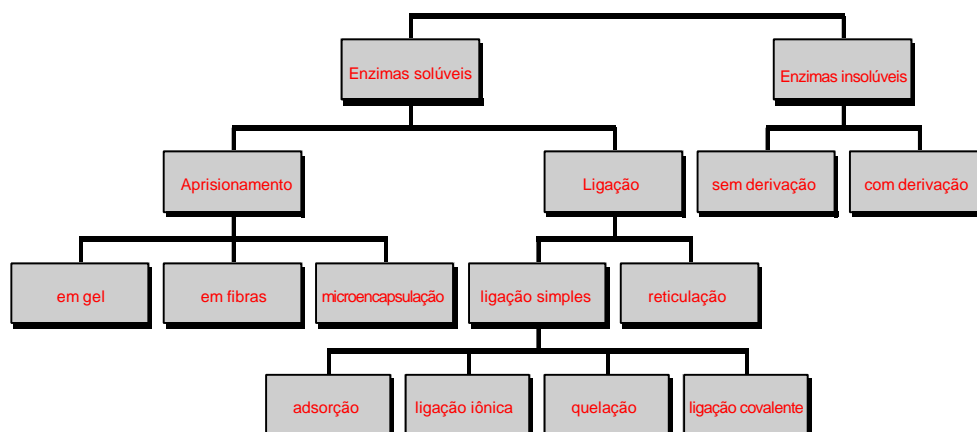


Figura 2.6. Classificação dos métodos para imobilização de enzimas

2.4.1.1. Ligação Cruzada na Ausência de Suportes (Crosslinking)

Uma preparação enzimática imobilizada pode ser obtida por ligação intra e intermolecular cruzada das moléculas de enzima na ausência de um suporte sólido. Este método é baseado na produção de agregados tridimensionais de enzimas, que são completamente insolúveis em água, por meio de reagentes bi- ou multifuncionais, que se ligam covalentemente às moléculas da enzima. O glutaraldeído tem sido o agente de ligação mais amplamente empregado, apesar de serem utilizados muitos outros reagentes multifuncionais (HARTMEIER, 1988).

Apesar dos procedimentos para a imobilização de enzimas por ligação cruzada serem de simples execução, o estabelecimento das condições para obter um agente de ligação cruzada que se ligue especificamente aos grupos funcionais da enzima não envolvidos na catálise é difícil, e são normalmente determinadas empiricamente. As condições ótimas para alcançar uma boa insolubilidade e retenção considerável da atividade enzimática dependem de um balanço de fatores como a concentração de enzima e do reagente de ligação, pH, força iônica, temperatura e tempo de reação.

A natureza das enzimas também possui influência na sua insolubilização, notadamente as proteínas ricas em L-lisina são facilmente insolubilizadas. A concentração de glutaraldeído na reação aumenta o rendimento da atividade imobilizada até um máximo, e depois diminui. A razão ótima de glutaraldeído e concentração de proteína está

normalmente na ordem de 10% (p/p) e os melhores rendimentos de atividade são geralmente obtidos com concentrações na faixa de 0,3 a 0,6% (v/v) de glutaraldeído (CHIBATA e WINGARD, 1983).

A insolubilização mais rápida de proteínas e enzimas ocorre em valores de pH normalmente perto de seus pontos isoelétricos. No entanto, algumas exceções foram observadas (JANSSEN *et al.*, 1993), por exemplo para a quimotripsina (pI 8,6), o pH ótimo é 6,2.

A reação é também dependente da temperatura e do tempo; à temperatura ambiente, o tempo necessário para a ligação cruzada é entre 1-3 horas; o gel aparece após 10-30 minutos. As temperaturas inferiores (4°C), são preferíveis para moléculas menos estáveis termicamente e a imobilização dessas enzimas requer um maior tempo (16-24 horas). O grau de insolubilização também decresce com o aumento da força iônica (CASTRO, 1985).

Apesar da ligação cruzada ser um processo relativamente simples, possui desvantagens. Uma das desvantagens das partículas produzidas desta forma é que elas são usualmente gelatinosas e pouco firmes, o que significa que as enzimas com ligação cruzada são inadequadas para reatores de leito fixo. Devido a este inconveniente, este método de imobilização têm sido largamente utilizado em conjunto com outros métodos, particularmente a adsorção. Por outro lado existe uma dificuldade para controlar a reação de ligação de modo que sejam obtidos grandes agregados enzimáticos com alta retenção da atividade (MARGOLIN, 1996). Outra desvantagem é que muitas das unidades ativas da enzima ficam ligadas dentro das partículas formadas por ligação cruzada. Especialmente quando se utilizam substratos de alta massa molecular, e se a sua concentração for baixa, o acesso do substrato aos centros ativos mais internos está limitado pelas condições desfavoráveis de difusão. Por outro lado, uma vez que a ligação cruzada envolve normalmente ligações do tipo covalente, as enzimas imobilizadas desta forma sofrem freqüentemente alterações conformacionais com conseqüente perda de atividade (CHIBATA e WINGARD, 1983; HARTMEIER, 1988).

A vantagem mais importante do método de ligação cruzada é que um reagente bi-ou multifuncional pode ser usado para preparar, num único procedimento, enzimas imobilizadas, que são quase proteínas puras (FABER, 1997).

As enzimas imobilizadas com ligação cruzada empregando glutaraldeído ganharam importância industrial na isomerização da glicose.

2.4.1.2. Métodos de Ligação em Suportes

O método de ligação em suportes, que consiste na fixação de enzimas em suportes sólidos, é a técnica de imobilização mais antiga (NELSON e GRIFFIN, 1916) e centenas de trabalhos têm sido publicados aplicando este tipo de imobilização. O método de ligação em suportes pode ser posteriormente dividido em três categorias, de acordo com o modo de ligação da enzima: adsorção física, ligação iônica e ligação covalente, os quais serão brevemente comentados a seguir.

2.4.1.2.1. Adsorção Física

A adsorção é o método mais simples de imobilização de enzima em suportes insolúveis em água. Na adsorção, as enzimas são mantidas à superfície dos suportes por forças físicas (forças de Van der Waals). No entanto, outras forças adicionais poderão estar envolvidas na interação entre o suporte e a enzima, principalmente interações hidrófobas, pontes de hidrogênio e ligações heteropolares.

A adsorção física da enzima ao suporte pode ser realizada por meio de procedimentos diversos, tais como: estático, eletrodeposição, processo reator-carga, mistura ou agitação da carga. Dessas técnicas a mais freqüentemente empregada em escala laboratorial é a mistura ou agitação da carga, consistindo na agitação da enzima juntamente com o material de suporte sob condições apropriadas e, após um período de contato, promover a separação das preparações enzimáticas insolúveis do material em solução por centrifugação ou filtração. Para fins comerciais a técnica empregada é o reator-carga (HARTMEIER, 1988; CHIBATA, 1978).

Na Figura 2.7 apresenta-se um esquema da ligação de uma enzima ao suporte pelo método da adsorção física.

As vantagens desta técnica são referentes à sua simplicidade de execução e pouca influência exercida na conformação da enzima. O uso de reagentes químicos prejudiciais às enzimas ou condições de ligação não fisiológicas, como os usados freqüentemente noutros métodos de imobilização, não são necessários neste procedimento. A desvantagem, no entanto, é a fragilidade das forças de ligação adsorptivas. As enzimas adsorvidas são

facilmente sujeitas à dessorção por flutuações de temperatura, e mais ainda por alterações no substrato e concentração iônica. Por esta razão, deve ser dada uma atenção especial na manutenção de condições constantes quando se utilizam enzimas imobilizadas por adsorção (XU *et al.*, 1995).

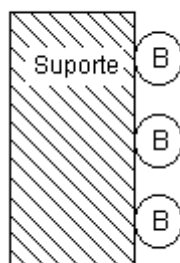


Figura 2.7. Representação esquemática da ligação de uma enzima (B) a um suporte por adsorção.

2.4.1.2.2. Ligação Iônica

A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a força da ligação da enzima ao suporte. As forças de ligação resultantes (interações iônicas) são mais fortes que no caso da adsorção física.

A ligação iônica ou heteropolar, como mostrado esquematicamente na Figura 2.8, baseia-se na atração eletrostática entre grupos positivamente carregados do material do suporte e da enzima. As proteínas das enzimas possuem grupos ácidos e básicos que, dependendo do valor de pH do meio envolvente, podem apresentar-se neutros ou, por dissociação, na forma negativamente carregada ou, por protonização, na forma positivamente carregada. Os grupos carboxila e amina são os principais responsáveis pela carga elétrica das proteínas. No entanto, considerando o tamanho da enzima, não é muito a carga de toda a molécula que tem interesse, mas sim os grupos individuais expostos na superfície da molécula. Isto explica porque, no mesmo valor de pH, algumas enzimas podem se ligar tanto a trocadores aniônicos como catiônicos (HARTMEIER, 1988).

A imobilização de enzimas por ligação iônica em suportes adequados é um processo tão simples como o de adsorção física. Para se obter preparações ionicamente ligadas basta, normalmente, agitar as partículas do suporte por algum tempo numa solução ou suspensão

da enzima, ou permitir o fluxo de uma solução aquosa de enzimas pelas partículas de suporte (ex. numa coluna). Uma das muitas razões porque as enzimas ionicamente ligadas foram as primeiras enzimas imobilizadas a serem empregadas em grande escala é a extrema simplicidade e não agressividade desse procedimento de ligação. Desde o final da década de 60 elas tem sido utilizadas na produção de L-aminoácidos a partir de misturas racêmicas de DL-aminoácidos produzidas sinteticamente (CHIBATA e WINGARD, 1983).

Ao se utilizar enzimas ionicamente ligadas deve ser observada a manutenção da força iônica correta e condições de pH de forma a prevenir a sua destruição.

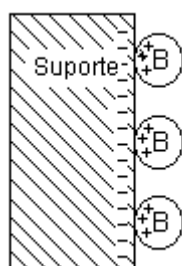


Figura 2.8. Representação esquemática da ligação iônica de uma enzima (B) a um suporte polianiónico.

2.4.1.2.3. Ligação Covalente

Numa ligação covalente os átomos são unidos por meio da partilha de pares de elétrons. Isto pode ser explorado para proporcionar uma forte associação entre duas enzimas, ou entre uma enzima e um suporte. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que noutros métodos de ligação em suportes. As reações requeridas são relativamente complicadas e não suaves. A ligação covalente é freqüentemente utilizada para imobilizar enzimas mas não sistemas celulares (HARTMEIER, 1988).

Uma desvantagem freqüentemente encontrada na imobilização por ligação covalente é que ela provoca um grande “stress” na enzima. O procedimento de imobilização necessariamente brusco conduz normalmente a alterações consideráveis na conformação, resultando numa perda significativa da atividade catalítica (BOSLEY e PEILOW, 1997).

Os grupos amina α e ϵ , bem como os grupos carboxil, sulfohidril, hidroxil, imidazol

e fenólico da enzima, podem ser utilizados como grupos funcionais para a ligação covalente. Alguns destes grupos, por exemplo, os grupos SH e ϵ -amino, podem reagir diretamente com grupos apropriados do suporte. Outros, por exemplo, grupos OH, necessitam como regra uma ativação antes que possam reagir com um grupo do suporte (HARTMEIER, 1988).

A ativação do grupo destinado à ligação é frequentemente realizada no suporte em vez de ser na enzima, reduzindo deste modo o risco da posterior perda de atividade.

A conexão entre o suporte e a enzima pode ser obtida quer por ligação direta entre os componentes ou por meio de uma ligação intercalada de comprimentos diferentes, o chamado espaçador (Figura 2.9). A molécula do espaçador proporciona um grau de mobilidade superior à enzima imobilizada, de modo que a sua atividade pode, sob certas circunstâncias, ser maior do que se estivesse diretamente unida ao suporte (HARTMEIER, 1988).

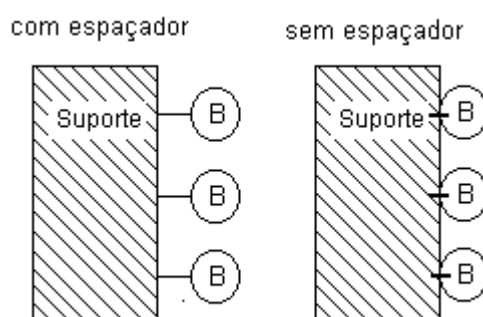


Figura 2.9. Representação esquemática da ligação covalente da enzima (B) a um suporte com e sem espaçador.

2.4.1.2.4. Encapsulamento

A enzima imobilizada pelo método do encapsulamento fica localizada dentro de uma matriz polimérica ou membrana, sendo este processo de mera retenção física da proteína. Esta imobilização pode ser classificada em encapsulamento em matriz ou em microcápsulas, como ilustrada na Figura 2.10.

Este método difere da ligação covalente e da ligação cruzada, na qual a enzima em si não se liga a uma matriz de gel ou membrana, tendo desta forma uma ampla

aplicabilidade. As condições usadas nas reações químicas de polimerização são relativamente severas, resultando na perda da atividade enzimática. Portanto, cuidados especiais devem ser tomados na seleção das condições mais adequadas para a imobilização de várias enzimas (CHIBATA e WINGARD, 1983).

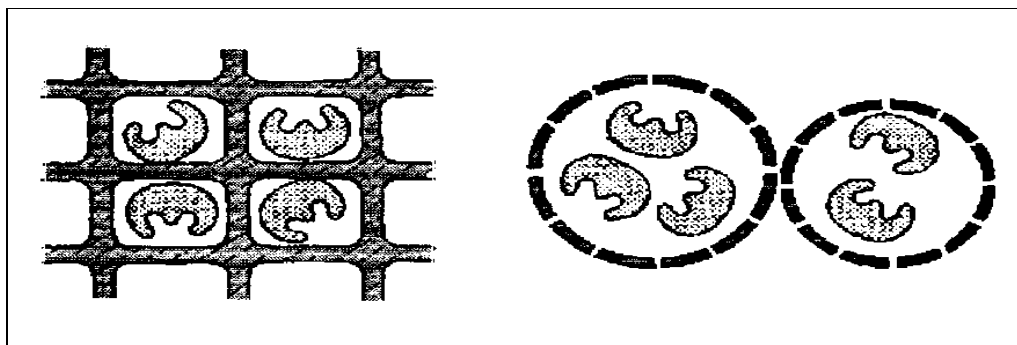


Figura 2.10. Ilustração da imobilização de enzimas por encapsulamento

No encapsulamento em matriz, a enzima é aprisionada nos espaços intersticiais de uma ligação cruzada de um polímero insolúvel em água. Tanto polímeros sintéticos (poliarilamida, polivinilálcool, entre outros), como polímeros naturais (amido, celulose e quitina), têm sido usados para imobilizar enzimas empregando esta técnica (CHIBATA, 1978).

O microencapsulamento envolve o confinamento da enzima em membranas poliméricas semi-permeáveis. A preparação da microcápsula da enzima requer condições extremamente bem controladas, e os procedimentos para microencapsulação de enzimas podem ser classificados como (CHIBATA e WINGARD, 1983):

- Método de polimerização interfacial: Neste procedimento, a enzima fica confinada em membranas poliméricas semi-permeáveis. É um sistema limitado para substratos com baixa massa molecular, pois este tem que atravessar a membrana para acessar a enzima e há possibilidade de inativação da enzima durante a imobilização e de incorporação na parede da membrana.
- Secagem a líquido: Neste processo, o polímero é dissolvido em solvente orgânico imiscível em água que apresenta um ponto de ebulição menor do que o da água. Uma solução aquosa de enzima é dispersa na fase orgânica para formar uma

primeira emulsão do tipo óleo em água. A emulsão contendo microgotas aquosas é então dispersa em uma fase aquosa contendo substâncias coloidais protetoras, tais como: gelatina e surfactantes, e uma segunda emulsão é então preparada. O solvente orgânico é removido por secagem a vácuo. Uma membrana polimérica é assim produzida para fornecer microencapsulamento de enzimas.

- Separação de fase: Um método de purificação para o polímero envolve a dissolução do polímero em um solvente orgânico e reprecipitado pela adição de outro solvente orgânico que seja miscível com o primeiro, mas que não dissolva o polímero.

2.4.1.2.5. Combinação de Métodos

Apesar de serem aplicadas um grande número de técnicas de imobilização, sabe-se que nenhum procedimento em particular é considerado o método ideal universal para a imobilização enzimática, devido à grande variedade de composições e características químicas das enzimas e às propriedades dos seus substratos e produtos. Desse modo, cada método de imobilização possui limitações específicas, e para uma aplicação particular torna-se necessário encontrar um procedimento de imobilização simples e econômico e que proporcione uma enzima imobilizada com uma boa retenção da atividade e estabilidade operacional adequada.

Além dos métodos básicos de imobilização descritos anteriormente, a literatura contém numerosas combinações e modificações de métodos. A meta principal na combinação de métodos é evitar todas as desvantagens do método individual, explorando as suas vantagens. A Tabela 2.6 sumariza algumas das vantagens e desvantagens relativas às diferentes técnicas de imobilização enzimática. Quase sempre o objetivo é a produção de enzimas imobilizadas com a maior atividade específica e estabilidade possível (KENNEDY e WHITE, 1985; ZANIN, 1989).

Uma combinação típica é a absorção da enzima por um gel, seguido de técnica de ligação cruzada usando agentes bifuncionais (QUIOCHO, 1976). Entre esses, os melhores resultados são obtidos usando glutaraldeído. Outra classe de agente bifuncional, são as alquilamidas, amplamente empregadas nos estudos de interação proteína-proteína.

Tabela 2.6. Comparação dos atributos de diferentes técnicas de imobilização

<i>Características</i>	<i>Ligação Cruzada</i>	<i>Adsorção Física</i>	<i>Ligação iônica</i>	<i>Ligação covalente</i>
Preparação	Intermediária	Simples	Simples	Difícil
Força de ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Forte
Atividade enzimática	Baixa	Intermediária	Alta	Alta
Regeneração do suporte	Impossível	Possível	Possível	Rara
Custos de imobilização	Intermediário	Baixos	Baixos	Altos
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediária	Alta
Aplicabilidade geral	Não	Sim	Sim	Não
Proteção da enzima do ataque microbiano	Alguma	Não	Não	Não

O produto resultante, possui a vantagem que as moléculas enzimáticas são ligadas de forma mais estável do que se fossem só adsorvidas. A reduzida difusão do substrato nas enzimas, como a encontrada normalmente nas enzimas com ligação cruzada, raramente se verifica com este método. No entanto, mantém-se a desvantagem de que apenas uma pequena quantidade de enzima - e conseqüentemente pouca atividade - é ligada por massa de suporte.

2.4.2. Fatores que Interferem na Imobilização da Enzima

Para o desenvolvimento de qualquer técnica de imobilização, deve-se levar em consideração os seguintes fatores: a massa da enzima, o comportamento cinético e a difusão, a estabilidade e configuração do reator.

O comportamento de uma enzima imobilizada pode ser muito distinto do seu comportamento em solução. Dada a variedade de enzimas, reações, matrizes sólidas (suportes) e tipos de imobilização, é de se esperar resultados muitas vezes contraditórios (ZANIN, 1989).

Assumindo que a enzima esteja uniformemente distribuída no suporte e supondo sistema isotrópico, as mudanças de comportamento enzimático associadas à imobilização num meio heterogêneo podem ser atribuídas a dois fatores: 1) mudanças na molécula da enzima ou na sua vizinhança imediata (resultantes da ligação enzima-suporte); 2) alterações locais no ambiente enzimático (ambiente heterogêneo), no qual as concentrações de

substrato, produto, ativadores e inibidores podem ser diferentes daquelas presentes no seio do líquido (“bulk”), onde a reação enzimática é monitorada (HARTMEIER, 1988).

2.4.2.1. Mudanças Conformacionais e Efeitos Estéricos

Na maioria dos casos, a atividade da enzima imobilizada é inferior à da enzima em solução. O decréscimo de atividade devido à imobilização é freqüentemente atribuído a mudanças conformacionais na estrutura da enzima ou a impedimentos estéricos na vizinhança imediata da molécula da enzima (ENGASSER e HORVATH, 1976).

Quando uma enzima é adsorvida ou covalentemente ligada a um suporte, a interação com este último vai produzir modificações conformacionais na enzima. Assim, estiramento e torções na molécula podem alterar a estrutura tridimensional do seu sítio ativo.

Os impedimentos estéricos estão associados a bloqueios da matriz suporte, que tornam certas partes da molécula enzimática inacessíveis ao substrato e às outras espécies.

Se este efeito pode ser prejudicial no caso do substrato, pode ser benéfico no caso de inibidores. Para reduzir o bloqueio de sítios ativos que acompanha o processo de imobilização, um espaçador é muitas vezes utilizado, de modo a manter uma certa distância entre enzima e suporte.

Propriedades do suporte como a sua natureza hidrofóbica ou hidrofílica, a constante dielétrica do meio e a presença de cargas elétricas fixas podem alterar o modo de ação de um biocatalisador. Certamente, esses efeitos não só afetam a atividade enzimática, como também a estabilidade e seletividade da enzima (CHIBATA e WINGARD, 1983; LASKIN, 1985).

2.4.2.2. Efeitos de Partição e Resistências Difusionais

Para reagir o substrato deve difundir do seio líquido e atingir os sítios ativos. Os produtos devem difundir de volta à solução. Este processo de transporte de espécies envolve difusão molecular e convectiva. Como as difusividades em géis e soluções aquosas são pequenas e como a atividade catalítica das enzimas é elevada, freqüentemente ocorrem resistências difusionais de apreciável magnitude. Em decorrência, gradientes de

concentração se estabelecem nas vizinhanças da enzima.

Os efeitos de partição provocam perfis de concentração do tipo degrau, e os efeitos de difusão provocam perfis que apresentam variação de concentração. A magnitude dos efeitos difusionais depende do tamanho molecular. Moléculas maiores difundem mais lentamente (menor difusividade), conforme indicam os valores mostrados na Tabela 2.7 (ENGASSER e HORVATH, 1976). A difusividade em géis e agregados microbianos tende a ser menor que a difusividade da espécie na água, como indicam os valores apresentados na Tabela 2.8 (ZANIN, 1989).

Tabela 2.7. Coeficientes de difusão em água a 20°C

<i>Espécie</i>	<i>Massa molar</i>	<i>Coeficiente de difusão (10⁶cm²/s)</i>
Glicose	180	6,7
Sacarose	342	4,5
Inulina	5200	2,3
Ribonuclease	13683	1,1
Soro albumina	66500	0,6
Fibrinogênio	330000	0,2
Miosina	440000	0,105
Ácido desoxiribonucleico	6000000	0,013

Fonte: ENGASSER e HORVATH (1976).

Tabela 2.8. Coeficientes de difusão efetiva em aglomerados microbianos e suportes diversos.

<i>Espécie</i>	<i>Meio ou matriz-suporte</i>	<i>Coeficiente de difusão (10⁶ cm²/s)</i>
Oxigênio	Aglomerados microbianos	2,1 – 20,0
Glicose	Aglomerados microbianos	0,48 – 6,0
Amônia	Aglomerados microbianos	13,0
Nitrato	Aglomerados microbianos	14,0
Glicose	Poliacrilamida	1,2
Glicose	Ágar	0,5
Sacarose	Ágar	6,7
Etanol	Poliacrilamida	0,15

Fonte: ZANIN (1989).

Os valores reproduzidos na Tabela 2.8 servem de indicação da faixa de resultados experimentais de difusividades efetivas, e devem ser vistos com a devida prudência, pois as determinações experimentais e, em particular, as estruturas dos meios e suportes diferem de um estudo para outro.

2.4.3. Morfologia e Configuração do Suporte

A seleção do suporte para a imobilização de enzimas depende de várias características que são importantes na aplicação de processos industriais, entre as quais destacam-se: resistência mecânica e microbiana; estabilidade térmica; funcionalidade química; caráter hidrofóbico ou hidrofílico; facilidade de regeneração e custo (MESSING, 1975). Além disso, a morfologia do suporte é extremamente importante principalmente a superfície de contato e porosidade, fatores esses que, afetam a atuação da enzima. De acordo com os fatores mencionados acima, os suportes podem ser classificados em: suportes não porosos e suportes porosos: (porosidade controlada, porosidade distribuída, estrutura de gel). Além da morfologia básica, é possível usar o mesmo suporte em diferentes configurações, como fibra e membrana.

De acordo com a sua composição, os suportes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos. Os inorgânicos parecem preencher melhor os requisitos necessários para a sua utilização, principalmente para fins industriais, devido às suas propriedades físicas. Oferecem algumas vantagens em relação aos suportes orgânicos, como: estabilidade térmica, alta rigidez mecânica, resistência a solventes orgânicos e ataque microbiano, fácil manuseamento, armazenamento excelente e regeneração simples por um processo de pirólise. Além disso, os materiais inorgânicos não alteram a sua estrutura em grandes faixas de pH, pressão e temperatura (MESSING, 1975).

Embora seja sugerido que em processos industriais os suportes inorgânicos possuam vantagens sobre os orgânicos, muitas das enzimas imobilizadas comercialmente disponíveis são obtidas com matrizes orgânicas. A razão para este fato é que existe uma grande quantidade de grupos funcionais reativos nestes suportes. Os suportes orgânicos são classificados quer como macromoléculas naturais, polímeros, ou polímeros sintéticos, e como possuindo características hidrofílicas e hidrófobas. Entre os polímeros naturais podem ser destacados:

- dextrano: polissacarídeo linear, solúvel em água. Os dextransos com ligação intermolecular cruzada necessitam ser ativados para utilização como suportes de enzimas imobilizadas.
- quitina e quitosana: polissacarídeos contendo grupos amina, e que tem sido utilizados como suportes na tentativa de desenvolver matrizes econômicas.

2.4.3.1. Suportes Poliméricos Naturais

Entre os suportes poliméricos naturais, especial atenção tem sido dedicada ao uso de quitina, que tem na natureza função estrutural (principal componente do exoesqueleto de crustáceos) sendo também dotada de grande estabilidade física e resistência ao ataque microbiano.

Quitina é um polímero não ramificado, formado por unidades de n-acetil-D-glicosina, unidas por meio de ligação β 1-4, formando cadeias de várias centenas de unidades. Cerca de 5 entre 6 unidades do polímero apresentam seu grupo aminoacetilado. A microscopia eletrônica revela para este polímero uma estrutura fibrosa, que pode apresentar-se altamente organizada ou então emaranhada, dependendo de sua origem. Apresenta na sua composição polimérica, grupos NH_2 disponíveis, sugerindo ser adequada à imobilização enzimática por ligação covalente. É um material muito estável, relativamente inerte e hidrofílico. Além disso, deve ser destacado que a quitina pode ser facilmente obtida de fontes naturais (por exemplo, rejeitos da indústria pesqueira) o que torna o uso desse suporte bastante atrativo em termos econômicos (FELSE e PANDA, 1999).

Pela deacetilação da quitina, obtém-se a quitosana [(1-4)-2-amino-deoxi- β -glucana]. As estruturas químicas desses dois compostos são mostradas na Figura 2.11 (JUANG *et al.*, 1997), verificando-se que a quitosana é uma substância policatiônica.

A quitosana tem a capacidade de se ligar significativamente à gordura, agindo como uma “esponja de gordura” no trato digestivo, sendo considerada um extraordinário bloqueador e eliminador de gorduras. A quitosana tem a capacidade de “captura de gorduras” nos alimentos antes que seja metabolizada, prevenindo desse modo a sua absorção intestinal e subsequente armazenagem no organismo. A quitosana não somente atrai ou inibe gorduras, como também oferece uma série de outros benefícios fisiológicos

atraentes que possibilita ter condições ótimas de saúde e vida longa, apresentando muitas características desejáveis quando utilizada, tais como: hidroflicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e antibactericida, e é notável a sua afinidade pelas proteínas (FELSE e PANDA, 1999). Suas principais funções no campo farmacêutico são: 1) age como um antiácido; 2) inibe a formação de cárie na placa dos dentes; 3) ajuda a controlar a pressão sanguínea; 4) absorve e inibe as gorduras/ promove perda de peso; 5) reduz os níveis de ácido úrico no sangue; 6) inibe o desenvolvimento de LDL colesterol e HDL colesterol; 7) promove a cura de úlceras/ lesões; 8) aumenta o cálcio/ fortalece os ossos (CRESTINI *et al.*, 1996).

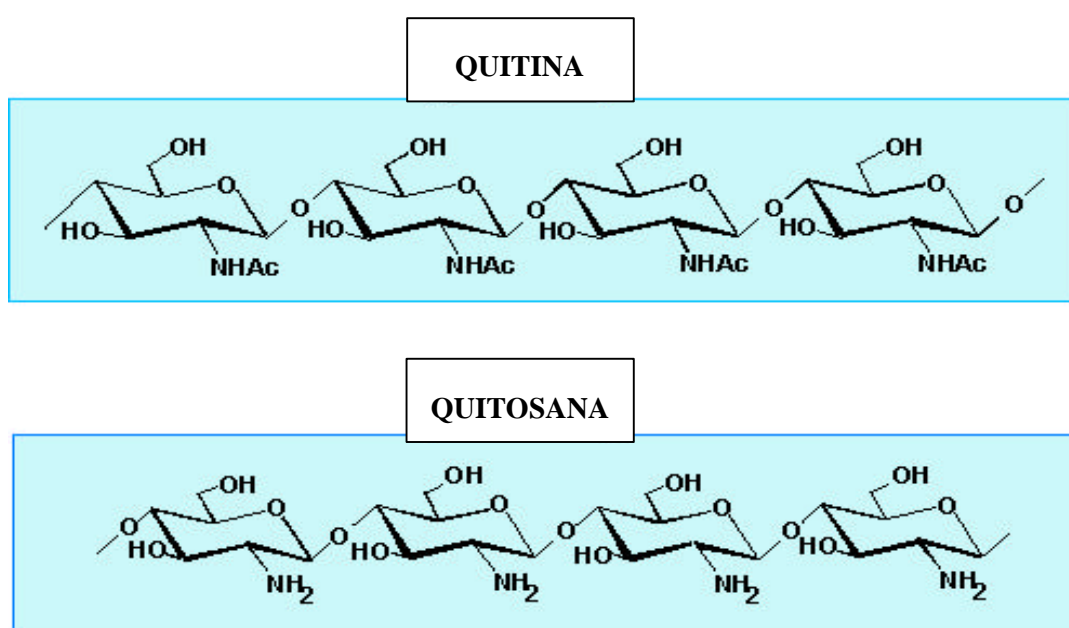


Figura 2.11. Comparação das estruturas da quitina e quitosana

Além disso, a quitosana apresenta um potencial ilimitado para outros setores industriais, conforme mostrado na Tabela 2.9, na qual observa-se a sua promissora atuação no campo da biotecnologia

As vantagens do uso de quitosana como suporte em imobilização são relativamente consideráveis, tais como: versatilidade nas formas que estão disponíveis (pó, gel, fibra e membrana); escassa biodegradabilidade; custo baixo; fácil manuseio; alta afinidade pelas proteínas e acima de tudo, não é tóxico (FELSE e PANDA, 1999).

Tabela 2.9. Aplicações da quitosana

<i>Área</i>	<i>Aplicação</i>
Biotecnologia	Imobilização de enzima Separação de proteína Recuperação de célula Cromatografia Imobilização de célula
Membrana	Controle de permeabilidade Osmose reversa
Tratamento de águas residuais	Remoção de íons metálicos Floculante/ Coagulante: proteína, tinta, aminoácidos

2.5. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

A seleção de um procedimento de imobilização envolve a escolha do suporte e da ligação da enzima ao suporte, sendo muitos os trabalhos realizados visando o estabelecimento de metodologias de imobilização de lipases pancreática e microbiana em diferentes suportes (RESLOW *et al.*, 1988; MALCATA *et al.*, 1990; BALCÃO *et al.*, 1996).

Tradicionalmente, o suporte tem sido considerado como um material inerte com pouca ou nenhuma interferência no comportamento cinético da enzima (RESLOW *et al.*, 1988). Entretanto, estudos comparativos sugerem que influências marcantes são observadas entre lipase imobilizada em diferentes suportes (NORIN *et al.*, 1988). Portanto, a imobilização de lipases em suportes adequados se constitui numa área de interesse e em constante desenvolvimento.

Suportes com alta resistência mecânica são desejáveis particularmente em sistemas com agitação. A presença de solventes pode requerer suportes de materiais com alta resistência química. Vários microrganismos crescem em muitos substratos catalisados por lipase, portanto existe também a necessidade de suportes de resistência microbiana. Os suportes permitem a utilização efetiva da enzima por ter moléculas de enzima acessíveis ao

substrato. Considerando que a perda de atividade é uma questão de tempo, o suporte deve ser também facilmente regenerado com enzimas ativas. Suportes contribuem para a distribuição do substrato disponível à enzima em meio não-aquoso. A presença de uma pequena quantidade de água permite a existência de íons de ácido carboxílico livre. Uma resina de troca iônica tende a atrair ácidos carboxílicos devido às suas cargas positivas, resultando em uma alta concentração de substrato disponível para a enzima. Isto promove altas taxas de esterificação (> 95%) observada com lipases imobilizadas em resinas de troca iônicas (PEREIRA *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1997b).

O aumento da estabilidade é observada com algumas preparações de lipases quando imobilizadas, possivelmente devido à capacidade do suporte em reter justamente a quantidade correta de água para a enzima se manter ativa sem causar flexibilidade, a qual proporciona a desnaturação. GRAY *et al.* (1990), testaram vários suportes para a imobilização da lipase de *C. cylindracea* e encontraram atividades, em alguns casos, até 1,5 vezes superiores à da enzima livre. A atividade da lipase imobilizada, especialmente em suportes hidrofóbicos, tais como polietileno, tem sido reportada ser mais alta do que na lipase livre.

Suportes para a imobilização de lipases podem afetar também a quantidade de água nas proximidades da enzima e a migração de reagentes e/ou produtos na mistura reacional.

A atividade da lipase *C. cylindracea* imobilizada covalentemente ao suporte diminui quando a preparação é levada à secagem, enfatizando a importância da água fortemente ligada à enzima imobilizada. A imobilização em suportes hidrofílicos geralmente leva à perda da atividade da lipase, tendo em vista que ocorre uma mudança conformacional da enzima para uma forma de atividade reduzida. Estes suportes podem também reduzir a solubilidade do substrato hidrofóbico em regiões hidrofílicas, limitando assim o acesso do substrato ao centro ativo. Em muitos casos, a matriz-suporte pode impor um efeito hidratante esteárico, resultando na rigidez da molécula da enzima (MACRAE, 1983).

A capacidade de adsorção da água ao suporte é caracterizada pela razão entre a quantidade de água no suporte e quantidade de água no solvente sob condições padrões (Aq). Esta não é uma constante de partição real considerando que é dependente da quantidade relativa de suporte e do solvente, com pequena dependência do tipo de solvente (RESLOW *et al.*, 1988).

Um suporte com alto valor de Aq (> 1,0) é hidrofílico e assim pode potencialmente

privar a enzima de sua hidratação essencial. A atividade da enzima é geralmente mais alta com suportes hidrofóbicos, tais como Celite ($A_q = 0,36$) e Bonopore ($A_q = 0,48$). Mesmo com a adição da água na preparação, as enzimas em suportes com alto valor de A_q ($>2,5$) não desempenham tão bem como nos suportes de valores mais baixos. Isto sugere que outras interações existem além da migração da água entre o suporte e a enzima (RESLOW *et al.*, 1988; MATTIASSON e ADLERCREUTZ, 1991).

Quando a preparação de lipase imobilizada é empregada em solventes orgânicos, existem pelo menos três tipos de meio ambiente de características bem distintas, conforme mostrado na Figura 2.12: i) a fase orgânica, constituída pelo solvente; ii) camada protéica sobre o suporte, e iii) o material do suporte propriamente dito. Em termos de volume, as fases constituídas pelo suporte e solvente predominam, enquanto uma parte relativamente menor constituída da fase protéica forma o meio ambiente do catalisador (MATTIASSON e ADLERCREUTZ, 1991).

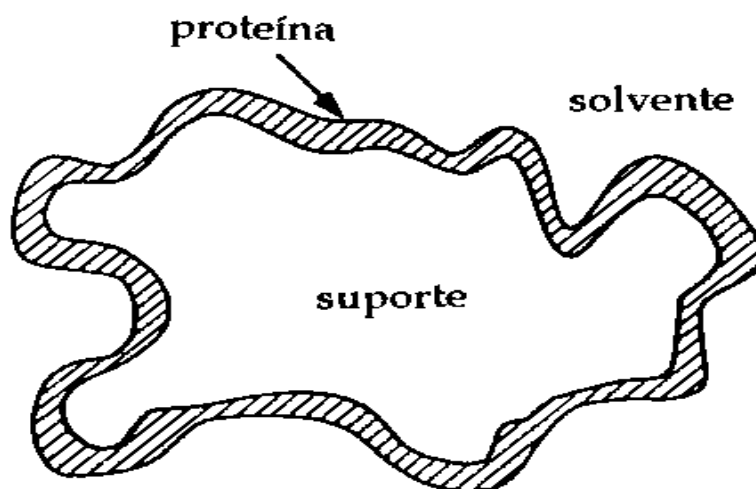


Figura 2.12. Representação esquemática da enzima adsorvida em um suporte sólido e usada em solvente orgânico (MATTIASSON e ADLERCREUTZ, 1991).

Os suportes mais comumente empregados na imobilização de lipases estão listados na Tabela 2.10 juntamente com o método de imobilização envolvido. Na Tabela 2.11 apresenta-se as propriedades da lipase microbiana (*Candida rugosa*) na sua forma livre e após imobilização em dois diferentes tipos de suporte.

Tabela 2.10. Suportes empregados na imobilização de lipases com seus respectivos métodos de imobilização e fonte enzimática

<i>Suporte</i>	<i>Tratamento do Suporte</i>	<i>Lipase</i>	<i>Método de Imobilização</i>	<i>Condições de imobilização</i>	<i>Reações testadas</i>	<i>Referências</i>
Celite, celulose, etilelulose, sílica gel, Kiellsegur, argila, alumina, Accurel, Celogard	Os suportes foram umedecidos em etanol	Lipases microbianas (Enzenco)	Adsorção	Contato direto do suporte com solução de lipase em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, temperatura ambiente. Agitação por 1 hora, filtração a vácuo.	Hidrólise do azeite de oliva	BRADY <i>et al.</i> , 1988
Agarose, quitina, quitosana, sefarose, polivinilclorado	Diferentes tratamentos dependendo do suporte	<i>Candida rugosa</i> (Sigma)	Ligação covalente ou ligação cruzada	Contato direto do suporte ativado com solução de lipase em tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, temperatura ambiente. Agitação por 1 hora, filtração a vácuo.	Hidrólise da tributirina	SHAW <i>et al.</i> , 1990
Celulose cristalina	Adição de celulose em uma solução de HCl contendo titânio dessecado, sob vácuo. Depois de seco, o suporte foi lavado com solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.	<i>Candida lipase 3</i> (Biocatalysts). Lipase de <i>Mucor miehei</i> (GIST Brocades)	Ligação cruzada	Contato inicial do suporte com solução de lipase em tampão acetato 0,2M, pH 5,0, 4° C/ 16 horas, seguida da adição de solução aquosa de glutaraldeído 2,5% p/v. Agitação contínua por 2 horas.	Esterificação do mentol com ácido butírico	GRAY <i>et al.</i> , 1990
Poliuretano	Sem tratamento prévio	<i>Candida cylindracea</i> (Sigma)	Adsorção	Lipase em pó foi misturada com o suporte e a seguir adicionada à solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. A mistura foi homogeneizada e depois de 10 minutos, os géis formados foram cortados em pedaços de 3 mm x 3 mm x 3 mm	Esterificação do butanol com ácido butírico em solventes orgânicos	DIAS <i>et al.</i> , 1991
Alginato de cálcio	Sem tratamento prévio	<i>Candida cylindracea</i> (Sigma)	Encapsulamento	Esferas de alginato de cálcio foram obtidas a partir de uma solução de alginato de sódio a 2% (contendo lipase em uma solução de cloreto de cálcio (0,1 M). O derivado foi empregado após 24 horas de endurecimento.	Esterificação do butanol com ácido butírico em solvente orgânico	HERTZBERG <i>et al.</i> , 1991
Zeólitas	Sem tratamento prévio	<i>Candida cylindracea</i> (Sigma)	Adsorção	Contato direto do suporte com solução aquosa de lipase (2 h), seguida de adição de acetona (4,6 ml/min), agitação 30 min.	Esterificação e hidrólise	LIE e MOLIN, 1991
Celite Duolite	Lavagem com tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, seguida de secagem	<i>Candida cylindracea</i> <i>Aspergillus niger</i> (Biocatalysts) <i>Pseudomonas sp.</i> (Amano)	Adsorção em meio aquoso e orgânico	Solução enzimática em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 foi misturada com suporte, por 2 horas à temperatura ambiente, filtração e secagem por liofilização. Suporte foi suspenso em hexano, sendo em seguida adicionado enzima em pó. Após 5 minutos, o hexano foi decantado e o derivado imobilizado seco por sucção.	Esterificação do metanol, etanol e pentanol com ácido láurico	MUSTRANTA <i>et al.</i> , 1993

Tabela 2.10. Suportes empregados na imobilização de lipases com seus respectivos métodos de imobilização e fonte enzimática (continuação)

Suporte	Tratamento do Suporte	Lipase	Método de Imobilização	Condições de imobilização	Reações testadas	Referência
Quitosana	Ativação do suporte com solução alcoólica de amido succinil, seguida do tratamento com hidroxisuccirâmida com dicitio-hexilcarbamide ou com hexametiletiamina (HEMDA)	<i>P. fluorescens</i> (Amano)	Ligação covalente	Suporte ativado foi suspenso em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, e em seguida a quantidade requerida de lipase em pó foi adicionada, agitada por 18 horas a 4° C. O derivado imobilizado foi recuperado por centrifugação 6000 g, depois de adição de NaBH ₄ para redução dos grupos ativos.	Hidrólise do p-nitrofenil laurato (pNPL)	ITOYAMA <i>et al.</i> , 1994
Duolite ES 562 e ES 568	As resinas foram suspensas em água e pH ajustado para 6,0 com adição de NaOH 4N. As partículas foram recuperadas por filtração, secagem em estufa a vácuo a 70°C	<i>Rhizomucor miehi</i> (Novo Nordisk)	Adsorção	Contato direto do suporte pré-tratado com solução aquosa da enzima. Agitação mecânica (tempo máximo de 6 horas, à temperatura ambiente), filtração e secagem.	Interesterificação de gorduras	ISON <i>et al.</i> , 1994
Metilacrilato divinilbenzeno	-	<i>Candida rugosa</i> (Sigma)	Adsorção	Suporte foi suspenso em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 (2 horas). O excesso do tampão fosfato foi decantado e uma solução aquosa de lipase foi adicionada (agitação). Filtração e lavagem com tampão fosfato .	Hidrólise	XU <i>et al.</i> , 1995
Polipropileno	Umedecimento do suporte com etanol	<i>Candida rugosa</i> (Mieto Sangyo)	Adsorção	Contato direto do suporte umedecido com solução enzimática em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 (tempo de 90 minutos e temperatura ambiente) e separação por filtração.	Hidrólise de gorduras de origem animal	VIRTO <i>et al.</i> , 1995
Polipropileno de alta densidade ESP2-2	Retirada do ar entre os poros, pela adição de acetona, seguida por uma intensa lavagem com água deionizada	Lipozyme 10.000 (Novo Nordisk)	Adsorção	Contato estático do suporte com solução aquosa enzimática a 4°C por 24 horas. Lavagem do derivado com água.	Esterificação do octanol com ácido oléico, em ausência de solvente	YONG e AL-DURI, 1996
Crisolita	Lavagem em água corrente e sonificação (25 KHZ por 30 min)	Lipase pancreática <i>Candida cylindracea</i> (Sigma)	Adsorção	Contato direto do suporte com a solução aquosa enzimática 12 horas, 25°C, agitação.	Esterificação de diversos álcoois e ácidos graxos.	LIMA <i>et al.</i> , 1996
Resinas poliméricas hidrofóbicas foto-reticulante	Mistura do suporte com etil eterbenzólico e benzeno, seguida de aquecimento até 60°C	<i>Pseudomonas sp</i> (Amano)	Encapsulamento	O suporte embebido no solvente foi misturado com lipase em forma de pó, sendo obtida uma preparação gelatinosa por exposição à radiação ultravioleta por 10 minutos.	Esterificação do álcool benzílico com ácido láurico	FUKUNAGA <i>et al.</i> , 1996

Tabela 2.10. Suportes empregados na imobilização de lipases com seus respectivos métodos de imobilização e fonte enzimática (continuação)

Suporte	Tratamento do Suporte	Lipase	Método de Imobilização	Condições de Imobilização	Reações Testadas	Referência
Duolite A 568 Amberlite (IRC 50)	Suportes foram lavados com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e estocadas a 10°C, algumas horas antes do início do procedimento de imobilização.	<i>Candida rugosa</i> (Meito Sangyo)	Adsorção	A imobilização foi realizada pela circulação contínua da solução (32 ml/ min) enzimática numa coluna contendo suporte úmido, à temperatura ambiente. Após completa adsorção, os derivados imobilizados de lipase foram lavados com tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 e filtrados a vácuo.	Esterificação do colesterol com ácido oléico	JONZO <i>et al.</i> , 1997
Látex de poliestireno (não poroso) Accurel EP400 (poroso)	Sem tratamento prévio	<i>Candida rugosa</i> OF 360 (Unilever Research Laboratory)	Adsorção	Embebimento dos suportes com etanol, seguido da adição de solução aquosa de enzima por 4 horas a 25°C em frascos agitados.	Hidrólise do óleo de girassol	MURRAY <i>et al.</i> , 1997
Akrilex C 100	Ativação do suporte com n-ciclohexil-n-morfolino-etilcarbodiimida p-tolueno sulfonado dissolvido em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0.	Lipase do pâncreas de porco (Preparação experimental)	Ligação covalente	O suporte ativado foi misturado com solução enzimática e a suspensão incubada por 24 horas a 4°C. O gel foi filtrado e lavado com tampão fosfato 0,05 M, pH 6,8.	Hidrólise do azeite de oliva	BAGI <i>et al.</i> , 1997
Casca de arroz	-	<i>Candida cylindraceae</i> OF (Meito Sangyo)	Adsorção	Não foi descrito.	Esterificação butanol e ácido oléico	JAMIL e OMAR, 1998
Celite 535	-	<i>Trichosporon fermentans</i> (preparação experimental)	Adsorção	Suporte foi suspenso em hexano, seguido da adição da lipase em pó. Recuperação por decantação seguido de liofilização	Síntese de ésteres terpenos	NAKAGAWA <i>et al.</i> , 1998
Argila, celite, carboximetilcelulose dietilfenilamino	-	Lipase <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Candida rugosa</i> (Amano)	Adsorção	Contato direto do suporte com a solução enzimática (tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2), à temperatura ambiente, seguido de uma precipitação com acetona resfriada.	Interesterificação de tributira	LEE e AKOH, 1998
Celite	Lavagem com água seguida de secagem	Lipase pancreática de suíno (Sigma)	Adsorção em meio orgânico	Contato direto do suporte com solução aquosa da enzima seguida da precipitação e lavagem com solventes orgânicos (acetona ou hexano).	Esterificação do butanol e ácido butírico em heptano	CASTRO <i>et al.</i> , 1999
Sílica de porosidade controlada	Silanização do suporte com α -amino seguida da ativação com glutaraldeído	<i>Candida rugosa</i> (Sigma)	Ligação covalente	Contato do suporte com solução aquosa de lipase, seguida de precipitação com hexano (28 horas., temperatura ambiente).	Esterificação do butanol com ácido butírico em heptano	SOARES <i>et al.</i> , 1999
Copolímero de estireno benzeno (STV-DVB)	Sem tratamento prévio	<i>Candida rugosa</i> (Sigma)	Adsorção em meio orgânico	Adição de heptano ao suporte (100 rpm por 2 h) seguida da adição de enzima em forma de pó (2h/ 100 rpm), temperatura ambiente.	Esterificação do butanol com ácido butírico em heptano	OLIVEIRA, 1999

Tabela 2.11. Propriedades catalíticas da lipase microbiana (*Candida rugosa*) antes e após imobilização em copolímero de estireno-divinilbenzeno (STY-DVB) e sílica de porosidade controlada (SPC).

<i>Características</i>	<i>Lipase livre</i>	<i>Lipase imobilizada em STY-DVB</i>	<i>Lipase imobilizada em SPC</i>
Rendimento de imobilização	-	42 %	18 %
Atividade da enzima	1400 U/mg sólido	110 U/mg suporte seco	51 U/mg suporte seco
Teor de água	5 %	5-10 %	5 %
pH ótimo	8,0	7,4	7,5
Temperatura ótima	40°C	50°C	50°C
Constante de inativação térmica a 50°C	nd	0,03 h ⁻¹	0,26 h ⁻¹
Estabilidade operacional (hidrólise, t _{1/2} a 37°C)	nd	instável	21,4 horas
Estabilidade operacional (esterificação, t _{1/2} a 37°C)	nd	620 horas	32 horas
Referência	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1999		SOARES <i>et al.</i> , 1999

nd: não determinado

Conforme pode ser observado na Tabela 2.10, a imobilização por adsorção física é talvez o procedimento mais empregado na imobilização de lipase. Esta metodologia tem sido aplicada com sucesso para a imobilização de lipases pelo uso de reatores de membranas ou colunas com enchimento de fibras e pó.

A adsorção da lipase em membranas tem sido realizada passando uma solução tamponada com lipase através da membrana ou sobre a superfície da membrana antes de iniciar a reação, bem como pelo contato contínuo da membrana com a solução de lipase. A adsorção da lipase pode ser efetuada em meio aquoso ou por imersão da membrana hidrofóbica em ácidos graxos ou óleo antes de sua exposição com a solução de lipase livre (MALCATA *et al.*, 1990).

Variações nesses procedimentos incluem imobilização por precipitação da lipase numa solução tampão com acetona resfriada, forçando desta maneira a adsorção da lipase na superfície das partículas do suporte, seguido de uma secagem a vácuo. As lipases também têm sido imobilizadas pela dispersão de uma solução tamponada com lipase sobre o suporte a pressão reduzida de vapor.

São geralmente adotados procedimentos experimentais similares para a adsorção física da lipase em suportes hidrofóbicos ou hidrofílicos. Pequenas variações incluem a

suspensão do suporte em mistura de água/ álcool, lavagem com água e tampão em uma coluna empacotada e finalmente percolação da solução de lipase através de uma coluna.

Neste trabalho utilizou-se suportes orgânicos de natureza polimérica, para a imobilização de lipase pancreática e microbiana por adsorção e ligação covalente. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles apresentados na Tabela 2.11.

2.6. APLICAÇÕES POTENCIAIS DE LIPASES

A versatilidade das lipases tem sido explorada tanto para substituir processos existentes ou para produzir uma série de produtos originalmente considerados como praticamente inviáveis de serem obtidos por via química convencional. A Tabela 2.12 apresenta de uma forma resumida as principais aplicações das lipases em meios aquosos e orgânicos.

A reação típica catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise de éster. Esta conversão enzimática tem sido usada, por exemplo, na síntese de triglicerídeos de cadeia média, a partir da hidrólise de óleos vegetais. O processo enzimático não somente reduz os requerimentos energéticos como também previne a decomposição de alguns ácidos graxos. A hidrólise seletiva da gordura do leite é um outro exemplo potencial de aplicação de lipases. Neste caso, a lipase é responsável pela formação do aroma distinto no preparo de queijos do tipo cheddar e para produzir substitutos de manteiga, aroma de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos (BALCÃO e MALCATA, 1998).

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres se apresenta como uma vertente bastante promissora, conforme atestam os processos em fase de implantação industrial (BALCÃO *et al.*, 1996).

Inúmeros ésteres são considerados de grande importância na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como: triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem (HARWOOD, 1989).

Tabela 2.12. Aplicações potenciais das lipases

<i>Aplicação</i>	<i>Comentários</i>	<i>Referência</i>
<p>Meio aquoso</p> <ul style="list-style-type: none"> - Modificação da composição triglicéridica de óleos e gorduras - Hidrólise de triacilgliceróis 	<p>Usado predominantemente para valorizar óleos de baixo custo, pela substituição regioselectiva de resíduos de ácidos graxos em meio aquoso, visando a obtenção de equivalentes de manteiga de cacau. Estudos estão sendo realizados, principalmente, com a fração intermediária do óleo de palma e com gorduras de frutos exóticos da Índia (sal, mahua, Kakum) e do Brasil (piqui, dendê, babaçu).</p> <p>Métodos convencionais empregam temperatura e pressão elevadas para obtenção de ácidos graxos como emulsificantes. O processo enzimático não somente reduz os requerimentos energéticos como também previne a decomposição de alguns ácidos.</p>	<p>FACIOLLI e GONÇALVES, 1998.</p> <p>GILBERT <i>et al.</i>, 1993</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Maturação e fermentação 	<p>Responsável pelo aroma distinto de produtos, como por exemplo, os obtidos na hidrólise seletiva de lipídeos do leite durante a manufatura de queijos. Hidrólise enzimática da gordura do leite tem sido também usada na indústria de laticínios para produzir substitutos da manteiga, aromas de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos.</p>	<p>BALÇÃO e MALCATA, 1998.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Controle enzimático do “pitch” 	<p>Problemas com “pitch” são comuns em fábricas de papel. O motivo são os extrativos que estão presentes na remoção mecânica de celulose assim que ela entra na máquina de papel. Glóbulos de “pitch” tendem a perfurar os equipamentos em diversas partes tais como as caixas de válvulas, filtros e cilindros. As partes perfuradas podem resultar em buracos no papel, que terá então de ser reciclado ou terá uma qualidade inferior. Na pior das hipóteses, o rolo de papel pode se romper causando dispendiosas paradas na produção. Lipase tem demonstrado ser capaz de reduzir significativamente os depósitos de pitch sobre os cilindros e outros equipamentos.</p>	<p>NOVO NORDISK, 1995.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Curtumes 	<p>Couros crus e peles contêm proteínas e gorduras entre as fibras de colágeno. Antes dos couros e peles puderem ser curtidos, estas substâncias devem ser parcialmente ou totalmente removidas. O uso de lipases para dissolver e remover a gordura (desengraxa) está em fase de desenvolvimento como alternativa aos tensoativos solventes. As lipases hidrolisam não apenas a gordura de superfície dos couros crus e peles, mas também a gordura interna da estrutura do couro. O processo baseado em lipases é também muito mais aceitável do ponto de vista ambiental em comparação com os métodos tradicionais.</p>	<p>GANDHI, 1997</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Tratamento de efluentes 	<p>Usada no tratamento de efluentes de indústrias alimentícias. Exemplo típico é o tratamento de efluentes ricos em gorduras provenientes da indústria de sorvete. Lipase tem sido usada juntamente com outras enzimas (coquetel microbiano) designado como Combize-Biocatalyst na Windsor Creameries, com desempenho bastante satisfatório.</p>	<p>GILBERT <i>et al.</i>, 1993</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Formulação de detergentes 	<p>Usada geralmente em combinação com outras enzimas (proteases e celulasas) é responsável pela remoção de manchas de gordura tais como batom, frituras, manteiga, azeite, molhos e as difíceis manchas em colarinhos e punhos. Lipolase (<i>Humicola lanuginosa</i> lipase-Novo Nordisk) é empregada na formulação de um grande número de marcas importantes de detergentes em todo mundo, há mais de dez anos. Uma Lipolase de segunda geração denominado LIPOLASE ULTRA, com melhor desempenho de lavagem, foi lançado em 1994.</p>	<p>NOVO NORDISK, 1995.</p>
<p>Meio Orgânico</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síntese de ésteres 	<p>Usado para produzir ésteres como uma alternativa para síntese química. Além de serem utilizados na produção de essências e fragrâncias, os ésteres também são usados como surfactantes em produtos cosméticos, tais como umectantes e xampus. No caso destes produtos finais, a pureza é de vital importância. A especificidade da reação enzimática da lipase produz ésteres com praticamente nenhum subproduto não desejado.</p>	<p>VULFSON, 1993</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Especialidades químicas/separação enantiosseletivas 	<p>Explora as propriedades de estereoseletividade de muitas lipases em meio aquoso ou orgânico para obter compostos óticamente puros. Exemplos incluem: anti-inflamatórios (Naproxen, Isobuturín), β-bloqueadores (propranolol).</p>	<p>JESUS <i>et al.</i>, 1997.</p>

Os problemas atuais na produção de ésteres por via química estão relacionados com o uso de elevadas temperaturas e o emprego de ácidos fortes, que acarretam alto custo de investimento e de manutenção, bem como poluição do meio ambiente.

No processo por via enzimática, altos rendimentos e elevado grau de pureza podem ser mantidos, com grandes melhoramentos em termos de investimento, custo operacional e segurança (COSTA *et al.*, 1995).

A versatilidade da lipase como catalisador é evidente pelo número de processos em fase de implantação industrial. Por exemplo, a esterificação por lipase foi recentemente comercializada pela Unichema International para a produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e qualidade, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilhexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subsequentes (NOVO NORDISK, 1995).

Uma outra aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres aromatizantes, principalmente para o uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. O mercado mundial para esses compostos está avaliado em US\$ 3 bilhões, um montante que representa aproximadamente um quarto do valor do mercado de aditivos alimentares (VULFSON, 1993). Além disso, quando preparados por processos enzimáticos podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural, sendo portanto preferidos pelo mercado consumidor (GATFIELD, 1995).

A síntese de ésteres catalisada por lipases já foi descrita para mais de 50 ésteres formadores de aroma (VULFSON, 1993). Em princípio, o processo pode ser realizado em meios reacionais contendo mistura de álcool e ácido carboxílico em presença ou ausência de solventes, resultando em alta produtividade e rendimentos praticamente quantitativos (LANGRAND *et al.*, 1988; CASTRO *et al.*, 1997b), conforme exemplos citados na Tabela 2.13.

Neste trabalho, será tratada apenas a esterificação de álcool com ácidos. Ésteres também podem ser produzidos por interesterificação. Como modelo de estudo foi selecionado o processo de obtenção de ésteres formadores de aroma de cadeia curta e de cadeia longa.

Tabela 2.13. Síntese de éster catalisada por lipase

<i>Enzima</i>	<i>Solvente</i>	<i>Doador do grupo acila</i>	<i>Álcool</i>	<i>Comentários</i>	<i>Referência</i>
CPL livre	Sistema bifásico água - óleo	óleo vegetal	metanol	A taxa de transesterificação aumenta com o aumento da quantidade de água até a saturação das fases.	BRIAND <i>et al.</i> , 1994
CCL imobilizada	n-hexano	ácido propiônico	etanol	Ligação covalente ao nylon. A atividade e estabilidade térmica aumentaram após a imobilização.	CARTA <i>et al.</i> , 1991
Lipozyme MML imobilizada	n-hexano	ésteres de cadeia curta	geraniol	Número total ótimo de carbonos do produto = 15. Substratos com ramificações fornecem taxas de reações mais baixas. O conteúdo de água ótima foi 0,1 g/g.	CHULALAKSANANUKUL <i>et al.</i> , 1992
Lipozyme MML imobilizada	n-hexano, SCCO ₂	acetato de propila	geraniol	A quantidade de água ótima na fase sólida foi cerca de 8-10% (w/w) em n-hexano e SCCO ₂ . Rendimentos mais elevados foram obtidos na síntese de acetato de geraniol em presença de n-hexano.	CHULALAKSANANUKUL <i>et al.</i> , 1993
CAL SP 435 imobilizada	n-hexano	ésteres de ácidos graxos	citronelol, geraniol	98% de conversão molar foi obtida para ésteres de ácidos graxos de cadeia curta.	CLAON e AKOH, 1994b
CAL SP 435 imobilizada	n-hexano, vários solventes orgânicos	ácido acético	citronelol	Não há inibição pelo citronelol. Valores mais altos de Log P não necessariamente significam atividades enzimáticas são mais altas. 98 % de conversão ocorre depois de 14 h a 20°C.	CLAON e AKOH, 1994b
CAL SP 382 SP 435 imobilizada	n-hexano, vários solventes orgânicos	ácido acético	geraniol	A atividade é inibida pelo ácido acético mas não pelo geraniol. A conversão é independente da quantidade de água inicial presente no solvente. Solvente com log P 0,85 acarreta numa conversão maior que 80%.	CLAON e AKOH, 1994a
Lipozyme MML imobilizada	heptano	ácido butírico	citronelol	A quantidade de água no meio reacional decresce durante o progresso da reação. A atividade enzimática é recuperada por desidratação da enzima.	CASTRO <i>et al.</i> , 1992b

Tabela 2.13. Síntese de éster catalisada por lipase (continuação)

<i>Enzimas</i>	<i>Solvente</i>	<i>Doador do grupo acila</i>	<i>Álcool</i>	<i>Comentários</i>	<i>Referência</i>
CCL livre	hexano	α -ácido lipóico	álcoois primários	Ótima enantioselectividade de esterificação com n-hexanol. Modelo sugerido para o sítio ativo da enzima.	FADNAVIS e KOTESHWAR, 1997
CAL SP 435 imobilizada	isento	ácido acético	citronelol	Agentes dessecantes melhoram os rendimentos em 10%. A razão molar ótima do álcool/ ácido acético é de 1,56 com log P=1,63.	FONTEYN <i>et al.</i> , 1994
CCL ANL livre	aquoso	ácido oléico	glicerol	Reações lentas realizadas em temperatura ambiente. Equilíbrio é deslocado no sentido da esterificação com excesso de 50% de ácido oléico e remoção de água por destilação.	LINFIELD <i>et al.</i> , 1984
RXL, EL, ANL, PSL, CBL, CCL, MXL, PXL	aquoso	ácido esteárico, oléico e linoléico	sacarose, glicose, frutose e sorbitol	CCL mais ativa das enzimas testadas. Baixos rendimentos de éster de ácidos esteáricos devido a uma fraca dispersão do ácido esteárico (sólido) na mistura reacional.	SEINO <i>et al.</i> , 1984
GCL livre e imobilizada	hidrocarbonetos	ácidos oléico e esteárico	etanol, butanol, hexanol, e octanol	Seletividade não é afetada após imobilização em sílica gel.	SONNET <i>et al.</i> , 1994
25 lipases livres	isento	ácido oléico	butanol	Rendimento afetado pela quantidade de água inicial. Aumento de temperatura melhora a taxa de reação mas não afeta o rendimento.	LINKO <i>et al.</i> , 1995
PSL livre e imobilizada	n-hexano	triacilglicerol	geraniol	Melhoramento do rendimento com lipase imobilizada. O grau de melhoramento é dependente da matriz do suporte, com vidro poroso apresentando melhores resultados seguidos por polivinilpirrolidona e duolite	YEE <i>et al.</i> , 1995
CCL, PPL livre	isento	propionato de etila, laurato de butila, ácido oléico	propanol, heptanol, nonanol	A polaridade do substrato afeta a migração da água entre a enzima e a mistura reacional, alterando a atividade da enzima durante a reação.	GOLDBERG <i>et al.</i> , 1990
ANL, GCL, PCL, RDL livre	aquoso	ácido de C ₂ -C ₆	geraniol, farnesol	ANL mostrou atividade para todos ácidos C ₃ -C ₅ enquanto os outros 3 não apresentaram nenhuma atividade para os ácidos testados. Ácido acético não foi esterificado com geraniol.	IWAI <i>et al.</i> , 1980

ANL = *Aspergillus niger*; CBL = *Chromobacterium*; CCL = *Candida cylindraceae* (*Candida rugosa*); GCL = *Geotrichum candidum*; HXL = *Humicola* sp.; MIL = *Mucor javanicus*; MXL = *Mucor* sp.; PPL = Porcine pancreas; PCL = *Penicillium cyclopium*; PFL = *Pseudomonas fluorescens*; PSL = *Pseudomonas* sp.; PXL = *Pseudomonas* sp.; RDL = *Rhizopus delemar*; RNL = *Rhizopus niveus*; RXL = *Rhizopus*; UML = *Ustilago maydis*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Enzimas

Neste trabalho foram utilizadas a lipase pancreática (porcine pancreas, tipo II-crude), e a de origem microbiana (*Candida rugosa*, tipo VII) adquiridas comercialmente da Sigma Co, EUA, com atividade média de 1200 e 1440 U/ mg enzima (pó) e teor de proteína igual a 59 mg/g sólido e 16,2 m/g sólido, respectivamente. Estas preparações enzimáticas estavam na forma de pó. Foi também empregada uma preparação comercial de lipase (*Mucor miehi*) imobilizada em resina de troca iônica (Lipozyme TM²⁰) manufaturada pela Novo Nordisk/ Dinamarca, com atividade média de 28 U/ mg suporte seco.

3.1.2. Suportes

Foram testadas quitosanas de duas procedências: quitosana de grau analítico (C-3646 obtida a partir de casca de caranguejo contendo 85% de deacetilação, Sigma) e grau farmacêutico (SP Farma Químicos Ltda, São Paulo). A quitosana de grau farmacêutico tinha as seguintes características, de acordo com as informações do fabricante: grau de pureza (93%); umidade (6%) e granulometria de 40 mesh.

3.1.3. Reagentes

Como materiais de partida foram utilizados: ácido acético (Rio Lab, 99,7%); ácido butírico (Merck, 99,5%); ácido oenântico (Merck, 97%); ácido pelargônico (Merck, 92%); ácido caprílico (Merck, 98%); ácido láurico (Merck, 98%); etanol (Merck); n-butanol (Merck); hexanol (Merck) e d,l-citronelol (Sigma, 95%). Todos os experimentos utilizaram heptano, como solvente. Os substratos foram previamente desidratados com peneira molecular em forma de pellets com 4°A (Aldrich), de acordo com metodologia previamente descrita (CASTRO *et al.*, 1997b). Foram utilizados ainda os seguintes reagentes:

hexametilenodiamina (HEMDA, Sinthy) e glutaraldeído (25%, Reagen); heptano comercial (Reagen); hexano (Sinthy); acetona p.a. (Reagen); etanol comercial; sódio metálico (Riedel-de Hën AG); solução de Karl Fisher isenta de piridina (Merck); goma arábica em pó, pura (Sinthy); reagente Brilhante de Comassie (Sigma), albumina bovina (Sigma); óleo de oliva virgem com acidez baixa (Paesano), butirato de butila (sintetizado por via química, nos laboratórios da FAENQUIL).

3.2. EQUIPAMENTOS

Foi utilizado para medida de pH - pHmetro modelo TEC2 (TECNAL), para ensaios colorimétricos - espectrofotômetro modelo UV-1203 (Shimadzu); determinação do teor de água - Titulador automático de Karl Fischer modelo D18 (Mettler); os experimentos de imobilização foram realizados em agitador magnético modelo 735 (FISATON); as determinações de atividade enzimática bem com as reações de síntese foram efetuadas em banho termostaticado com agitação, modelo 145 (FANEN); as determinações do álcool e do éster foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo Varian 3800 (Varian).

3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.3.1. Seleção do Tipo de Quitosana e da Fonte de Lipase

Para a seleção do tipo de quitosana (grau analítico ou farmacêutico) e lipase (pancreática ou microbiana) foi adotada a metodologia estabelecida anteriormente (CASTRO *et al.*, 1999), com algumas modificações conforme a seguir descrito: quitosana *in natura* (3 gramas) foi previamente umedecida em hexano, sob condições de agitação (100 rpm) durante 1 hora. Após esse período, o excesso de hexano foi removido e em seguida foi adicionado 0,5 gramas de lipase dissolvida em 10 ml de água. A fixação da lipase ao suporte foi efetuada sob agitação durante 3 horas à temperatura ambiente, seguida por período adicional de 18 horas em condições estáticas a 4°C. A separação do derivado imobilizado foi efetuada por filtração a vácuo (papel de filtro, Whatman Nº 42), sendo realizada duas lavagens do complexo suporte-enzima com hexano (Figura 3.1).

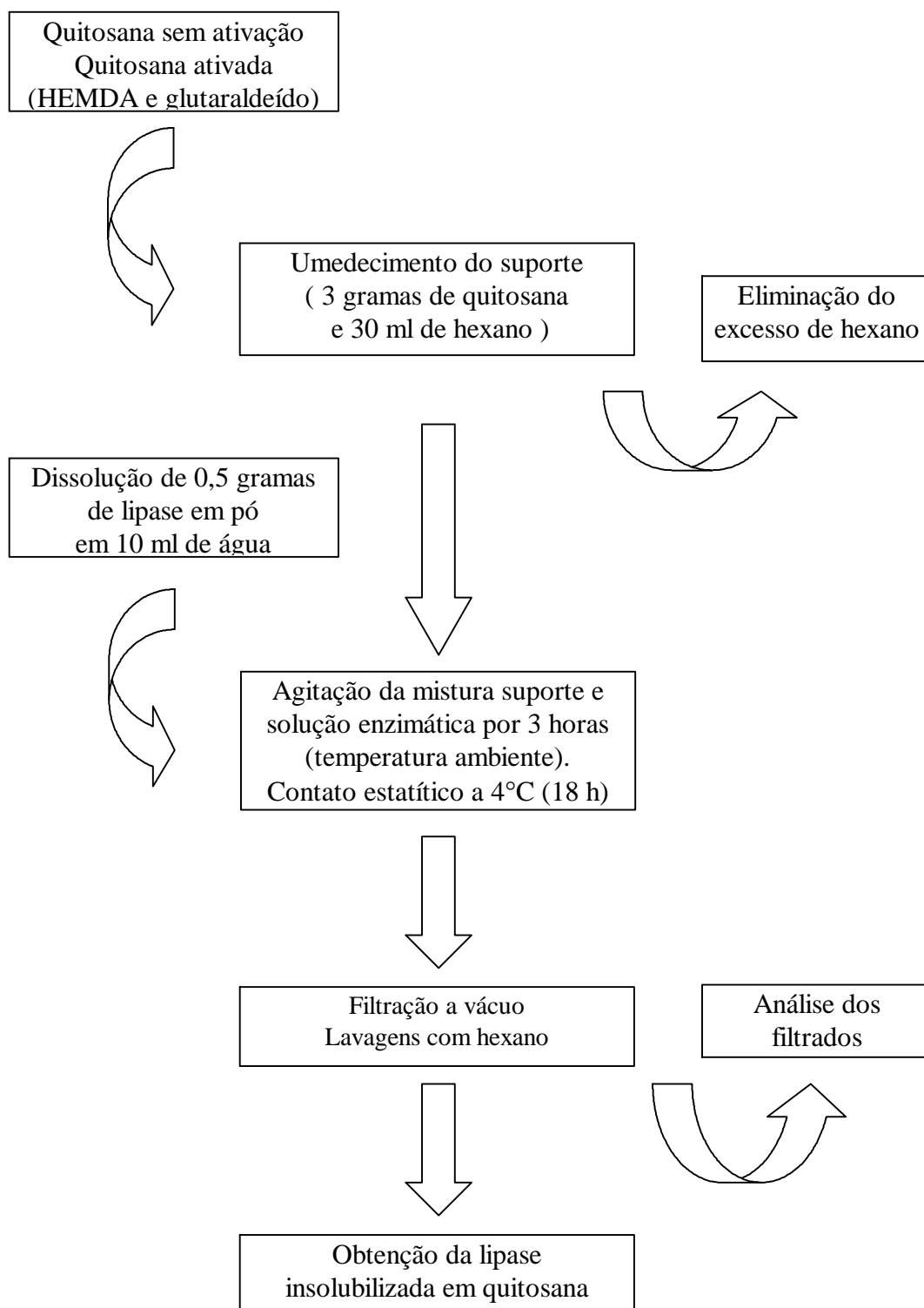


Figura 3.1. Esquema para insolubilização da lipase em quitosana.

3.3.2. Imobilização de Lipase Microbiana em Quitosana por Ligação Covalente

Inicialmente, a quitosana foi ativada com hexametilenodiamina (HEMDA) e glutaraldeído empregando para cada grama de quitosana 12,8 ml de solução aquosa de HEMDA 2% (p/v), de acordo com metodologia descrita por BON *et al.* (1984). A reação foi processada por 2 horas a 40°C, e findo esse tempo o sobrenadante foi decantado e o suporte úmido tratado com 12,8 ml de glutaraldeído 3% (v/v) por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir o material foi lavado com água destilada á temperatura ambiente, por 15 minutos sob agitação constante, seguido por uma secagem a 60°C. A imobilização da lipase microbiana por ligação covalente foi efetuada de acordo com a técnica descrita anteriormente (item 3.3.1, Figura 3.1).

3.3.3. Determinação da Relação Ótima entre a Massa de Lipase Microbiana e Quitosana de Grau Farmacêutico

Para determinar a relação ótima entre a massa de lipase microbiana e quitosana de grau farmacêutico, foi realizada uma série de experimentos, na qual a massa do suporte foi mantida fixa em 3,0 gramas e a massa de lipase oferecida para a imobilização foi variada entre 0,1 a 1,0 grama de lipase dissolvida em água. Nesta série de experimentos foi efetuado um tratamento preliminar na quitosana, consistindo de lavagens sucessivas com 10% (v/v) etanol, 10% (v/v) acetona e água destilada. O material lavado foi seco em estufa a 60°C durante 24h. As imobilizações foram efetuadas como descrito anteriormente (item 3.3.1).

3.4. ANÁLISES

3.4.1. Determinação do Teor de Proteína

O conteúdo de proteína da lipase solúvel foi determinado pelo método colorimétrico de BRADFORD (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente de brilhante de Comassie. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada para preparar uma curva de calibração na faixa de 0 a 0,1 mg/ml, como apresentado no Apêndice 1.

3.4.2. Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática das lipases na formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por SOARES *et al.* (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50 ml de azeite de oliva e 50 ml de goma arábica a 7% (p/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 ml foram adicionados: 5 ml de substrato, 4 ml de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 ml da solução enzimática (5 mg sólido/ ml) ou cerca de 250 mg de lipase imobilizada (massa seca). Nos experimentos preliminares, os frascos foram incubados a 37°C por 10 e 30 minutos, respectivamente, em banho termostatzado com agitação. Posteriormente foi efetuado um estudo para verificar se o tempo inicialmente adotado representava as velocidades iniciais da reação hidrolítica, sendo então encontrado um tempo ótimo de 5 minutos para ambas as preparações de lipase (seção 4.4). Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 ml de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela equação 3.1 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Para cada análise de atividade, foi realizado um branco utilizando água destilada ou 250 mg do suporte seco. As atividades foram expressas em μmoles/mg.min (U), onde miligrama refere-se a massa de sólido para a lipase livre e suporte seco para lipase imobilizada.

$$U \left(\mu\text{moles} / \text{mg} \cdot \text{min} \right) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times D}{t \times m} \quad (3.1)$$

onde,

D = diluição da amostra

M = concentração da solução de KOH

m = massa (miligramas)

t = tempo de reação (minutos)

V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra

V_b = volume do KOH gasto na titulação do branco

3.4.3. Determinação da Atividade de Esterificação

A atividade de esterificação da lipase imobilizada foi determinada pela formação do butirato de butila na reação de n-butanol (0,30 M) com ácido butírico (0,45 M) em heptano a 37°C com massa seca de enzima igual a 0,5 gramas. A reação foi iniciada pela adição da lipase imobilizada ao meio reacional (20 ml), em frasco fechado de 100 ml, em shaker rotatório com agitação de 150 rpm. Alíquotas de 1 ml foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após intervalos pré-determinados. A quantidade de butirato de butila formado foi quantificada por análise cromatográfica (seção 3.4.5). Uma unidade de atividade (esterificação) foi definida como a quantidade de enzima que conduz à formação de 1 micromol de butirato de butila por minuto nas condições do ensaio.

3.4.4. Teor de Ácido Graxo

A concentração de ácido graxo foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 ml de etanol p.a, empregando-se solução alcoólica de KOH 0,02 N e fenolftaleína como indicador (MACEDO e PASTORE, 1997). Os cálculos foram efetuados pela equação 3.2.

$$\text{Ácido graxo (g / litro)} = \frac{V \times N \times M}{W} \quad (3.2)$$

onde,

M = massa molecular do ácido graxo titulado, mol

N = normalidade da solução de KOH

V = volume gasto de KOH, ml

W = massa da alíquota titulada, gramas.

3.4.5. Teor de Água

O teor de água nas fases líquida e sólida foram medidos diretamente em um titulador automático Karl Fischer.

3.4.6. Teor de Álcool e Éster

As concentrações de butanol e butirato de butila foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP), operando numa temperatura de 70°C e empregando-se hexanol como padrão interno. No Apêndice 2 são apresentados os parâmetros operacionais empregados bem como cromatogramas típicos das análises efetuadas.

3.5. AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

3.5.1. Massa Seca

As lipases imobilizadas foram pesadas em placas de Petri, previamente taradas, para a verificação da massa úmida da lipase imobilizada e em seguida a umidade das amostras foi determinada diretamente por secagem em estufa (100°C ± 5°C, durante 18 horas).

3.5.2. Recuperação de Proteína (RP %)

A quantidade de proteína fixada foi determinada pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976), descrito no item 3.4.1 e os cálculos foram realizados pela equação 3.3.

$$RP (\%) = \frac{Pads}{P_0} \times 100 \quad (3.3)$$

onde,

P_0 = proteína oferecida para imobilização (mg)

$Pads$ = proteína determinada como a diferença entre P_0 e as proteínas remanescentes no sobrenadante e filtrados ao final da adsorção (mg).

3.5.3. Rendimento de Imobilização (RI%)

O rendimento de imobilização foi calculado pela equação 3.4.

$$RI (\%) = \frac{U_{ads}}{U_0} \times 100 \quad (3.4)$$

onde,

U_0 = unidades de atividade oferecidas para imobilização

U_{ads} = unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa seca).

3.6. PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA

3.6.1. Influência do pH

As atividades das lipases livre e imobilizada foram estudadas utilizando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva na faixa de pH entre 3,0 a 9,0 com incremento de 0,5. Para este estudo foi empregada a mesma metodologia descrita no item 3.4.2 variando o pH do tampão fosfato de sódio (0,1 M) utilizado na temperatura de 37°C (SOARES *et al.*, 1999).

3.6.2. Influência da Temperatura

Foi verificada a influência da temperatura na atividade das lipases livre e imobilizada empregando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita no item 3.4.2, nas temperaturas de 30 a 65°C, pH 7,0 (SOARES *et al.*, 1999).

3.6.3. Estabilidade Térmica

O efeito da temperatura na estabilidade da lipase livre e imobilizada foi determinado por meio da incubação de diversas amostras da lipase livre (1 ml, 5 mg/ml) e imobilizada (0,30 gramas, massa seca) numa faixa de temperatura de 37-60°C em meio aquoso (0,1 M

tampão fosfato, pH 7,0) durante 120 minutos. Em intervalos de 60 minutos, foram retiradas as amostras as quais foram imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. Em seguida, a atividade residual foi determinada a 37°C, pela adição de 5 ml de substrato preparado como descrito na seção 3.4.2. As constantes de desativação (k_d , h^{-1}), foram calculadas pela equação 3.5 (ZANIN, 1989).

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad (3.5)$$

onde:

A_0 = atividade enzimática inicial

A = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação (t).

3.6.4. Influência do Tempo de Estocagem na Atividade da Enzima Imobilizada

A lipase imobilizada foi estocada por um período de 30 dias em ausência de qualquer componente, em presença de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e de heptano. Ao final desse período as atividades residuais foram determinadas empregando-se a hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita na seção 3.4.2.

3.7. DESEMPENHO DA LIPASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA NA SÍNTESE DE ÉSTERES

A potencialidade de aplicação da lipase imobilizada em quitosana na síntese de ésteres foi inicialmente verificada a partir de diferentes álcoois e ácidos, sendo selecionado um sistema para estudo detalhado. As reações de esterificação foram conduzidas em frascos fechados de 100 ml contendo 20 ml de substrato em concentrações adequadas de álcool e ácido diluídas em heptano. As misturas foram incubadas com lipase imobilizada em proporções adequadas. A maioria dos experimentos foi realizada a 37°C, sob agitação constante de 150 rpm, durante 24 horas.

3.7.1. Influência do Tamanho da Cadeia do Ácido Graxo e do Álcool

As sínteses foram conduzidas em frascos fechados de 100 ml contendo 0,30 M butanol e 0,45 M dos diversos ácidos testados (ácido acético, ácido butírico, ácido oenântico, ácido pelargônico, ácido caprílico e ácido láurico) ou 0,30 M dos diversos álcoois (etanol, n-butanol, hexanol e d,l-citronelol) e 0,45 M de ácido butírico, em 20 ml de heptano. As misturas foram incubadas com 0,5 gramas de lipase imobilizada (massa seca), sob condições de agitação de 150 rpm, numa temperatura de 37°C durante 24 horas. Foram analisadas amostras referentes ao tempo inicial e final de cada teste efetuado. A conversão molar nas reações foi calculada com base no consumo de butanol ou ácido butírico, conforme equação 3.6.

$$\text{Conversão molar (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (3.6)$$

onde:

C_0 = concentração inicial do reagente (g/l)

C = concentração final do reagente no tempo considerado (g/l).

3.7.2. Síntese do Butirato de Butila

A influência de diversos fatores na formação do butirato de butila foi verificada por meio de um planejamento fatorial constituído de 2^3 experimentos sem replicata. A escolha dos fatores e dos níveis foi baseada em estudos anteriores (CASTRO *et al.*, 1999) sendo considerado para este sistema, a influência de três variáveis: temperatura (X_1); concentração de lipase (X_2) e razão molar (X_3) entre os materiais de partida em uma variável resposta específica do processo (formação do butirato de butila). Os seguintes níveis foram adotados: temperatura (37 e 50°C), concentração de enzima imobilizada (0,25 e 0,50 gramas, massa seca) e razão molar entre ácido butírico (ABut) e n-butanol (ButOH) em (1 e 2). A matriz do experimento é mostrada na Tabela 3.1, com os valores reais empregados nas sínteses. Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica durante 20 horas. Três experimentos foram realizados no ponto central, para estimativa do erro experimental. Os resultados foram analisados pela técnica da Análise de Variância (ANOVA) empregando o Programa Statgraphics versão 6.0.

Tabela 3.1. Variáveis independentes no planejamento experimental 2^3

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>		
	Baixo (-)	Médio (0)	Alto (+)
X ₁ : Temperatura (°C)	37	43,5	50
X ₂ : Massa de enzima (gramas, massa seca)	0,25	0,37	0,5
X ₃ : Razão molar [ácido butírico/ n-butanol]	1	1,5	2

3.7.3. Estabilidade Operacional

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi verificada em reações de esterificação em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado, de acordo com metodologia descrita anteriormente (CASTRO *et al.*, 1999). A estabilidade da lipase imobilizada frente a bateladas consecutivas foi realizada utilizando-se 1,0 grama de lipase imobilizada (massa seca) e 20 ml de substrato contendo 0,30 M de ácido butírico e 0,25 M de butanol. Neste estudo empregou-se, em todas as bateladas, a mesma massa de biocatalisador suportado, acondicionada em um invólucro de nylon de 420 mesh. Foram realizadas bateladas de 24 horas cada uma, numa temperatura de 37°C, monitoradas nos tempos iguais a zero e 24 h, conforme apresentado nos itens 3.4.3 e 3.4.5. Entre as bateladas, a lipase imobilizada foi lavada com o hexano para remoção dos reagentes e/ou produtos eventualmente retidos no suporte. Após uma hora, tempo necessário para evaporação do solvente, a lipase imobilizada era reutilizada em uma outra reação com um novo substrato na mesma concentração do utilizado na reação anterior.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com objetivo de orientar melhor o leitor nas diversas etapas desenvolvidas neste trabalho, optou-se por iniciar este capítulo apresentando-se em forma de diagrama os principais tópicos estudados (Figura 4.1).

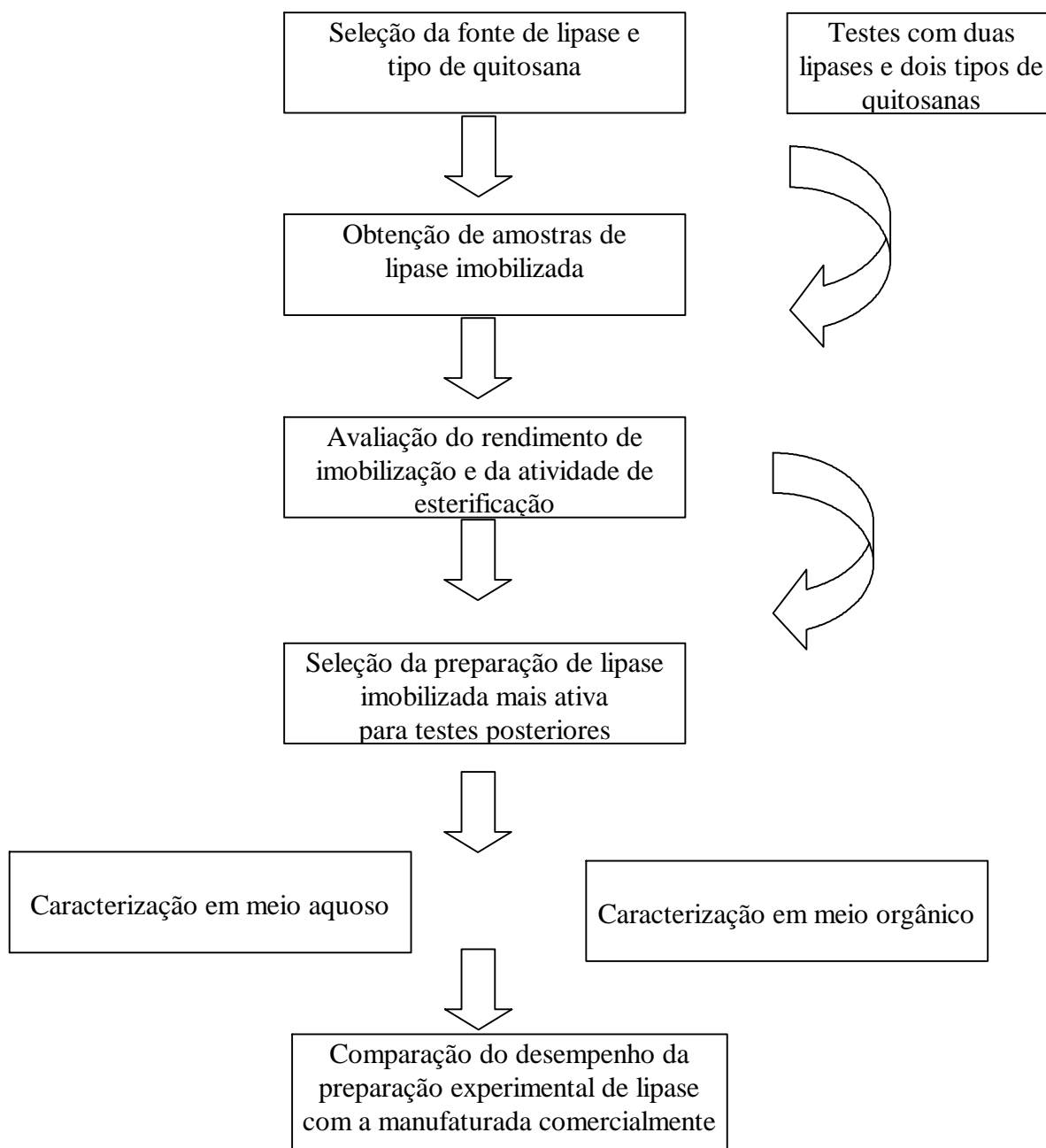


Figura 4.1. Etapas de desenvolvimento do estudo realizado

4.1. SELEÇÃO DO TIPO DE QUITOSANA E DA FONTE DE LIPASE

Neste trabalho foi testado quitosana como suporte para imobilização de lipases de origem pancreática (LPP) e microbiana (LCR) em quitosana. As enzimas foram insolubilizadas em quitosanas de duas procedências (grau analítico e grau farmacêutico) de acordo com técnica desenvolvida anteriormente empregando Celite como suporte (CASTRO *et al.*, 1999). Basicamente o procedimento consistiu do contato das soluções enzimáticas com os suportes previamente embebido em hexano. As enzimas imobilizadas foram recuperadas por filtração a vácuo e os sistemas imobilizados lavados com hexano. Este procedimento está descrito nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

O tipo de quitosana e a fonte de lipase interferiram significativamente na recuperação de proteína (RP%, calculada pela equação 3.3) e no rendimento de imobilização (RI%, calculado pela equação 3.4), conforme mostrado na Tabela 4.1, sendo que esses resultados estão detalhados no Apêndice 3. As melhores porcentagens de recuperação protéica (RP = 78,4%) e catalítica (RI =14,7%) foram obtidas empregando lipase microbiana e quitosana de grau farmacêutico.

Tabela 4.1. Imobilização da lipase pancreática e microbiana *Candida rugosa* em diferentes tipos de quitosanas

<i>Tipo de quitosana</i>	<i>Fonte de lipase</i>	<i>Proteína oferecida P_o (mg)</i>	<i>Unidades oferecida (U_o)</i>	<i>Proteína fixada P_{ads} (mg)</i>	<i>Atividade Total (U_{ads})</i>	<i>RP (%)</i>	<i>RI (%)</i>
Grau Analítico	Pancreática	58,9	598,4	31,6	21,5	53,7	4,3
	Microbiana	16,2	718,3	11,8	51,2	73,1	7,1
Grau Farmacêutico	Pancreática	58,9	598,4	42,6	42,6	72,3	7,1
	Microbiana	16,2	718,3	12,7	105,4	78,4	14,7

Com relação ao tipo de quitosana, é provável que a estrutura em forma de pequenos grânulos, característica da quitosana de grau farmacêutico, tenha proporcionado uma melhor distribuição da lipase na superfície do suporte, favorecendo um melhor contato entre a interface água /óleo, necessária para a expressão da atividade das lipases imobilizadas.

Para confirmar a superioridade do par quitosana de grau farmacêutico e lipase microbiana, ou ainda, verificar a possibilidade de resistência à transferência de massa para o transporte de moléculas de óleo nas outras amostras imobilizadas, determinou-se a atividade de esterificação para todas as preparações de lipase imobilizada na reação de n-butanol com ácido butírico. As sínteses foram realizadas conforme metodologia descrita no item 3.4.3, sendo os resultados apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3. No Apêndice 4 mostra-se o detalhamento dos resultados apresentados nessas figuras.

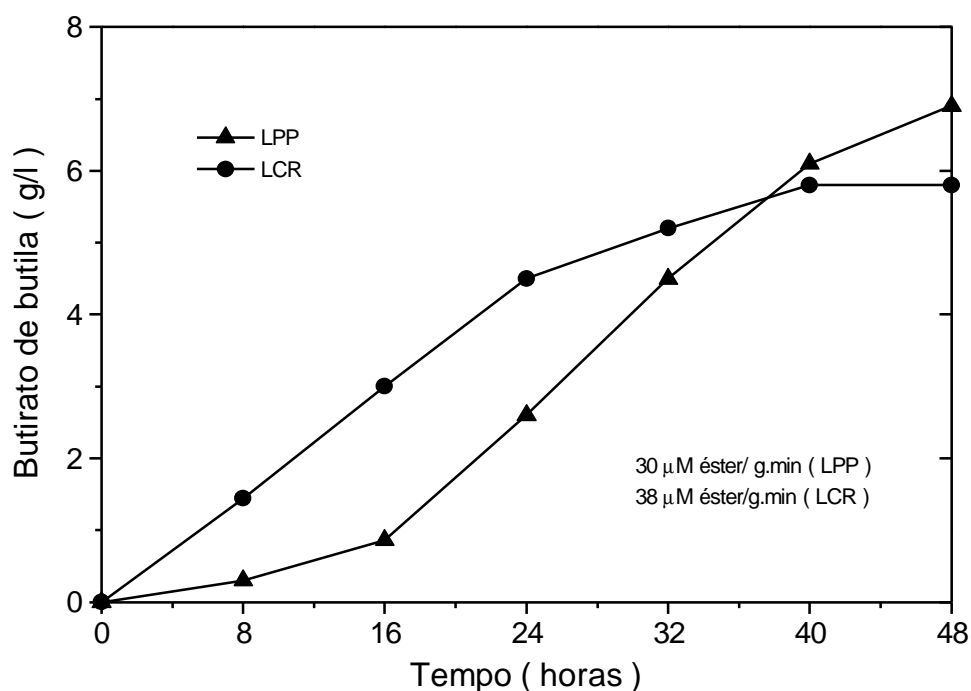


Figura 4.2. Formação de butirato de butila (BB) catalisada por lipase pancreática (LPP) e microbiana (LCR) imobilizadas em quitosana de grau analítico.

A observação da Figura 4.2 mostra que no caso da utilização da quitosana de grau analítico a máxima concentração obtida para o butirato de butila foi de 6,9 e 5,8 g/l para a lipase pancreática e microbiana, respectivamente, após 48 horas de reação. Quando se empregou como suporte de imobilização a quitosana de grau farmacêutico, verificou-se que, no caso da lipase pancreática (LPP) foi obtida praticamente a mesma concentração de butirato de butila (6,6 g/l), enquanto para a lipase microbiana o acréscimo em concentração foi igual a 3 vezes (5,8 para 17,3 g/l), como apresentado na Figura 4.3. Em ambos os casos,

pela tendência das curvas, nota-se que praticamente atingiu-se a concentração máxima possível, para as condições de ensaios estudados.

Esses resultados sugerem que a lipase microbiana imobilizada em quitosana de grau farmacêutico foi a preparação imobilizada mais ativa na catálise de reações de hidrólise e síntese, sendo portanto, o sistema selecionado para estudos posteriores.

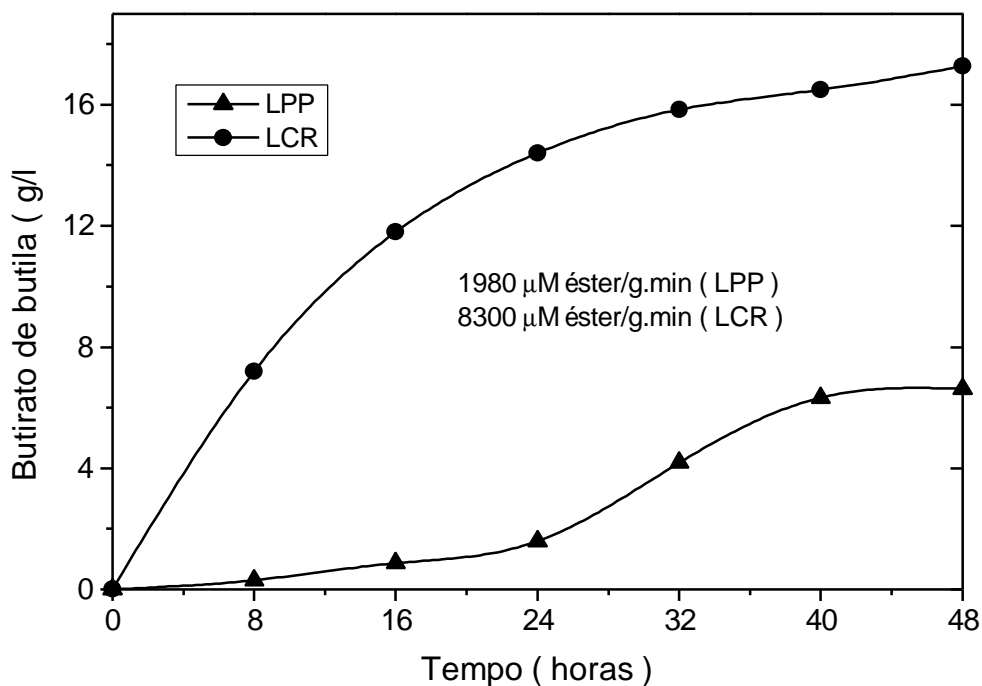


Figura 4.3. Formação de butirato de butila (BB) catalisada por lipase pancreática (LPP) e microbiana (LCR) imobilizadas em quitosana de grau farmacêutico.

4.2. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO EM QUITOSANA POR ADSORÇÃO E LIGAÇÃO COVALENTE.

Tendo selecionado o tipo de quitosana e a fonte de lipase, experimentos posteriores foram realizados com o objetivo de verificar se o procedimento de imobilização por ligação covalente, fornecia rendimentos superiores aos obtidos pelo método de adsorção. Para tanto a quitosana foi ativada com HEMDA e glutaraldeído, conforme metodologia descrita por BON *et al.* (1984) e apresentada no item 3.3.2. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.2 e no Apêndice 5, foram comparados com aqueles alcançados com quitosana *in natura* (adsorção) e indicaram que apesar da similaridade das porcentagens de recuperação

de proteína (aprox. 75%) houve um decréscimo acentuado da atividade catalítica. Esses dados sugerem que a quitosana ativada produziu modificações conformacionais na enzima, alterando a estrutura tridimensional do seu sítio ativo. Isto provavelmente ocasionou impedimentos estéricos que tornaram certas partes da molécula enzimática inacessíveis ao substrato (azeite de oliva). Desta forma, selecionou-se a adsorção física como método de imobilização da lipase em quitosana.

Tabela 4.2. Imobilização da lipase microbiana *Candida rugosa* em quitosana por adsorção e ligação covalente

<i>Método de imobilização</i>	<i>Tratamento do suporte</i>	<i>Proteína fixada</i> P_{ads} (mg)	<i>Atividade total</i> U_{ads} (U)	<i>RP</i> (%)	<i>RI</i> (%)
Adsorção	-	12,1	112,0	74,6	15,6
Ligação covalente	HEMDA	12,4	33,3	76,4	4,6

Proteína oferecida: $P_o = 16,2$ mg

Unidades de atividade oferecida $U_o = 718,3$ U

4.3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SATURAÇÃO DO SUPORTE

Um outro parâmetro que interfere na atividade da enzima imobilizada é a relação entre massa de enzima e suporte, particularmente com a lipase que apresenta uma forte afinidade por superfície. De acordo com BOSLEY e PEILOW (1997), quando uma pequena massa de enzima é oferecida para a imobilização, a lipase tende a maximizar seu contato com a superfície resultando numa perda de sua estrutura e reduzindo conseqüentemente sua atividade catalítica. Com o aumento da quantidade de enzima oferecida, esta área é reduzida diminuindo a difusão da lipase, o que resulta na retenção de sua configuração estrutural e na sua menor perda de atividade. Para determinar a relação entre a lipase microbiana (*Candida rugosa*) e quitosana, foi estudada a influência da quantidade de lipase na faixa de 0,1 a 1,0 grama/ grama de quitosana. Os resultados são mostrados na Figura 4.4 e no Apêndice 6.

Pode-se observar que a atividade hidrolítica da lipase imobilizada aumentou de 12,7

para 52,2 U/mg (suporte seco) com o incremento da massa de lipase oferecida (0,03 para 0,33 gramas de lipase/ grama de suporte), entretanto quando efetuado os cálculos de rendimento (atividade/ carregamento), maiores eficiências foram obtidas quando se ofereceu uma menor massa de lipase (120 unidades/ grama de suporte). Os resultados sugerem que para uma relação de enzima /suporte superior a 0,16 g de enzima/ g de suporte, ao invés de se obter uma maior fixação da lipase na superfície do suporte, uma adsorção de camadas múltiplas ocorreram, bloqueando ou inibindo o acesso do substrato (emulsão de azeite) ao sítio ativo da lipase. Esta relação é similar à encontrada por OLIVEIRA *et al.* (1999), usando a mesma fonte de lipase e polímero sintético (copolímero de estireno-divinilbenzeno).

Tomando por base esses resultados, os experimentos posteriores foram realizados com derivados imobilizados de lipase produzidos com uma massa igual a 0,1 grama de lipase/ grama de suporte, obtendo-se uma atividade média de 36 U/mg de suporte seco na temperatura de 37°C por um período de incubação de 30 minutos.

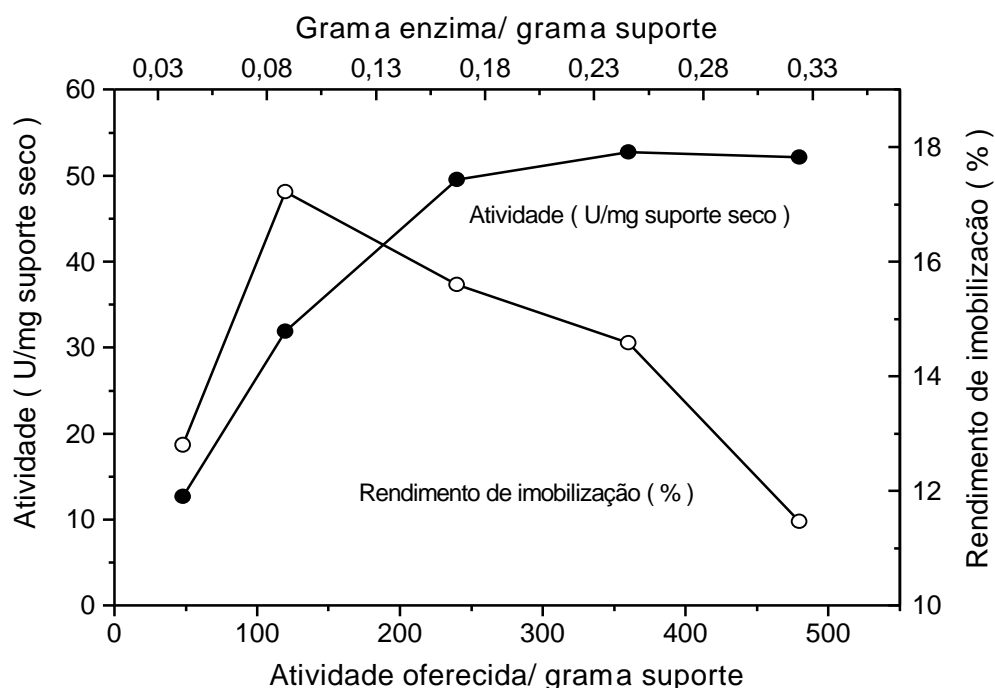


Figura 4.4. Efeito da quantidade de enzima oferecida por grama de suporte na atividade hidrolítica da lipase imobilizada (●) e no rendimento de imobilização (○) empregando quitosana de grau farmacêutico. O rendimento foi calculado pela divisão da atividade hidrolítica total (U_{ads}) por unidades de atividade oferecida na imobilização.

Os resultados encontrados neste trabalho se comparam favoravelmente com aqueles reportados na literatura (BALCÃO *et al.*, 1996), em termos de rendimento de imobilização. Tais rendimentos, devem-se provavelmente, à metodologia empregada, ou seja, o uso de meio orgânico (hexano) na etapa de fixação da enzima ao suporte. Resultados similares têm sido descrito por diversos pesquisadores, indicando uma nova tendência na utilização de solventes orgânicos apolares como meio de dispersão para a imobilização de lipases (MUSTRANTA *et al.*, 1993; FUKUNAGA *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 1999).

O mecanismo responsável por este aperfeiçoamento ainda não foi totalmente esclarecido. Segundo OLIVEIRA (1999) duas hipóteses podem ser consideradas: 1) a expansão dos suportes nos solventes promove uma melhor distribuição da enzima na superfície do suportes ou 2) a baixa polaridade dos solventes auxilia na conservação da camada protetora de água ao redor da enzima.

Apesar de ambos os mecanismos assegurarem uma elevada retenção de atividade no suporte, é mais provável que solventes com baixa polaridade (alto valor de log P) tenham permitido manter as propriedades da configuração da enzima. Este fato não é surpreendente, visto que solventes hidrofóbicos, como os alcanos ($\log P > 3,5$) retêm a atividade original da enzima (LAANE *et al.*, 1987). O log P é calculado da forma apresentada no item 2.3.5.1.

4.4. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA

Nos experimentos anteriores as determinações da atividade hidrolítica das preparações de lipase livre e imobilizada foram efetuadas de acordo com a metodologia modificada por SOARES *et al.* (1999) e apresentadas no item 3.4.2. Para verificar se os tempos utilizados (10 minutos para lipase livre e 30 minutos para lipase imobilizada) representam a atividade enzimática sem interferência de efeitos inibitórios, as atividades das lipases foram determinadas em diferentes tempos de incubação (5 a 40 minutos). Os resultados obtidos mostrados nas Figuras 4.5 e 4.6 são referentes às médias dos valores apresentados no Apêndice 7.

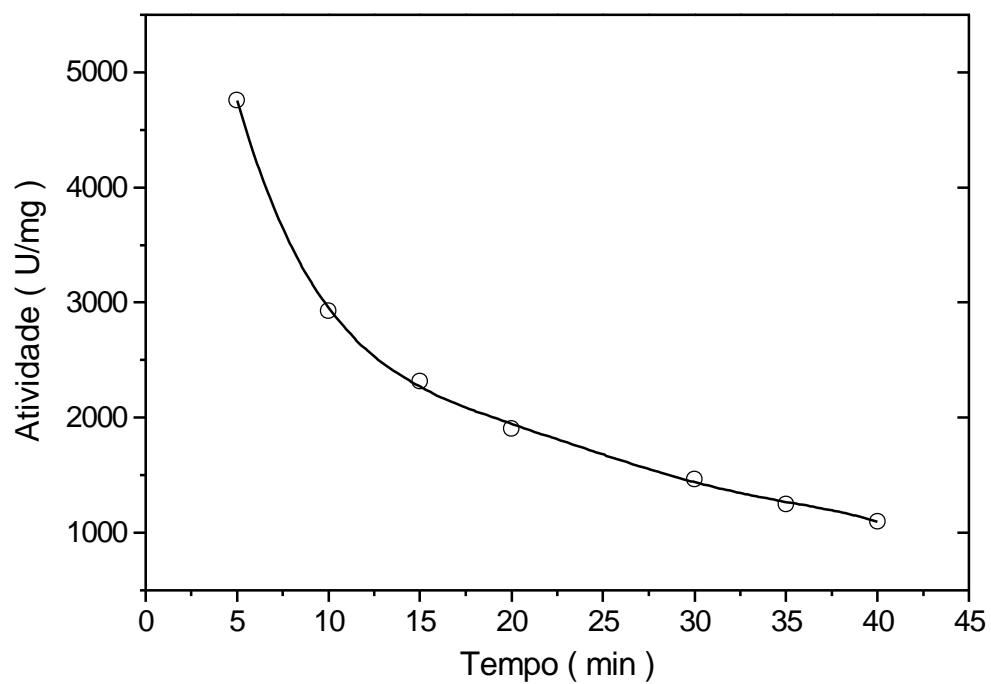


Figura 4.5. Influência do tempo de incubação na atividade hidrolítica da lipase livre. Ensaio realizado a 37°C, pH 7,0, substrato azeite de oliva 50%.

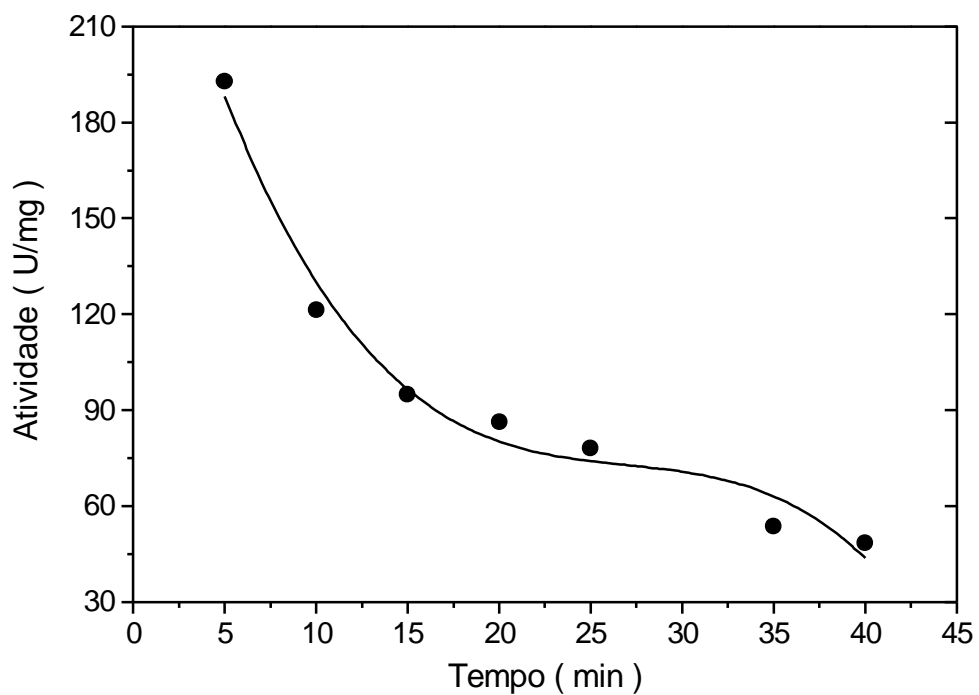


Figura 4.6. Influência do tempo de incubação na atividade hidrolítica da lipase imobilizada. Ensaio realizado a 37°C, pH 7,0, substrato azeite de oliva 50%.

Pode-se observar nas Figuras 4.5 e 4.6, que há um acentuado decréscimo da atividade tanto da enzima livre como imobilizada, podendo indicar uma desnaturação térmica ou uma inibição pelos produtos da reação, não avaliando-se nessas condições a atividade enzimática nos instantes iniciais da reação. Conseqüentemente, nos experimentos posteriores adotou-se o tempo de 5 minutos para a determinação da atividade hidrolítica da enzima lipase tanto na forma livre como imobilizada.

4.5. CARACTERIZAÇÃO EM MEIO AQUOSO: PROPRIEDADES HIDROLÍTICAS DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA

Como a principal característica das enzimas é a catálise das reações químicas e biológicas que ocorrem nos seres vivos, o estudo de sua função catalítica baseia-se na medida quantitativa da velocidade da reação em que participam. Devido à sua natureza protéica são altamente sensíveis às variações de pH, temperatura, concentração da própria enzima, entre outros. Portanto, o conhecimento da atuação desses parâmetros sobre a reação enzimática permite o melhor emprego das propriedades catalíticas das enzimas.

Qualquer que seja o método de imobilização de enzimas, deseja-se preservar, tanto quanto possível, a atividade biocatalítica e a especificidade da enzima. Apesar da superioridade das enzimas imobilizadas sobre as livres, o processo de imobilização pode modificar a cinética e as propriedades físico-químicas da enzima, normalmente, reduzindo sua atividade específica. Para verificar as alterações causadas nas propriedades originais da lipase livre, foi determinada a influência do pH e temperatura na atividade enzimática das lipases livre e imobilizadas bem como, estimado a estabilidade térmica e operacional.

4.5.1. Influência do pH

As enzimas somente são ativas numa faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido. O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas contém muitos grupos ionizáveis, elas existem em diferentes estados de ionização, por isso, a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH (HARTMEIER, 1988).

As enzimas imobilizadas também apresentam o comportamento típico das enzimas livres, porém o perfil de pH da enzima solúvel e imobilizada nem sempre coincide, uma vez que o processo de imobilização pode induzir a mudanças conformacionais, bem como alterar o estado de ionização e dissociação da enzima e seu macroambiente. Nos métodos de imobilização de enzimas, quando o suporte tem uma carga elétrica o comportamento cinético da enzima imobilizada pode diferir daquele observado para a enzima solúvel, mesmo na ausência de efeitos difusionais. Esta diferença deve-se às interações eletrostáticas no microambiente da enzima imobilizadas serem diferentes das existentes em solução (macroambiente) (HARTMEIER, 1988; ZANIN, 1989).

Na Tabela 4.3 apresentam-se os resultados obtidos no estudo da atividade da enzima lipase (*C. rugosa*) livre e imobilizada em quitosana (grau farmacêutico). A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.2, empregando-se azeite de oliva como substrato. Os ensaios foram realizados a 37°C, sendo a atividade determinada após um tempo de 5 minutos (item 3.6.1).

Na Tabela 4.3 e Figura 4.7 mostram-se a variação da atividade relativa em função do pH para a enzima lipase livre e imobilizada.

Tabela 4.3. Atividade (U/mg) e atividade relativa (%) em função do pH para a enzima lipase (*C. rugosa*) livre e imobilizada em quitosana (grau farmacêutico). Ensaio realizado a 37°C.

<i>pH</i>	<i>Solúvel</i>		<i>Imobilizada</i>	
	<i>Atividade (U/mg sólido)</i>	<i>Atividade relativa (%)</i>	<i>Atividade (U/mg suporte seco)</i>	<i>Atividade relativa (%)</i>
3,0	0	0	25,5	20,7
3,5	0	0	40,8	33,1
4,0	0	0	42,5	34,5
4,5	0	0	44,2	35,9
5,0	20,4	1,1	69,7	56,6
5,5	23,8	1,3	108,8	88,3
6,0	732,0	40	123,2	100
6,5	1098,0	60	70,8	57,4
7,0	1830,0	100	50,0	40,6
7,5	1573,8	86	41,5	33,7
8,0	1024,8	56	47,6	38,6
8,5	951,6	52	51,2	41,6
9,0	805,2	44	56,1	45,5

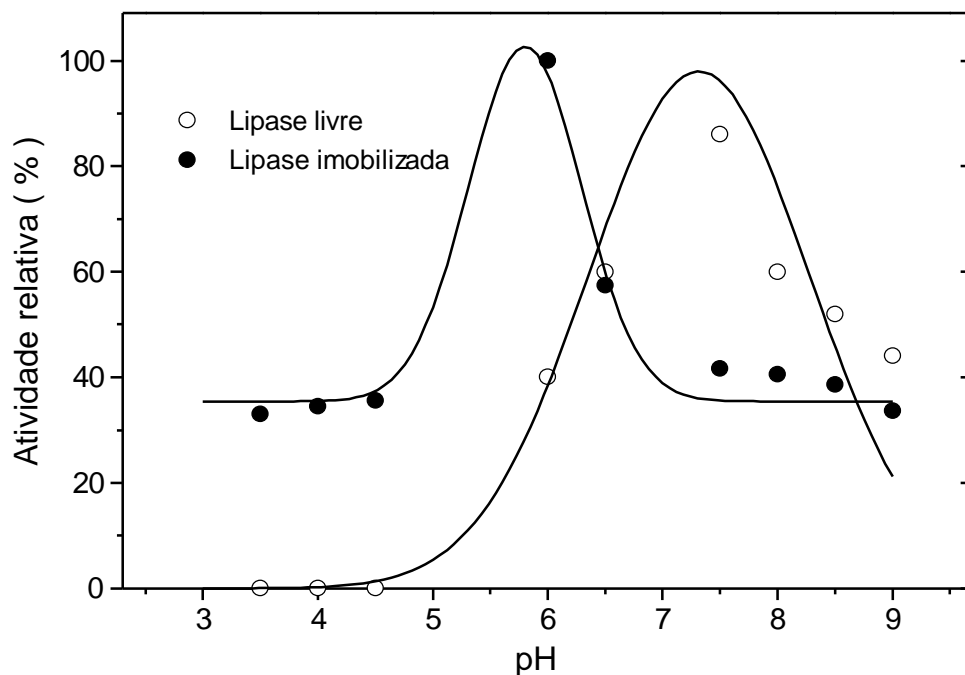


Figura 4.7. Influência do pH na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em quitosana, tomando como parâmetro referencial de 100% as atividades de 1830 U/mg sólido para lipase livre e 123 U/mg suporte seco para a lipase imobilizada. Ensaio realizado a 37°C.

Observa-se na Figura 4.7 que o processo de imobilização deslocou o pH em que a enzima apresenta atividade máxima de 7,0 (enzima livre) para 6,0 (enzima imobilizada). Esta mudança de comportamento pode estar associada às diferentes condições encontradas no micro e macroambiente da enzima (HARTMEIER, 1988; ZANIN e MORAES, 1989).

Na Tabela 4.3 e Figura 4.7 pode-se notar que o processo de imobilização conferiu uma maior estabilidade ao pH à enzima imobilizada, uma vez que em pH 3,0 a enzima imobilizada ainda apresentava cerca de 21% de atividade. Este fato corrobora o observado na literatura, que em muitos casos o processo de imobilização atua no sentido de aumentar a estabilidade ao pH (HARTMEIER, 1988).

O comportamento de deslocamento de pH ótimo encontrado neste trabalho é distinto ao descrito na literatura para a lipase (*P. fluorescens*) imobilizada em quitosana na qual não foi observada mudança de pH ótimo de atuação em relação à enzima livre (ITOYAMA *et al.*, 1994).

4.5.2. Influência da Temperatura

A influência da temperatura sobre a atividade da enzima livre ou imobilizada é, geralmente, representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura. A dependência da temperatura na atividade enzimática foi investigada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, numa faixa de temperatura entre 30 a 65°C. Na Tabela 4.4 e Figura 4.8 são apresentadas as temperaturas ótimas de atuação da lipase livre e da preparação imobilizada obtida neste trabalho. O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia apresentada no item 3.6.2.

Tabela 4.4 Atividade (U/mg) e atividade relativa (%) em função da temperatura para a enzima lipase livre e imobilizada em quitosana de grau farmacêutico, em pH 7,0.

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Enzima Livre</i>		<i>Enzima imobilizada</i>	
	<i>Atividade</i> (U/mg sólido)	<i>Atividade</i> <i>Relativa</i> (%)	<i>Atividade</i> (U/mg suporte seco)	<i>Atividade</i> <i>Relativa</i> (%)
30	1768,0	52,0	40,8	57,7
35	2992,0	88,0	42,5	60,0
37	3400,0	100,0	47,6	67,3
40	2788,0	82,0	54,4	76,9
45	2244,0	66,0	70,7	100
50	1475,6	43,4	58,2	82,3
55	1428,0	42,0	35,3	50,0
60	1448,4	42,6	32,6	46,2
65	1360,0	40,0	30,4	43,1

Nota-se na Tabela 4.4 e Figura 4.8 que a máxima atividade da lipase livre ocorreu a 37°C quando alcançou 3400 U/mg sólido, enquanto a lipase imobilizada em quitosana apresentou uma atividade máxima igual a 70,7 U/mg suporte seco a 45°C. Observa-se que o processo de imobilização atuou no sentido de aumentar a temperatura ótima da enzima, o que é muito favorável, pois quanto maiores as temperaturas de operação menores são os riscos de contaminação microbiana.

Na literatura são encontrados exemplos de alteração da temperatura ótima da

enzima livre e imobilizada tanto no sentido de aumento como diminuição. Por exemplo a enzima amiloglicosidase apresenta ótimos diferentes em função do tipo de substrato (amido, milho, batata, mandioca, entre outros) e do suporte empregado na imobilização (ZANIN, 1989; ZANIN e MORAES, 1989).

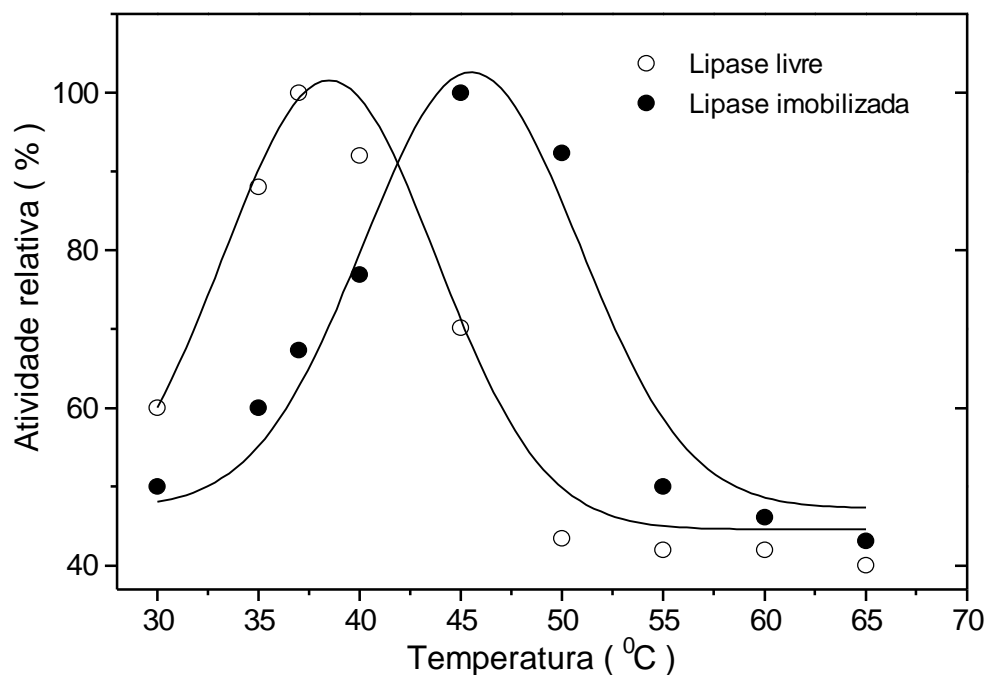


Figura 4.8. Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em quitosana, tomando como parâmetro referencial de 100% as atividades de 3400 U/mg sólido para lipase livre e 70 U/mg suporte seco para a lipase imobilizada. Hidrólise do azeite de oliva por 5 minutos em pH 7,0.

Os dados de atividade em função da temperatura, como os mostrados na Tabela 4.4 são úteis para se estudar o efeito da temperatura sobre uma reação enzimática. Estes podem ser analisados com o auxílio da relação de Arrhenius, onde o logaritmo da atividade é plotado em função do inverso da temperatura absoluta. Acima de um certo limite à medida que se aumenta a temperatura a atividade diminui, indicando a inativação da enzima pelo efeito térmico. Na região linear a atividade pode ser representada pela relação de Arrhenius (BAILEY e OLLIS, 1986; HARTMEIER, 1988; ZANIN, 1989):

$$A = A_0 \exp(-E_a/RT) \quad (4.1)$$

onde:

A_0 = constante de Arrhenius

A = atividade da enzima

E_a = energia de ativação da reação de hidrólise (cal/gmol)

R = constante da lei dos gases (1,987 cal/gmol K)

T = temperatura absoluta (K).

Em reações com alta energia de ativação o acréscimo da temperatura aumenta a velocidade da reação mais do que nas reações com baixa energia de ativação. Normalmente as energias de ativação para as reações enzimáticas situam-se entre 4-20 kcal/gmol, de tal modo que a velocidade da reação aumenta por um fator entre 1,2 e 2,9 a cada elevação de 10°C (DIXON e WEBB, 1979; HARTMEIER, 1988).

A partir dos dados de atividade apresentados na Tabela 4.4 foi possível calcular a energia de ativação da enzima livre e imobilizada. Estes resultados são mostrados nas Figuras 4.9 e 4.10. A energia de ativação foi calculada pela equação 4.1, conduzindo às seguintes equações de ajuste:

$$\text{enzima livre:} \quad A = 1,33 \times 10^6 \exp(-4983/RT), r^2 = 0,9994 \quad (4.2)$$

$$\text{enzima imobilizada:} \quad A_i = 6,47 \times 10^6 \exp(-3652/RT), r^2 = 0,9546 \quad (4.3)$$

Nota-se que a energia de ativação da reação de hidrólise com a enzima livre é da ordem de 9,90 kcal/mol enquanto para a enzima imobilizada é cerca de 7,26 kcal/mol, portanto da ordem de 27% menor do que aquela da enzima livre. Uma energia de ativação menor em relação à enzima livre, pode ser um indicativo de resistência difusional de produto e substrato no caso da enzima imobilizada (MESSING, 1975). Os valores de energia de ativação encontrados para a enzima lipase livre como imobilizada situam-se na faixa daqueles usados para a maioria das enzimas.

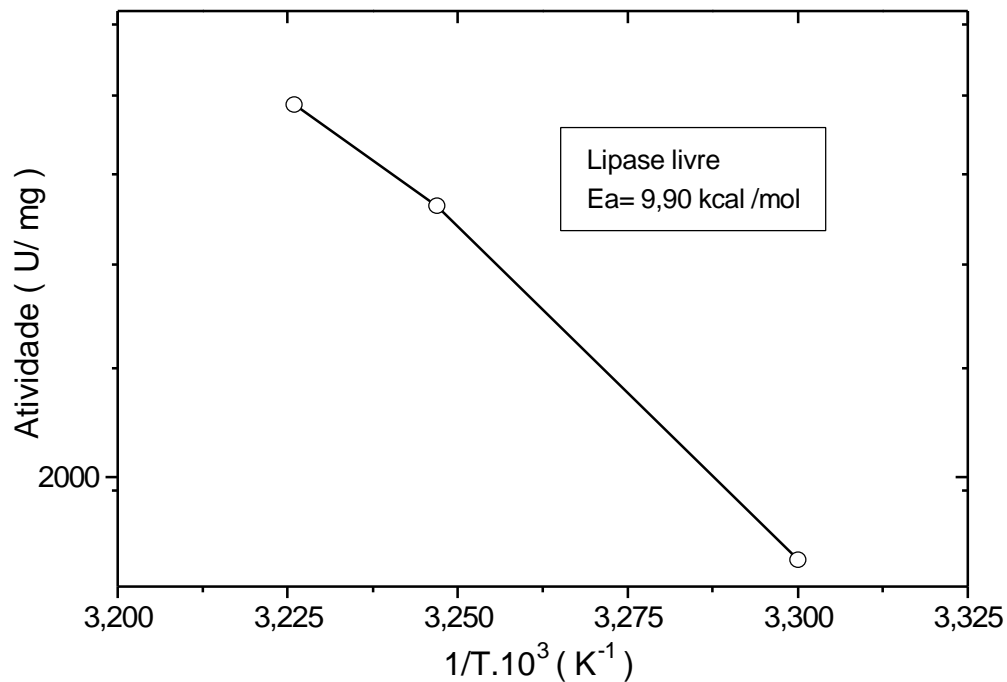


Figura 4.9. Gráfico de Arrhenius para a enzima lipase (*Candida rugosa*) livre, solução de azeite de oliva 50%, pH 7,0

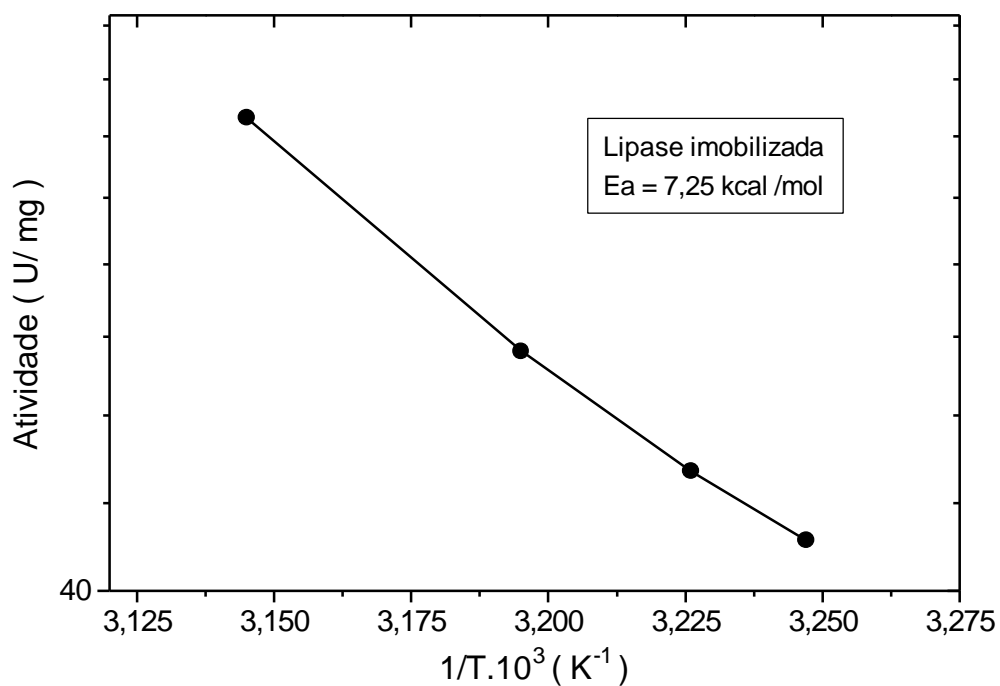


Figura 4.10. Gráfico de Arrhenius para a enzima lipase imobilizada em quitosana, solução de azeite de oliva 50%, pH 7,0.

4.5.3. Estabilidade Térmica

Um aumento de temperatura, geralmente corresponde a um aumento na taxa de reação por unidade de enzima imobilizada. Entretanto, um aumento de temperatura também pode promover aumento na taxa de desnaturação térmica da lipase, portanto, reduzindo a taxa de formação de produto. A estabilidade térmica foi verificada por meio da determinação das atividades residuais após a incubação numa faixa de temperatura entre 37-60°C em meio aquoso (tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0) por um período máximo de 2 horas. A atividade residual foi determinada a 37°C por 5 minutos, de acordo com a metodologia apresentada no item 3.6.3.

Nas Tabelas 4.5 e 4.6 apresentam-se as atividades da enzima lipase livre e imobilizada. Estes resultados são plotados nas Figuras 4.10 e 4.11. No Apêndice 8 são mostrados os valores de atividade que originaram os dados mostrados nas Tabelas 4.5 e 4.6.

Tabela 4.5. Evolução da atividade residual da lipase livre em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas (Tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,0).

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Atividade</i> (U/mg sólido)		<i>Atividade Relativa</i> (%)	
	1 h	2 h	1 h	2h
37	3400	3400	100	100
40	5100	3597	100	100
45	2021	1770	59,5	52,1
50	1279	1082	37,5	31,8
55	623	459	18,3	13,5
60	294	197	8,7	5,8

Tabela 4.6. Evolução da atividade residual da lipase imobilizada em quitosana em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas (Tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,0).

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Atividade</i> (U/mg suporte seco)		<i>Atividade Relativa</i> (%)	
	1 h	2 h	1 h	2h
37	51,4	51,4	100	100
40	69,9	38,3	100	74,5
45	32,8	36,1	63,8	70,2
50	27,3	20,8	53,2	40,4
55	22,9	19,7	44,7	38,3
60	22,9	18,6	44,7	36,2

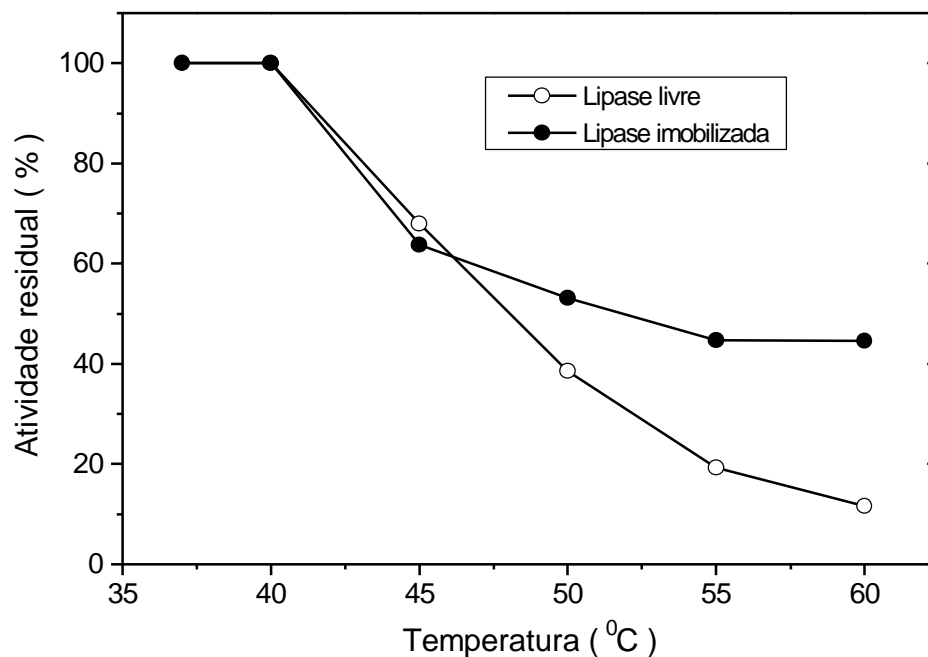


Figura 4.11. Estabilidade térmica das lipases livre e imobilizada após 1 hora de incubação nas temperaturas de 37-60°C, tomando como parâmetro referencial de 100%, as atividades de 3400 U/mg sólido para a lipase livre e 51,4 U/mg suporte seco para a lipase imobilizada.

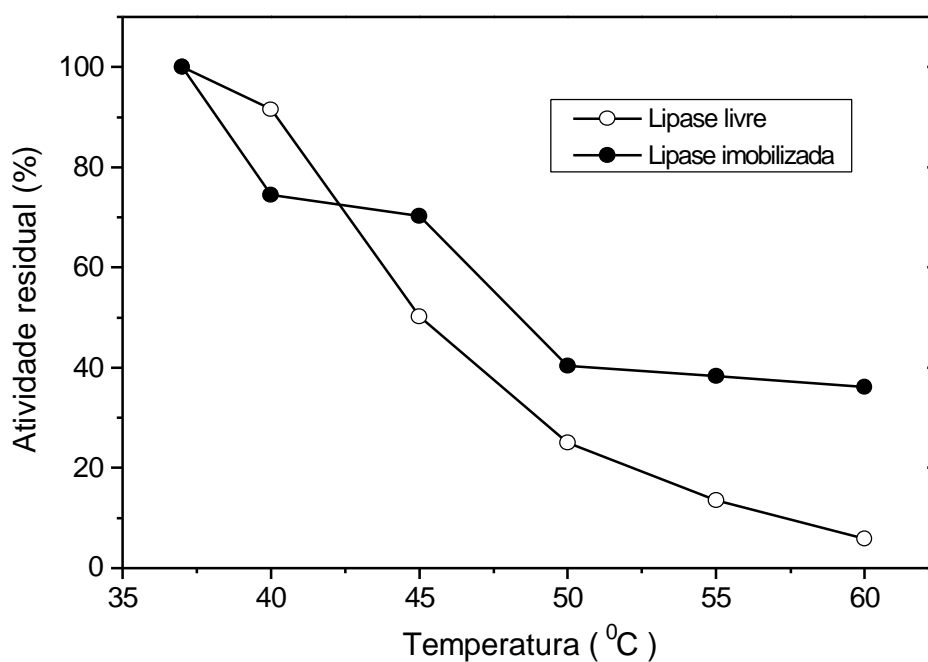


Figura 4.12. Estabilidade térmica das lipases livre e imobilizada após 2 horas de incubação nas temperaturas de 37-60°C, tomando como parâmetro referencial de 100%, as atividades de 3400 U/mg sólido para a lipase livre e 51,4 U/mg suporte seco para a lipase imobilizada.

Observa-se na Tabela 4.5 e Figuras 4.11 e 4.12 que em pH 7,0 a 60°C a lipase livre, após 120 minutos de incubação está praticamente desnaturada, restando apenas da ordem de 6% de sua atividade inicial. Por outro lado, a análise da Figura 4.8 e Tabela 4.4 mostra que a 60°C a enzima ainda apresenta uma atividade significativa (da ordem de 43% em relação à atividade a 37°C), porém sua estabilidade térmica é muito baixa, o que inviabiliza a utilização da enzima por tempos superiores a 5 ou 10 minutos.

Para a enzima livre os resultados mostrados na Tabela 4.5 e Figuras 4.11 e 4.12 sugerem que a enzima poderia ser utilizada num processo, por um período de até 120 minutos, a 40°C pois ainda teria da ordem de 52% de sua atividade inicial.

A análise da Tabela 4.6 e Figuras 4.11 e 4.12, para o caso da enzima lipase imobilizada em quitosana e incubada em solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), mostra que após 120 minutos de incubação a 60°C a enzima ainda apresenta, aproximadamente 36% de sua atividade inicial contra apenas 6% da enzima livre.

A partir dos resultados mostrados nas Tabelas 4.5 e 4.6 calculou-se a constante de inativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a enzima lipase livre e imobilizada. O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima.

A constante de inativação (k_d) foi calculada pela equação 4.4 e o tempo de meia-vida pela equação 4.5. Estes resultados são mostrados na Tabela 4.7.

$$A_{in} = A_{in0} \exp (-K_d \cdot t) \quad (4.4)$$

$$t_{1/2} = \ln 0,5 / -k_d \quad (4.5)$$

Tabela 4.7. Constantes de inativação térmica da lipase livre e imobilizada em quitosana em meio aquoso (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0), após 1 hora de incubação.

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Constante de inativação (k_d)</i> (h ⁻¹)		<i>Tempo de meia vida (t_{1/2})</i> (h)	
	Livre	Imobilizada	Livre	Imobilizada
40	-	-	-	-
45	0,52	0,45	1,33	1,54
50	0,98	0,63	0,71	1,10
55	1,69	0,81	0,41	0,86
60	2,45	0,83	0,28	0,86
65	2,50	1,00	0,28	0,69

Nota-se na Tabela 4.7 que a perda da atividade catalítica para a enzima livre é bem superior que a aquela da enzima imobilizada, para temperaturas iguais ou inferiores a 50°C. Este fato demonstra que o procedimento de imobilização em quitosana confere à lipase maior estabilidade térmica, apesar dos valores das constantes de inativação térmica de ambas preparações tenderem para um mesmo valor para temperaturas superiores a 55°C.

Os dados de constante de inativação térmica (k_d) em função da temperatura permitem o cálculo da energia de desnaturação térmica da enzima (E_D) aplicando-se um raciocínio análogo àquele para obtenção da energia de ativação. Na maioria dos trabalhos realizados nesta área supõe-se que a velocidade de desnaturação é de primeira ordem em relação à concentração da enzima ativa e segue uma lei do tipo de Arrhenius (ZANIN *et al.*, 1998). A partir desta hipótese a velocidade de desnaturação térmica da enzima lipase pode ser representada pelas equações 4.6 e 4.7:

$$r_d = - k_d A \quad (4.6)$$

$$k_d = k_0 \exp (- E_D/RT) \quad (4.7)$$

onde:

A = atividade da enzima

E_D = energia de desnaturação térmica da enzima (cal/mol)

k_d = constante de desnaturação da enzima em uma determinada temperatura

k_0 = fator pré -exponencial

r_d = velocidade de desnaturação térmica da enzima.

Com os resultados apresentados na Tabela 4.7 construiu-se o gráfico tipo Arrhenius para a enzima lipase livre e imobilizada (Figuras 4.13 e 4.14).

A análise da Figura 4.13 e Tabela 4.7 mostra que a enzima lipase livre apresenta inativação térmica em temperaturas superiores a 55°C, indicando que o maior aproveitamento da atividade enzimática ocorre para temperaturas inferiores a 55°C.

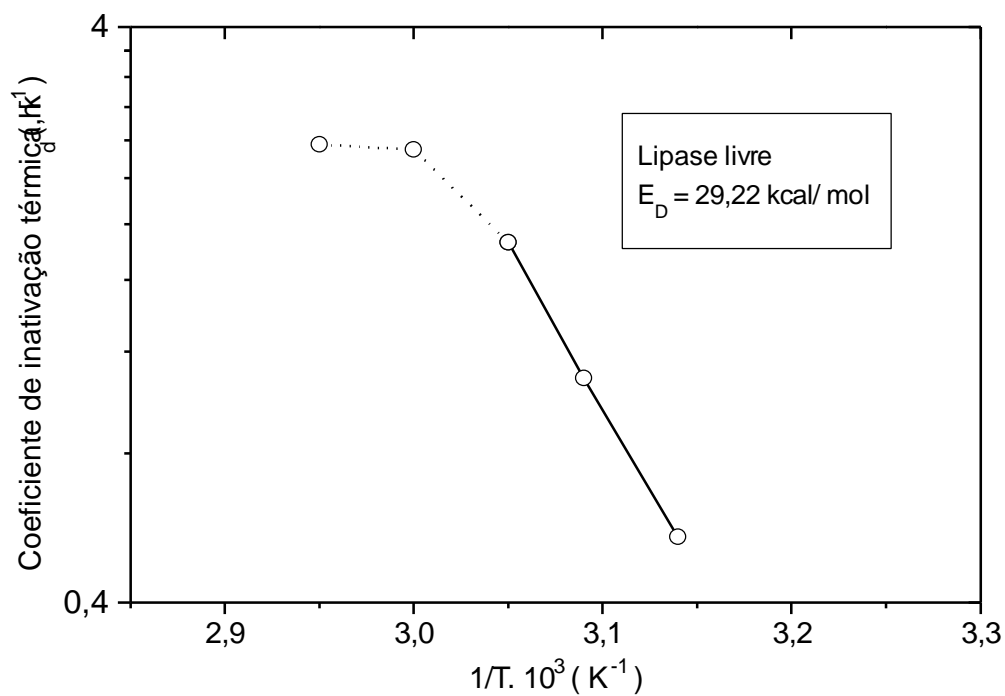


Figura 4.13. Energia de desnaturação térmica da enzima lipase livre (solução de azeite de oliva 50% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0)

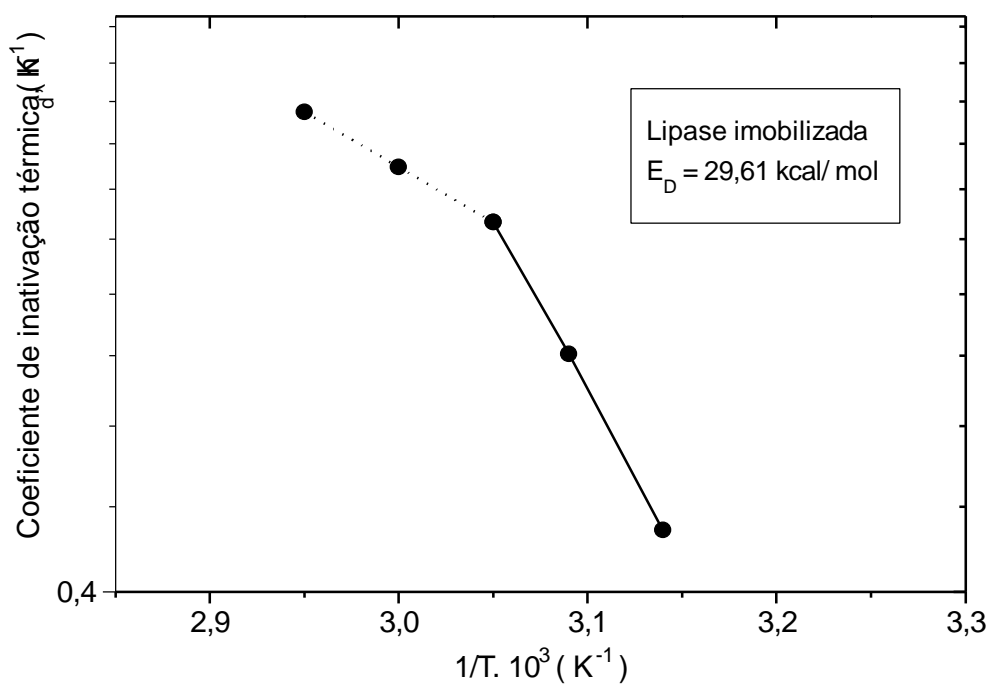


Figura 4.14. Energia de desnaturação térmica da enzima lipase immobilizada (solução de azeite de oliva 50% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0)

A equação tipo Arrhenius ajustada aos dados experimentais mostrados na Figura 4.13, para faixa de temperatura de 40° a 50° C é:

$$k_d = 9,96 \times 10^{18} \exp(-29221/RT), \quad r^2 = 0,9999 \quad (4.8)$$

Observa-se na Tabela 4.7 e Figura 4.14 que a lipase imobilizada em quitosana apresenta inativação térmica em temperaturas superiores a 55°C, sendo que para este caso a equação tipo Arrhenius ajustada aos resultados mostrados na Figura 4.14. para a faixa de temperatura de 50° a 60° C, é:

$$k_d = 5,15 \times 10^{18} \exp(-29615/RT), \quad r^2 = 0,9032 \quad (4.9)$$

O valor da energia de desnaturação térmica da enzima lipase, na forma livre ($E_D=29,22$ kcal/mol) é praticamente igual ao da enzima imobilizada ($E_D=29,62$ kcal/mol), indicando que a enzima lipase é bastante sensível à desnaturação em temperaturas superiores a 50°C.

4.5.4. Influência da Concentração do Substrato

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica da lipase livre e imobilizada e a ocorrência de algum tipo de inibição, a porcentagem do azeite de oliva foi variada na faixa de 10% a 70%. Os ensaios foram conduzidos em pH 7,0 e temperatura de 37°C, conforme descrito anteriormente (3.4.2).

Por meio desses ensaios, é possível deduzir um mecanismo cinético da reação, isto é, a ordem na qual os substratos se ligam e os produtos se liberam da enzima e se esta ordem é obrigatória. Por cinética enzimática entende-se o estudo da determinação quantitativa do efeito de cada um dos fatores que influenciam a atividade enzimática, avaliada a partir do aumento ou redução da velocidade da reação catalisada, no caso a hidrólise do azeite de oliva. A atividade da enzima, e portanto a cinética enzimática envolve a concentração da enzima e do substrato. Nas Figuras 4.15 e 4.16 são apresentadas as atividades enzimáticas em função da concentração do substrato preparado nas proporções apresentadas no Apêndice 9.

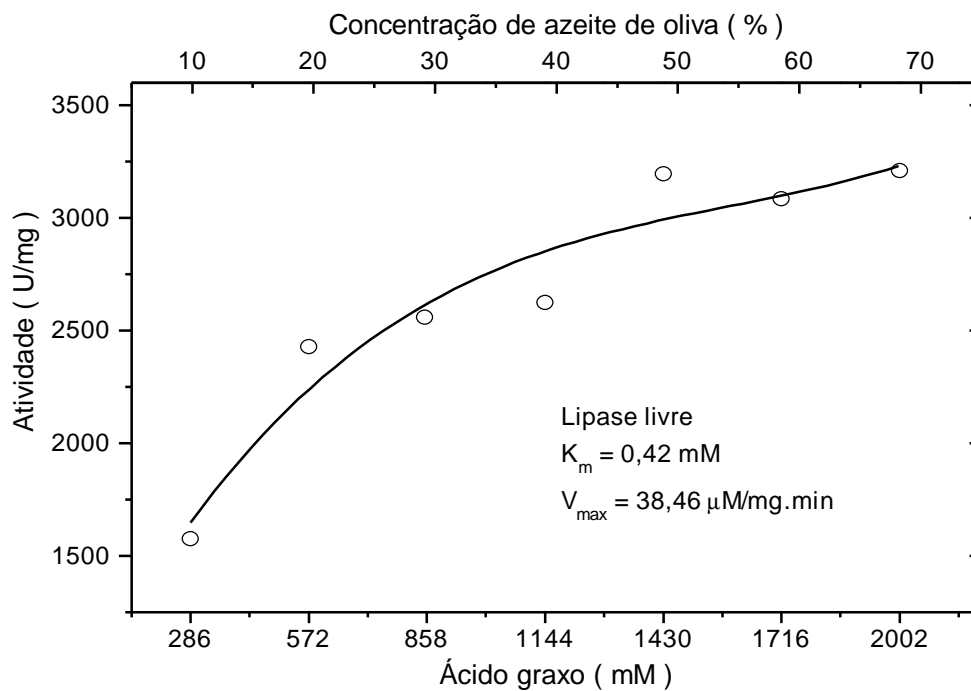


Figura 4.15. Atividade hidrolítica da lipase livre em função da concentração de azeite de oliva no substrato (37°C).

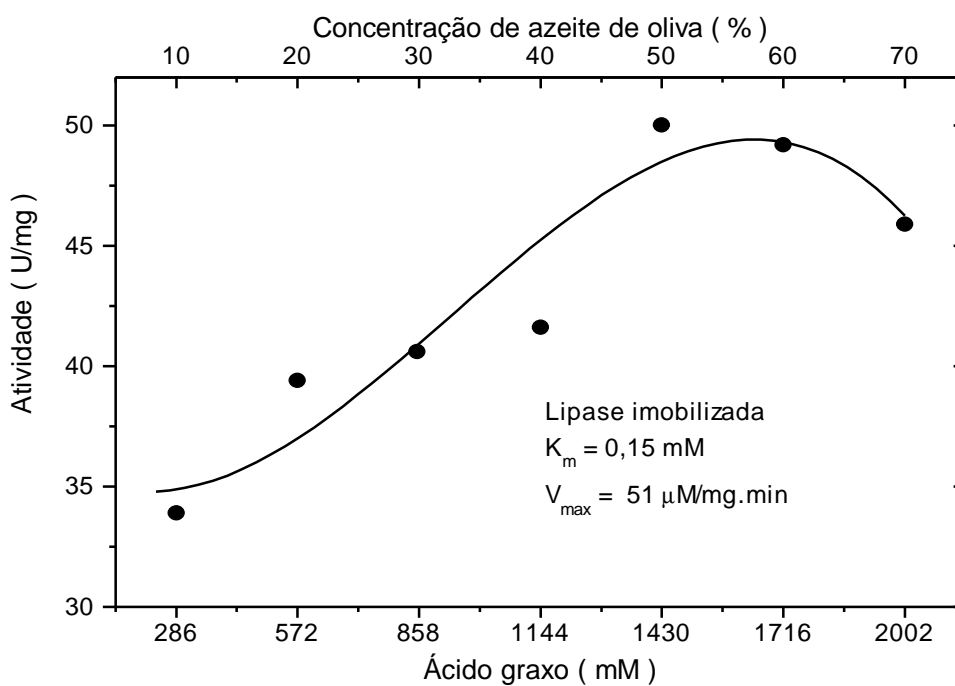


Figura 4.16. Atividade hidrolítica da lipase imobilizada em função da concentração de azeite de oliva no substrato (37°C).

Os resultados mostrados na Figura 4.15 sugerem que a atividade da lipase livre em função da concentração de azeite de oliva segue uma cinética do tipo Michaelis- Menten, indicando que na faixa de concentração estudada, e no tempo de reação hidrolítica (5 minutos), não se detecta uma possível inibição por produtos de reação ou pela presença de água.

Para o caso da enzima imobilizada observa-se um comportamento, que sugere uma inibição pelo substrato da reação, para concentração de azeite de oliva superiores a 50%, quando a atividade sofre um ligeiro decréscimo. Isto pode ser um indicativo de inibição por substrato ou resistência difusional. Este fato ainda necessita ser melhor explorado.

Na literatura não são encontrados dados desta natureza, o que mostra a complexidade da interpretação da cinética da enzima lipase.

A partir do gráfico dos recíprocos do tipo Lineawer-Burk, do inverso da atividade ($1/A$) em função do inverso da concentração de substrato ($1/S$) (Apêndice 9) foi possível calcular as constantes de afinidade (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}), expressa para a lipase livre que foi igual a 0,42 mM e 38,46 $\mu\text{M}/\text{mg}\cdot\text{min}$, e para a lipase imobilizada foi de 0,15 mM e 51 $\mu\text{M}/\text{mg}\cdot\text{min}$.

4.5.5. Estabilidade à Estocagem

Normalmente as enzimas imobilizadas mantém sua atividade em condições de estocagem, quando não são expostas à condições adversas de pH e temperatura. A estabilidade à estocagem das enzimas imobilizadas em solução ou seca, geralmente é superior àquela da enzima livre, porém depende do método de imobilização, do suporte e da solução em que está estocada (CHIBATA, 1978).

As lipases livre e imobilizada foram mantidas numa temperatura de 4°C por 30 dias, sendo estocadas em diferentes condições: ausência de qualquer componente, em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e heptano. A atividade residual de ambas preparações após 30 dias de estocagem foi dosada empregando-se o método de hidrólise do azeite de oliva, conforme descrito no item 3.4.2. Na Tabela 4.8 são mostrados os resultados do acompanhamento da atividade durante o período de estocagem.

Tabela 4.8. Efeitos das condições de estocagem na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada

<i>Condição de Estocagem</i>	<i>Lipase livre^a</i>		<i>Lipase imobilizada^b</i>	
	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)
Seca	5838	100	33,9	65,9
Heptano (puro)	3083	90,7	45,9	89,4
Tampão Fosfato	2886	84,9	37,2	72,3

^aAtividade inicial: 3400 U/mg sólido (tomando como referencial 100% ativa)

^bAtividade inicial: 51,4 U/mg suporte seco (tomando como referencial 100% ativa)

Como pode-se observar na Tabela 4.8, os resultados obtidos mostraram que para a lipase imobilizada em quitosana uma maior estabilidade de estocagem foi alcançada para as amostras armazenadas em solução (heptano e tampão), ao passo que a lipase livre permaneceu com sua atividade relativamente alta em todas as condições de estocagem testadas. Esses dados diferem dos encontrados na literatura, onde geralmente são descritos uma estabilidade de estocagem superior para as enzimas imobilizadas. Entretanto, deve ser considerado que este comportamento depende do método de imobilização, do suporte e da solução em que é estocada. De um modo geral, as enzimas imobilizadas em suportes inorgânicos por meio de ligação covalente são mais estáveis do que as imobilizadas em suporte orgânicos (CHIBATA, 1978).

4.5.6. Estabilidade Operacional

A estabilidade operacional é um parâmetro de fundamental importância quando se pretende utilizar industrialmente uma enzima imobilizada (KENNEDY e WHITE, 1985). Um dos objetivos principais de se imobilizar uma enzima é aumentar seu tempo de utilização em relação à enzima livre, mantendo estável o par enzima-suporte num maior número possível de reações consecutivas. A estabilidade operacional da lipase imobilizada em quitosana foi testada na reação de hidrólise do azeite de oliva (10 min/ 37°C), conforme mostrado na Figura 4.17, tendo sido verificado um tempo de meia-vida de 5 horas, indicando uma dessorção da enzima do suporte.

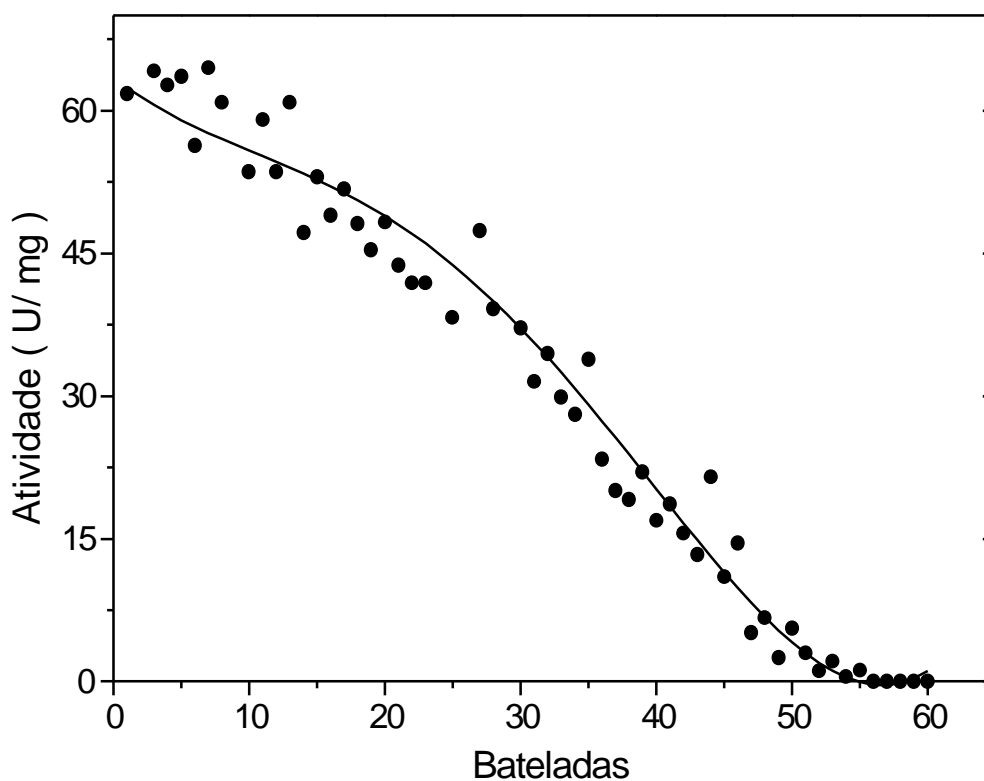


Figura 4.17. Estabilidade operacional da lipase imobilizada em meio aquoso (hidrólise de azeite de oliva, ciclos de 10 minutos a 37°C).

As principais características da lipase microbiana imobilizada em quitosana de grau farmacêutico descritas nas seções anteriores são sumarizadas na Tabela 4.9. Esses dados indicam que a lipase *Candida rugosa* quando imobilizada em suportes hidrofílicos, como a quitosana, produz preparações imobilizadas menos ativas, e estáveis que as obtidas com suportes hidrofóbicos (copolímero de estireno-divinilbenzeno e sílica de porosidade controlada), conforme pode ser observado por meio de uma comparação dos dados apresentados nesta tabela e na Tabela 2.11.

Tabela 4.9. Propriedades catalíticas da lipase imobilizada em quitosana

Tipo de suporte	Quitosana de grau farmacêutico
Ativação do suporte	-
Método de imobilização	Adsorção física
Meio de dispersão	Hexano
Rendimento de imobilização	17%
Atividade da enzima imobilizada	51,4 U/mg suporte seco
Teor de água	10-20 %
pH ótimo	5,5-6,0
Temperatura ótima	45°C
Constante de inativação térmica a 50°C	0,63 h ⁻¹
Tempo de meia-vida a 50°C	1,1 horas
K _m	0,15 mM
V _{max}	51 μM/mg.min
Estabilidade operacional (hidrólise, t _{1/2} a 37°C)	5 horas

4.6. CARACTERIZAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO: APLICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA NA SÍNTESE DE ÉSTERES AROMATIZANTES

A síntese de ésteres por via enzimática envolve um mecanismo complexo dependente do tipo de substrato, enzima, solvente orgânico e concentração do meio reacional. Para verificar a atividade catalítica da preparação de lipase imobilizada em quitosana, inicialmente foram testados diferentes doadores do grupo acila e nucleofílicos. O sistema que apresentou melhor rendimento foi selecionado para estudo mais detalhado, sendo determinada a influência da temperatura, massa de lipase imobilizada e razão molar entre ácido e álcool no rendimento de formação do éster desejado. Em seguida, a estabilidade operacional da lipase imobilizada foi verificada em meio orgânico, adotando como modelo o sistema anteriormente selecionado. Finalmente foi efetuada uma comparação do desempenho da lipase livre, imobilizada em quitosana e o da Lipozyme na síntese de ésteres aromatizantes. Estes ensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita no item 3.7.

4.6.1. Seleção do Sistema Reacional

Inicialmente, foi verificada a influência do tamanho da cadeia do ácido graxo na esterificação do butanol. As sínteses foram realizadas pela incubação do butanol e ácidos numa razão molar fixa (1:1,5) com lipase microbiana imobilizada em quitosana (0,5 gramas, massa seca), numa temperatura de 37°C. Na Tabela 4.10 são mostrados os valores iniciais e finais da concentração de butanol, ácido graxo e teor de água. Na Figura 4.18 os resultados obtidos, para o consumo de butanol são plotados em função do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo.

A análise da Tabela 4.10 e Figura 4.18 mostra que após 24 horas, os diferentes ácidos testados (C_2 a C_{12}) conduziram a conversões similares do butanol, compreendidas entre 40-45%. A única exceção foi referente ao emprego do ácido acético como substituinte no grupo acila, sendo que o butanol neste caso não foi consumido.

Tabela 4.10. Influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo no grau de esterificação do n-butanol (0,30 M); lipase imobilizada (0,5 g massa seca), 37°C, tempo de reação 24 h.

<i>Doador do grupo acila</i>	<i>Tempo (h)</i>	<i>Butanol</i>			<i>Ácido graxo</i>			<i>Água</i>
		(g/l)	(mM)	(%)	(g/l)	(mM)	(%)	(%)
Ácido acético (C_2)	0	19,91	270	-	24,00	400	-	1,98
	24	22,86	310	-	11,41	190	52,5	2,21
Ácido butírico (C_4)	0	19,88	270	-	42,11	480	-	2,42
	24	11,60	160	40,74	19,65	220	53,33	3,86
Ácido oenântico (C_7)	0	19,92	270	-	62,91	480	-	3,12
	24	11,86	160	40,80	46,87	360	25,50	3,40
Ácido octanóico (C_8)	0	19,21	260	-	61,30	425	-	2,50
	24	10,55	142	45,10	40,38	280	34,12	2,40
Ácido pelargônico (C_9)	0	19,67	266	-	74,60	471	-	2,48
	24	11,04	150	43,87	55,13	348	26,10	1,89
Ácido caprílico (C_{10})	0	19,49	260	-	79,55	460	-	2,76
	24	10,58	142	45,70	56,85	330	28,53	1,93
Ácido láurico (C_{12})	0	19,90	268	-	92,50	460	-	2,39
	24	10,92	147	45,12	68,11	340	26,36	2,13

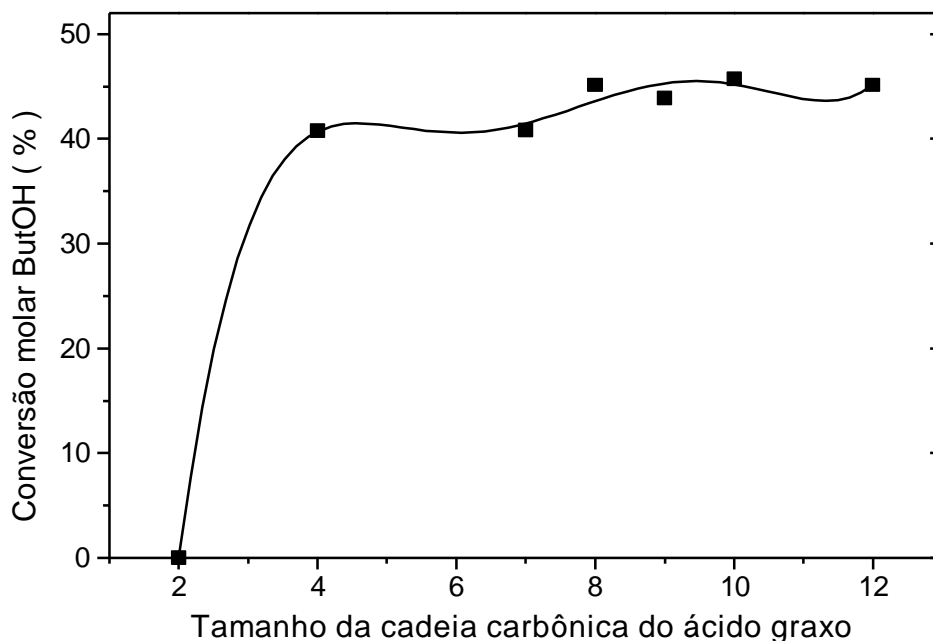


Figura 4.18. Efeito do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo na esterificação com o butanol (conversão molar do butanol, após 24 horas a 37°C).

Resultados similares foram reportados na literatura (OGUNTINEIN *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 1997a) empregando lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (Novozym, Lipozyme). Segundo alguns autores (WELSH *et al.*, 1989; CASTRO *et al.*, 1997a) a presença de ácido acético no meio reacional pode ocasionar danos na camada de hidratação da interação camada-protéica ou na estrutura da enzima, resultando numa inibição parcial ou total da preparação enzimática. Esse efeito negativo, pode ser atribuído à alta polaridade do ácido acético ($\log P = -0,23$), o que ocasiona uma partição (migração) do ácido para a fase sólida (enzima/ suporte), resultando numa saturação do microambiente da enzima. Desta forma, a água contida na preparação enzimática é parcialmente removida, ocorrendo redução da atividade da lipase. Além disso, pode ocorrer uma redução da disponibilidade de ácido acético na fase líquida interrompendo a reação de esterificação. Assim os fenômenos de partição causam a modificação do estado original de hidratação enzimática e um aparente desequilíbrio entre a taxa de conversão e disponibilidade do ácido no meio reacional.

Para melhor exemplificar estes fenômenos, na Tabela 4.11 são mostrados os resultados obtidos referentes ao consumo em moles do butanol e de todos os ácidos

testados. Se para cada mol de éster formado é consumido um mol de álcool e um mol de ácido, apenas no caso do ácido acético, esta proporcionalidade entre álcool/ ácido consumido, não foi verificada.

Tabela 4.11. Comparação do consumo butanol e ácido durante a esterificação do butanol com diferentes ácidos orgânicos.

<i>Tipo de ácido</i>	<i>Consumo (moles)</i>	
	Butanol	Ácido
Acético (C ₂)	0	210
Butírico (C ₄)	110	260
Oenântico (C ₇)	110	120
Octanóico (C ₈)	118	145
Pelargônico (C ₉)	116	123
Cáprico (C ₁₀)	118	130
Láurico (C ₁₂)	121	120

Na seqüência verificou-se a influência do tamanho da cadeia do álcool na síntese de ésteres de butirato. Estes resultados são mostrados na Tabela 4.12 e Figura 4.19. Neste caso o doador do grupo acila foi o ácido butírico.

Tabela 4.12. Influência do tamanho da cadeia carbônica do álcool no grau de esterificação do ácido butírico. (Ácido butírico 0,45 M; lipase imobilizada em quitosana (0,5 gramas massa seca, 37°C, tempo de reação de 24 h).

<i>Nucleofílico</i>	<i>Tempo (horas)</i>	<i>Ácido Butírico</i>			<i>Teor de Água (%)</i>
		(g/l)	(mM)	(%)	
Etanol (C ₂)	0	46,54	530	-	3,21
	24	34,19	390	26,41	1,42
Butanol (C ₄)	0	48,76	550	-	2,92
	24	24,75	280	49,10	1,88
Hexanol (C ₆)	0	31,68	360	-	2,21
	24	16,74	190	47,15	1,58
Octanol (C ₈)	0	31,68	360	-	1,79
	24	16,68	190	47,35	1,95
Citronelol (C ₁₀)	0	29,04	330	-	3,06
	24	15,96	180	45,04	3,04

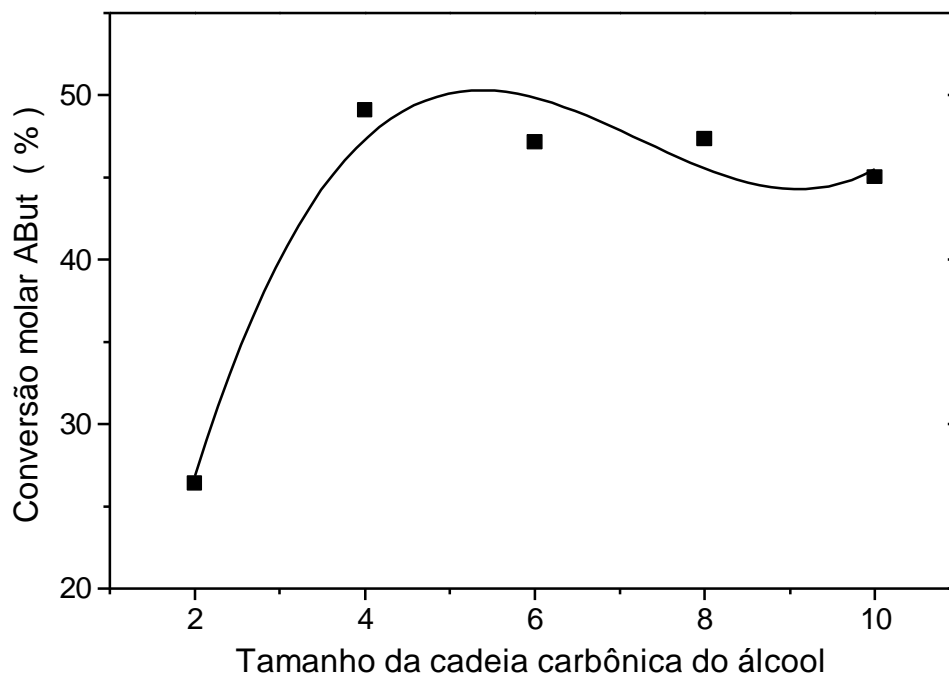


Figura 4.19. Efeito do tamanho da cadeia carbônica do álcool na esterificação com o ácido butírico (conversão molar do ácido butírico após 24 horas a 37°C).

Após 24 horas de reação do ácido butírico e álcoois numa razão molar fixa (1,5: 1) com lipase microbiana imobilizada em quitosana (0,5 gramas), numa temperatura de 37°C, os diferentes álcoois (C₂ a C₁₀) promoveram conversões de ácido butírico superiores a 40%, com exceção do etanol que apresentou uma conversão molar de apenas 26%. Este resultado, provavelmente deva-se ao alto poder desidratante do etanol ocasionando efeitos similares, porém menos severos aos descritos anteriormente para o ácido acético.

Tomando por base esses resultados, selecionou-se o sistema reacional constituído de butanol e ácido butírico, para se estudar a síntese de ésteres catalisada por esta preparação experimental de lipase imobilizada.

4.6.2. Síntese do Butirato de Butila

A partir da técnica de planejamento de experimentos foi possível avaliar a influência dos parâmetros mais significativos no rendimento da esterificação do butanol com ácido butírico, utilizando a preparação experimental de lipase imobilizada. Foi determinada a influência da temperatura (X₁), da massa de lipase imobilizada (X₂) e da razão molar entre

ácido butírico e butanol (X_3) no rendimento de formação do éster. Na Tabela 4.13 são apresentadas as concentrações de butirato de butila formado após 20 horas de reação para as diversas condições testadas. No Apêndice 11 são mostrados os resultados intermediários.

Tabela 4.13. Matriz padrão para o experimento de síntese de butirato de butila pela lipase imobilizada em quitosana. Volume de substrato 20 ml; butanol 300 mM; 20 horas de reação. Lipase imobilizada 23,5 U/mg suporte seco.

<i>Ensaio</i>	X_1	X_2	X_3	T (°C)	<i>Lipase</i> (gramas)	<i>Razão molar</i> (<i>ButOH: AcBut</i>)		<i>Butirato de butila</i> (g/l)
1	-1	-1	-1	37	0,25	300	300	9,30
2	+1	-1	-1	50	0,25	300	300	8,24
3	-1	+1	-1	37	0,50	300	300	21,37
4	+1	+1	-1	50	0,50	300	300	19,21
5	-1	-1	+1	37	0,25	300	600	13,55
6	+1	-1	+1	50	0,25	300	600	9,71
7	-1	+1	+1	37	0,50	300	600	26,00
8	+1	+1	+1	50	0,50	300	600	20,11
9	0	0	0	43	0,37	300	450	17,11
10	0	0	0	43	0,37	300	450	18,67
11	0	0	0	43	0,37	300	450	19,70

O efeito individual dos fatores experimentais e de suas interações sobre a formação de butirato de butila, foi avaliado estatisticamente pelo Programa Statgrafic 6.0 (Tabelas 4.14 e 4.15).

Tabela 4.14. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 e seus erros padrão

<i>Variável</i>	<i>Efeitos</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Valores de t</i>
Média	16,62	$\pm 0,64$	25,97
Temperatura (X_1)	3,26	$\pm 1,49$	2,18
Massa de lipase (X_2)	11,45	$\pm 1,49$	7,68*
Razão molar (X_3)	2,78	$\pm 1,49$	1,86
X_1X_2	-0,81	$\pm 1,49$	0,54
X_2X_3	-0,07	$\pm 1,49$	0,05
X_1X_3	-1,65	$\pm 1,49$	1,11

Valor t = efeito/ erro padrão

Significativo ao nível de 5% de probabilidade (t = 3,18).

Tabela 4.15. Análise de variância

<i>Efeitos</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma Quadrática dos Fatores</i>	<i>Soma Média Quadrática</i>	<i>F</i>	<i>Nível de Significância</i>
X ₁	1	21,32	21,32	4,75	0,09
X ₂	1	261,97	261,98	58,34	0,001*
X ₃	1	15,51	15,51	3,45	0,14
X ₁ X ₂	1	1,33	1,33	0,30	0,62
X ₁ X ₃	1	5,48	5,48	1,22	0,33
X ₂ X ₃	1	0,01	0,01	0	0,96
Erro total	4	17,96	4,49		

Total (corrigido)= 323,59

R²=0,944

F = S.M.Q.F._{efeito} / S.M.Q.F._{erro}

A Tabela 4.14 reúne os dados da análise dos efeitos, estimativa de erro padrão e o teste t de Student's (BOX *et al.*, 1978). Pelo teste t, verifica-se que a variável massa de lipase (X₂) apresenta uma influência significativa ao nível 5% de probabilidade (t=7,18). As outras duas variáveis bem como todas as interações não apresentaram efeitos significativos, isto é, t < 3, 18.

A análise dos dados apresentados na Tabela 4.15, mostrou que o fator mais significativo na formação de butirato de butila foi a massa de enzima; sendo o resultado positivo representado pelo nível alto (+) massa igual a 0,5 gramas. Dentro da região experimental avaliada, não há evidência de interação da massa de lipase com os outros dois fatores. Portanto, esse efeito pode ser interpretado isoladamente, tendo em vista que o aumento da massa de lipase 0,25 para 0,5 gramas promovem um aumento médio de 11,0 g/l na formação de butirato de butila e não há evidência de que este aumento dependa dos níveis das outras variáveis.

Com relação à temperatura, os dados obtidos neste planejamento confirmam os resultados referentes à estabilidade térmica desta amostra de lipase imobilizada (seção 4.3.3). Desta forma, o progresso da esterificação catalisada por lipase imobilizada em quitosana depende principalmente da massa do catalisador empregado, não estando sujeito às interações com as outras variáveis do processo.

Esses resultados sugerem que esta preparação de lipase imobilizada, ao contrário de outras preparações não sofre uma influência tão marcante da razão molar ente os materiais de partida na formação do produto. Por exemplo, CASTRO *et al* (1997b), estudando o

mesmo sistema reacional empregando Lipozyme como catalisador, verificaram que a razão molar entre butanol e ácido butírico foi o fator crítico para a obtenção de altos rendimentos de butirato de butila, requerendo um excesso de ácido butírico da ordem de 1,5 vezes em relação à concentração molar do butanol.

4.6.3. Estabilidade Operacional

No desenvolvimento dos processos com enzimas imobilizadas, um parâmetro de fundamental importância é a estabilidade operacional. Os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que os processos com enzima livre, desde que se consiga um tempo de meia-vida suficientemente longo para a enzima imobilizada, pois neste caso, haveria uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, que deveria, além de compensar as despesas adicionais com o procedimento de imobilização, ser inferior àquele da enzima livre.

A estabilidade operacional da enzima depende de uma série de fatores, tais como: i) despreendimento da enzima do suporte; ii) obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; iii) perda de suporte por atrito ou dissolução. O efeito global destes fatores pode ser determinado experimentalmente, e devem ser feitas tentativas para reduzir seus efeitos.

Apesar da literatura referente à imobilização de lipases ser extensa, são poucos os dados referentes à estabilidade operacional desses derivados. A razão para este fato pode estar associada à baixa estabilidade operacional das lipases imobilizadas, atingindo em alguns trabalhos, cerca de 50 a 70% de redução da atividade catalítica em menos de cinco bateladas consecutivas (OLIVEIRA, 1999).

Destaca-se ainda, que esses resultados são também bastante conflitantes, mesmo em relação às preparações comerciais de lipase imobilizada, como por exemplo, Lipozyme (NOVO NORDISK), tendo em vista que diversos fatores podem contribuir para a manutenção de uma elevada atividade durante o seu uso repetitivo. Por exemplo, em trabalhos publicados por CASTRO *et al.*, 1992a; 1992b, foi identificado que durante o processo de esterificação do citrionelol com ácido butírico catalisada por Lipozyme, a água formada como sub-produto foi totalmente adsorvida pela fase sólida, alterando desta forma o teor de água desta preparação de lipase imobilizada.

Este mecanismo de adsorção de água pela Lipozyme, interfere negativamente na conversão do substrato no novo reciclo. Técnicas de desidratação da preparação enzimática, como uso de peneira molecular ou lavagem com solvente orgânico foram consideradas eficientes para restauração da atividade original da Lipozyme. Por outro lado, em trabalho desenvolvido na COPPE (UFRJ), mesmo adotando esta metodologia de desidratação da Lipozyme com hexano não foi possível manter elevada atividade catalítica desta preparação na síntese de triglicerídeos (LANGONE, 1998). Isto não significa que Lipozyme não tenha elevada estabilidade operacional, mas que as condições operacionais empregadas nas sínteses interfiram significativamente na atividade catalítica da Lipozyme nas bateladas subsequentes. Enquanto, a síntese do citronelol com ácido butírico foi efetuada numa temperatura de 45°C, na síntese de triglicerídeos foram adotadas temperaturas superiores a 80°C, inativando desta forma a preparação enzimática para uso nos ciclos subsequentes.

A estabilidade operacional da lipase imobilizada em quitosana foi verificada em meio orgânico, adotando como modelo a esterificação do butanol com ácido butírico. Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia apresentada no item 3.7.3.

Na Tabela 4.16 são mostrados os resultados médios obtidos nos ensaios de estabilidade operacional, realizado em bateladas consecutivas de 24 horas. O rendimento de esterificação alcançado ao final de cada batelada é mostrado na Figura 4.19.

Como pode-se notar na Tabela 4.16 e Figura 4.20, houve um decréscimo gradativo do rendimento de esterificação, com uma redução de 83% ao final do sétimo reciclo, indicando um tempo de meia-vida de 66 horas. Entretanto, este decréscimo tão acentuado não foi observado na preparação de lipase imobilizada, cuja atividade hidrolítica inicial foi reduzida em apenas 28% (tempo de meia-vida de 351 horas). Esses resultados demonstram que em meio orgânico não ocorre desprendimento da enzima do suporte mas uma alteração das condições de hidratação da preparação enzimática imobilizada, afetando diretamente a atividade lipolítica no novo ciclo. Portanto, o decréscimo do rendimento de esterificação durante as reutilizações da lipase imobilizada poderá ser minimizado por técnicas mais efetivas de remoção dos materiais de partida não consumidos e produtos formados (água e éster) por meio de utilização de solventes mais adequados. Neste trabalho, foi utilizado hexano que é um solvente apolar. Um estudo mais aprofundado desse efeito, utilizando solventes mais polares seria interessante para uma melhor avaliação da influência da

quantidade dos reagentes envolvidos e produtos formados presentes na matriz (quitosana) da lipase imobilizada na manutenção de sua atividade durante o uso em bateladas consecutivas.

Tabela 4.16. Estabilidade operacional da lipase imobilizada em quitosana de grau farmacêutico na esterificação do butanol (0,25 M) com ácido butírico (0,30 M) em heptano, empregando 1,0 grama (massa seca) de lipase imobilizada com uma atividade de 32,83 U/mg de suporte seco. Bateladas de 24 horas a 37°C.

<i>Bateladas</i>	<i>Tempo (horas)</i>	<i>ButOH (g/l)</i>	<i>ABut (g/l)</i>	<i>Butirato Butila (g/l)</i>	<i>Conversão ButOH (%)</i>	<i>Conversão ABut (%)</i>	<i>Rendimento Éster (%)</i>
R0	0	19,0	25,47	0,12	-	-	
	24	3,04	4,75	32,11	84,00	81,30	89,20
R1	0	19,17	24,49	1,00	-	-	
	24	3,60	4,76	33,48	81,24	80,63	90,22
R2	0	20,24	24,04	3,60	-	-	
	24	11,06	8,63	33,90	45,35	64,10	84,20
R3	0	20,05	23,51	4,37	-	-	
	24	14,04	12,28	25,48	30,31	47,76	58,70
R4	0	20,06	27,57	4,35		-	
	24	13,67	15,56	26,76	31,85	43,56	61,44
R5	0	19,50	23,51	4,12	-	-	
	24	15,38	16,64	17,65	21,12	29,22	37,58
R6	0	18,92	23,01	4,24	-	-	
	24	15,84	19,23	13,66	16,00	15,38	26,17
R7	0	19,79	27,43	4,75	-	-	
	24	16,93	21,37	10,24	14,41	22,10	15,25

Atividade hidrolítica residual após 7 ciclos: 23,58 U/mg suporte seco

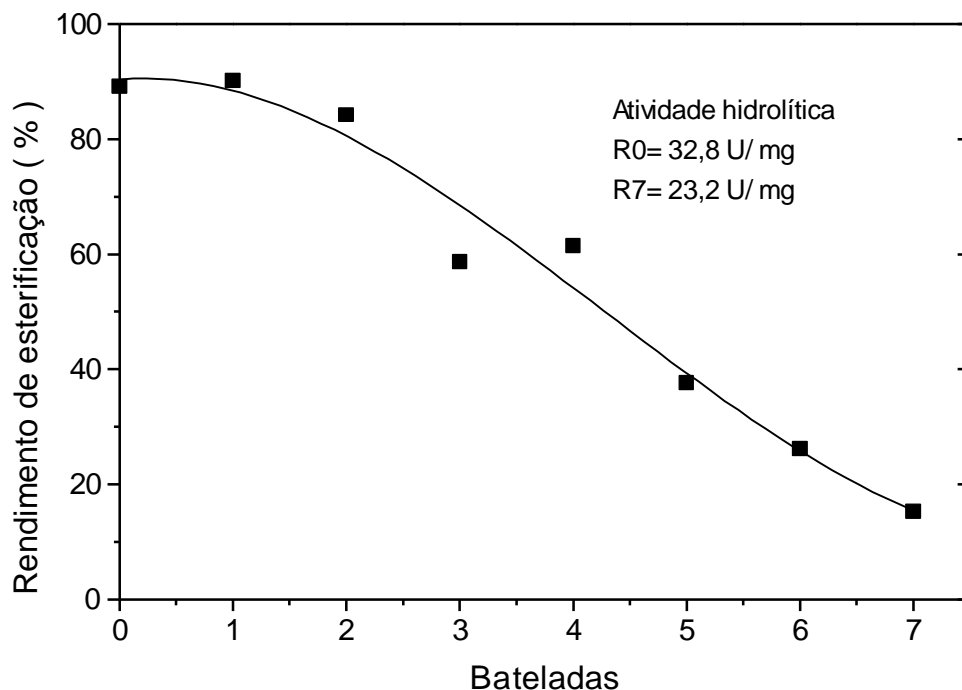


Figura 4.20. Estabilidade operacional da lipase imobilizada em quitosana, em bateladas consecutivas, na esterificação do n-butanol (0,25 M) com ácido butírico (0,30M) a 37°C, bateladas de 24 horas.

4.6.4. Comparação do Desempenho da Lipase Livre e Imobilizada na Síntese do Butirato de Butila

A finalidade deste grupo de experimentos foi comparar o desempenho da lipase livre, imobilizada em quitosana e o da Lipozyme (preparação comercial de lipase imobilizada) na síntese do butirato de butila. As sínteses foram realizadas a 37°C com substratos contendo butanol e ácido butírico na proporção molar de 1:2 empregando 0,3 gramas de cada preparação, o que equivale a 42000 unidades de atividade da lipase livre (1400 U/mg sólido); 7050 unidades de atividade da lipase imobilizada em quitosana (23,4 U/mg suporte seco) e 8406 unidades de atividade da Lipozyme (28 U/mg suporte seco).

Os resultados apresentados na Figura 4.21 (Apêndice 12), indicam que as atividades de esterificação (expressas em $\mu\text{M/g}\cdot\text{min}$), alcançadas nesta síntese pela lipase-quitosana foi seis vezes inferior à obtida pela lipase livre e oito vezes inferior ao da Lipozyme.

Com relação à comparação entre a lipase microbiana (*C. rugosa*) na sua forma livre e imobilizada em quitosana os resultados indicam que o procedimento de imobilização

reduziu sensivelmente a atividade catalítica da enzima. Entretanto deve ser considerado que a enzima na sua forma imobilizada pode ser utilizada durante um longo período com uma pequena perda de atividade e a enzima livre após o uso é descartada.

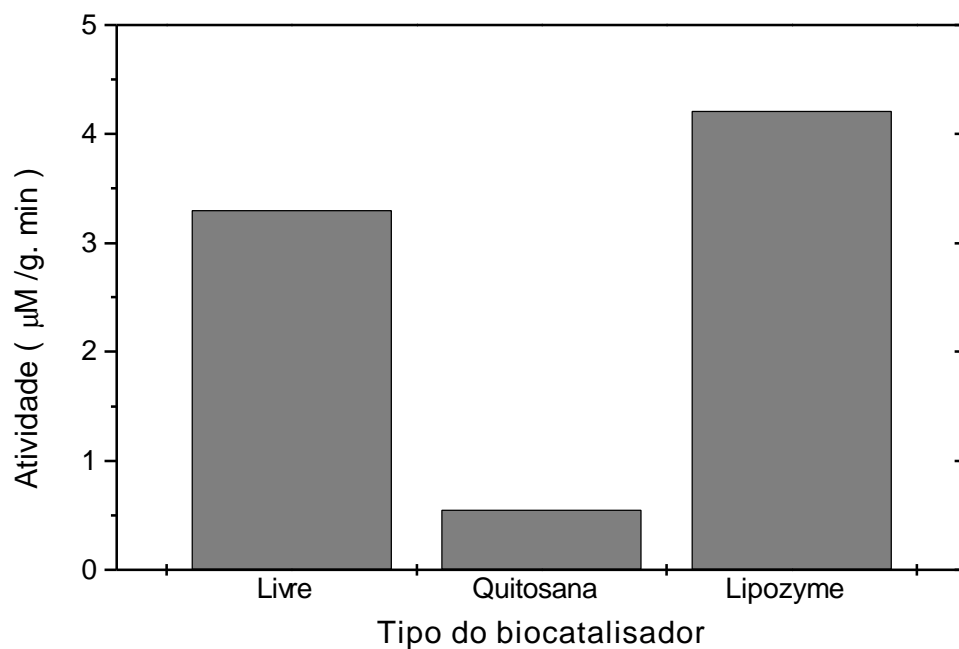


Figura 4.21. Comparação do desempenho da lipase livre, imobilizada em quitosana e Lipozyme na síntese do butirato de butila (37°C, substrato constituído de 0,30 M de butanol e 0,3 M de ácido butírico).

5. CONCLUSÕES

Nos últimos anos avanços significativos têm sido efetuados no uso de enzimas em meios não convencionais. Esse avanço impulsiona uma nova era de aplicação de enzimas em síntese orgânica. Tais atividades são de extrema importância para o desenvolvimento de novas rotas de processo, para obtenção de produtos novos ou conhecidos a custos mais competitivos, ampliando simultaneamente, o potencial de aplicação das enzimas em processos industriais. Entretanto os maiores obstáculos na competição deste processo com a prática corrente da síntese química são: o alto custo dos biocatalisadores e sua baixa estabilidade operacional. Portanto, o uso industrial de enzimas como catalisadores depende da eficiência de sua imobilização e do emprego de suportes adequados, de tal forma que o investimento inicial em matéria-prima (enzima e suporte) seja compensado pela elevada atividade e estabilidade do derivado imobilizado obtido.

Neste trabalho, optou-se pela utilização de um suporte polimérico natural, a quitosana, que apresenta inúmeras vantagens como matriz de imobilização de enzimas, entre as quais destacam-se: versatilidade nas formas que estão disponíveis (pó, gel, fibra e membrana); escassa biodegradabilidade; custo baixo; fácil manuseio; alta afinidade pelas proteínas e acima de tudo, não é tóxico. A enzima selecionada, a lipase, pertence a uma classe de catalisadores bioquímicos cujo interesse industrial é decorrente de sua versatilidade para mediar reações de hidrólise e síntese. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, e nesse conjunto de dados pode-se concluir que:

1. Entre os dois tipos de quitosanas (grau farmacêutico e analítico) e lipases (microbiana e pancreática) testadas, a quitosana de grau farmacêutico apresentou a configuração mais favorável para a imobilização da lipase *Candida rugosa*, provavelmente devido às interações entre a matriz e a enzima.
2. A metodologia de imobilização da lipase na quitosana por adsorção, empregando hexano como meio dispersante, forneceu elevadas porcentagens de retenção de proteína (80%) e recuperação de atividade lipolítica (15%).

3. O procedimento de imobilização por ligação covalente reduziu sensivelmente o rendimento de imobilização da lipase na quitosana, alcançando um valor de apenas 4,7%.
4. O melhor rendimento de imobilização (RI = 17%) foi obtido quando foi oferecido 0,1 grama de lipase microbiana por grama de suporte.
5. O ensaio de determinação da atividade hidrolítica, tanto para a enzima livre como imobilizada, indicou serem suficientes 5 minutos a 37°C para se obter uma formação adequada de produto para análise sem necessidade de grandes diluições da amostra.
6. O pH em que a enzima lipase (*C. rugosa*) livre apresentou máxima atividade (1830 U/mg) foi 7,0 enquanto a imobilizada em quitosana de grau farmacêutico foi 6,0 (123 U/mg).
7. A temperatura de máxima atividade da enzima livre em pH 7,0 foi 37°C atingindo 3400 U/mg, enquanto para a enzima imobilizada foi 45° C (70,72 U/mg).
8. A energia de ativação da reação de hidrólise do azeite de oliva, com a enzima lipase livre é igual a 9,90 kcal/mol, enquanto para a enzima imobilizada é da ordem de 7,26 kcal/mol. A atividade da enzima livre e imobilizada, para a faixa de temperatura entre 30 a 37°C, e 30 a 45°C, respectivamente pode ser calculada pelas equações:

livre:	$A = 1,33 \times 10^{16} \exp(-4983/RT),$	$r^2 = 0,9994$
imobilizada:	$A_i = 6,47 \times 10^6 \exp(-3652/RT),$	$r^2 = 0,9546$
9. A retenção de atividade da enzima livre, após 120 minutos de incubação a 60°C é de apenas 6%, enquanto para a imobilizada é de 36%. A 40°C a enzima livre ainda retém 52% de sua atividade inicial após 120 minutos, enquanto a imobilizada ainda apresenta 75% de atividade nessas mesmas condições.
10. A energia de desnaturação térmica da enzima lipase livre é igual a 29,2 kcal/mol, enquanto para a imobilizada em quitosana é igual a 29,6 kcal/mol, indicando que a lipase livre é bastante sensível à desnaturação à temperaturas superiores a 50°C.

11. Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos a partir da curva da atividade em função da concentração de substrato (azeite de oliva) indicaram que a enzima livre apresenta uma cinética tipo Michaelis-Menten, enquanto a imobilizada apresenta uma cinética típica de inibição pelo substrato ou ainda a redução da atividade pode estar relacionada com problemas de limitações difusionais. Estes fatos necessitam de mais estudos.
12. A enzima imobilizada foi aplicada com sucesso na síntese de ésteres empregando diferentes álcoois (C_2 a C_{10}) e diferentes ácidos graxos (C_2 a C_{12}), a única restrição encontrada foi referente ao uso do ácido acético como doador do grupo acila e do etanol como nucleofílico. Conversões molares na faixa de 40-45% foram alcançadas para os sistemas reacionais constituídos de butanol e diferentes ácidos graxos (C_4 a C_{12}) e entre 40-50% para os sistemas constituídos de ácido butírico e diferentes álcoois (C_4 a C_{10}).
13. A estabilidade operacional da enzima lipase imobilizada em bateladas cíclicas em meio aquoso foi de 5 horas enquanto em meio orgânico foi igual a 66 horas. Essa diferença no comportamento da lipase imobilizada sugere que em meio orgânico não ocorre desligamento da enzima do suporte mas uma alteração das condições de hidratação da preparação imobilizada, afetando diretamente sua atividade de síntese no novo ciclo.
14. O desempenho do derivado experimental de lipase imobilizada em quitosana foi inferior ao alcançado para uma preparação de lipase imobilizada disponível comercialmente (Lipozyme).

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade e complementar os estudos da imobilização e utilização da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em quitosana sugere-se:

1. Verificar a influência da granulometria do suporte no rendimento de imobilização da lipase.
2. Testar diferentes estratégias para a manutenção do grau de hidratação da lipase imobilizada em bateladas consecutivas, de tal forma que elevados rendimentos de esterificação sejam mantidos.
3. Aplicar a lipase imobilizada em quitosana em outros tipos de reações catalisadas pelas lipases, como por exemplo, interesterificação.
4. Testar a metodologia desenvolvida para imobilizar lipases de outras fontes microbianas, as quais apresentem uma maior estabilidade térmica na sua forma livre.
5. Estudar a possibilidade de imobilizar outros tipos de enzimas de interesse em biotecnologia no suporte empregado neste trabalho (quitosana).
6. Estudar a cinética da enzima lipase livre e imobilizada.
7. Estudar a distribuição da porosidade da quitosana, e outras propriedades como acidez, basicidade, isto é, a caracterização do suporte.
8. Modificar o suporte como Polietileno Glicol (PEG), a fim de fornecer um meio mais apropriado à imobilização.
9. Estudar outros óleos comerciais: soja, milho, e outros, para estas reações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J.E., OLLIS, D.F., 1986, Biochemical Engineering Fundamentals. 2 ed., New York, USA, McGraw-Hill, p. 213.
- BALCÃO, V.M., PAIVA, A.L., MALCATA, F.X., 1996, “Bioreactors with Immobilized Lipases: State of the Art”, Enzyme and Microbial Technology, v. 18, pp. 392-416.
- BALCÃO, V.M., MALCATA, F.X., 1998, “Lipase Catalyzed Modification of Milkfat”, Biotechnology Advances, v.16, pp. 309-341.
- BAGI, K., SIMON, L.M., SZAFÁNI, B., 1997, “Immobilization and Characterization of Porcine Pancreas Lipase”, Enzyme and Microbial Technology, v. 20, pp. 531-536.
- BOSLEY, J.A., PEILOW, A.D., 1997, “Immobilization of Lipases on Porous Polypropylene: Reduction in Esterification Efficiency at Low Loading”, Journal of American Oil Chemists’ Society, v. 74, n. 2, pp. 107-111.
- BON, E., FREIRE, D.G., MENDES, M.F., MOREIRA, C.P., SOARES, V.F., 1984, “Immobilization of Glucoamylase on Chitin”, Biotechnology and Bioengineering Symposium, n. 14, pp. 485-492.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S., 1978. In: Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building, p. 653, New York, USA, Wiley and Sons Inc.
- BRADFORD, M.M.A., 1976, “Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”, Analytical Biochemistry, v. 72, pp. 248-254.

- BRADY, C., METCALFE, D., SLABZEWSKI, D., FRANK, D., 1988, "Lipase Immobilized on a Hydrophobic Microporous Support for the Hydrolysis of Fats", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 65, n. 6, pp. 917-921.
- BRIAND, D., DUBREUCQ, E., GALZY, P., 1994, "Enzymatic Fatty Esters Synthesis in Aqueous Medium with Lipase from *Candida parapsilosis* (ashford) Langeron and Talice", Biotechnology Letters, v. 16, pp. 813-818.
- BRINK, L.E.S., LUYBEN, K.CH.A.M., VANT RIET, K., 1988, "Biocatalysis in Organic Media", Enzyme and Microbiology Technology, v. 10, n. 12, pp. 736-743.
- CARTA, G., GAINER, J.L., BENTON, A.H., 1991, "Enzymatic Synthesis of Esters using an Immobilized Lipase", Biotechnology and Bioengineering, v. 37, pp. 1004-1009.
- CASTRO, H.F., 1985, Biocatalyst and Substrate Properties for Alcohol Production. Ph.D. thesis, University of Manchester, Manchester, Inglaterra, p. 259.
- CASTRO, H.F., ANDERSON, W.A., MOO-YOUNG, M., LEGGE, R.L., 1992a, "Partitioning of Water during the Production of Terpene Esters using Immobilized Lipase", Progress in Biotechnology, v. 8, pp. 475-482.
- CASTRO, H.F., ANDERSON, W.A., LEGGE, R.L., MOO-YOUNG, M., 1992b, "Process Development for Production of Terpene Ester using Immobilized Lipase in Organic Media", Indian Journal of Chemistry, Sect B, 431 B, pp. 891-895.
- CASTRO, H.F., ANDERSON, W.A., 1995, "Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases", Química Nova, v. 18, n. 6, pp. 544-554.
- CASTRO, H.F., JACQUES, S.S., 1995, "Influência da Adição de Agentes Dessecantes no Desempenho da Reação de Butirato de Citronila utilizando Lipase Imobilizada", Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.38, n. 2, pp. 339-344.

- CASTRO, H.F., OLIVEIRA, P.C., PEREIRA, E.B., 1997a, "Evaluation of Different Strategies for Lipase Catalysed Synthesis of Citronellyl Acetate", Biotechnology Letters, v. 9, pp. 229-232.
- CASTRO, H.F., OLIVEIRA, P.C., SOARES, C.M.F., 1997b, "Parâmetros Reacionais para a Síntese Enzimática do Butirato de Butila em Solventes Orgânicos", Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 17, n.3. pp. 237-241.
- CASTRO, H.F., OLIVEIRA, P.C., SOARES, C.M.F; ZANIN, G.M., 1999, "Immobilization of Lipase on Celite for Application in the Synthesis of Butyl Butyrate in Nonaqueous System", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 76, n.1, pp. 147-152.
- CHEETHAM, P.S.J., 1995, "Principles of Industrial Biocatalysis and Bioprocessing" In: Wiseman, A. (ed), Handbook of Enzyme Biotechnology, 3 ed., p. 419, London, Great Britain, T.J. Press.
- CHIBATA, L., 1978, "Production of L-Amino Acids" In: Immobilized Enzymes: Research and Development, pp.168-178, New York, USA, John Wiley and Sons.
- CHIBATA, L., WINGARD, L.B.Jr., 1983, "Immobilized Microbial Cells", Applied Biochemistry and Bioengineering, v. 4, pp. 1-11.
- CHULALAKSANANUKUL, W., CONDORET, J.S., COMBES, D., 1992, "Kinetics of Geranyl Acetate Synthesis by Lipase-Catalysed Transesterification in n-Hexane", Enzyme and Microbial Technology, v. 14, pp. 293-298.
- CHULALAKSANANUKUL, W., CONDORET, J.S., COMBES, D., 1993, "Geranyl Acetate Synthesis by Lipase-Catalysed Transesterification in Supercritical Carbon Dioxide", Enzyme and Microbial Technology, v. 15, pp. 691-698.

- CLAON, P.A., AKOH, C.C., 1994a, "Enzymatic Synthesis of Geranyl Acetate in n-Hexane with *Candida antarctica* Lipase", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 71, pp. 575-578.
- CLAON, P.A., AKOH, C.C., 1994b, "Lipase-Catalysed Synthesis of Terpene Esters by Transesterification in n-Hexane", Biotechnology Letters, v.16, pp. 235-240.
- CLARK, D.S., 1994, "Can Immobilization be Exploited to Modify Enzyme Activity?", TIBTECH, v. 12, pp. 439-443.
- CONN, E.E., STUMPF, P.K., 1972, In: Blücker E. (ed.), Manual de Bioquímica, São Paulo, Brasil, Editora USP.
- COSTA, S.A., CORTEZ, E.V., CASTRO, H.F., 1995, "Comparação do Desempenho da Síntese de Butirato de Citronila por Via Química e Enzimática". In: Anais do 1º Congresso de Engenharia Química Iniciação Científica, pp. 81-84.
- CRESTINI, C., KOVAC, B., GIOVANNOZZI-SERMANNI, G., 1996, "Production and Isolation of Chitosan by Submerged and Solid-State Fermentation from *Lentinus edodes*", Biotechnology and Bioengineering, v. 50, pp. 207-210.
- DIAS, S.F., VILAS-BOAS, L., CABRAL, J.M.S., FONSECA, M.M.R., 1991, "Production of Ethyl Butyrate by *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Polyurethane", Biocatalysis, v. 3, pp. 21-34.
- DIXON, M., WEBB, E.C., 1979, In: Enzymes, 3 ed., cap. 2, London, Great Britain, Longman Group Limited.
- DORDICK, J.S., 1989, "Enzymatic Catalysis in Monophasic Organic Solvents", Enzyme and Microbial Technology, v. 11, n. 4, pp. 55-56.

- ENGASSER, J.M., HORVATH, C., 1976, "Diffusion and Kinetics with Immobilized Enzymes". In: Wingard Jr., L.B., Katchalski-Katzir and E., Goldstein, L. (eds), Applied Biochemistry and Bioengineering – Immobilized Enzyme Principles, v. 1, pp. 127-220, New York, USA, Academic Press.
- FABER, K., 1997, In: Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook, 3 ed., Cap. 1, 2 e 3, Berlin, Germany, Springer-Verlag.
- FADNAVIS, N.W., KOTESHWAR, K., 1997, "Remote Control of Stereoselectivity: Lipase-Catalysed Enantioselective Esterification of Racemic α -Lipoic Acid", Tetrahedron Asymmetric, v. 8, pp. 337-339.
- FACIOLLI, N.L., GONÇALVES, L.A., 1998, "Modificação por Via Enzimática da Composição Triglicéridica do Óleo de Piqui", Química Nova, v. 21, pp.16-19.
- FELSE, P.A., PANDA, T., 1999, "Studies on Applications of Chitin and its Derivatives", Bioprocess Engineering, v. 20, pp. 505-512.
- FONTEYN, F., BLECKER, C., LOGNAY, G., MARLIER, M., SEVERIN, M., 1994, "Optimization of Lipase-Catalysed Synthesis of Citronellyl Acetate in Solvent-Free Medium", Biotechnology Letters, v.16, pp. 693-696.
- FUKUNAGA, K., MINAMIJIMA, N., SUGIMURA, Y., ZHANG, Z., NAKAO, K., 1996, "Immobilization of Organic Solvent-Soluble Lipase in Nonaqueous Conditions and Properties of the Immobilized Enzymes", Journal of Biotechnology, v. 52, pp. 81-88.
- GANDHI, N.N., 1997, "Application of Lipases - Review", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 74, pp.621-634.
- GATFIELD, I.L., 1995, "Enzymatic and Microbial Generation of Flavors", Perfumer & Flavorist, v. 20, pp. 5-14.

- GILBERT, J.E., 1993, "Pseudomonas Lipases: Biochemical Properties and Molecular Cloning (Review)", Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 634.
- GILTLESEN, T., BARRER, M.; ADLERCREUTZ, P. 1997, "Adsorption of Lipase on Polypropylene Powder", Biochimica et Biophysica Acta, v. 1345, pp. 188-196.
- GOLDBERG, M., THOMAS, D., LEGOY, M.D., 1990, "The Control of Lipase-Catalyzed Transesterification and Esterification Reaction Rates: Effects of Substrate Polarity, Water Activity, and Water Molecules on Enzyme Activity", European Journal of Biochemistry, v. 190, pp. 603-690.
- GRAY, C.J., NARANG, J.S., BARKER, S.A., 1990, "Immobilization of Lipase from *Candida cylindraceae* and its Use in the Synthesis of Menthol Esters by Transesterification", Enzyme and Microbial Technology, v. 12, pp. 800-807.
- HARWOOD, J., 1989, "The Versatility of Lipases for Industrial Uses", Trends in Biotechnology Science-TIBS, v. 14, pp. 125-126.
- HALLING, P.J., 1990, "Solvent Selection for Biocatalysis in Mainly Organic Systems: Predictions of Effects on Equilibrium Position", Biotechnology and Bioengineering, v. 35, pp. 545-548.
- HALLING, P.J., 1992, "Salt Hydrates for Water Activity Control with Biocatalysts in Organic Media", Biotechnology Techniques, v. 14, pp. 271-276.
- HARTMEIER, W., 1988, In: Immobilized Biocatalysts-An Introduction, cap. 1 e 2, Berlin, Germany, Springer-Verlag.
- HERTZBERG, S., KVITHINGEU, L., ATHSONSEU, T., SKJOB, P.G., 1991, "Alginate as Immobilization Material for Biocatalysts in Organic Solvents", Annals of New York Academy of Sciences, v.1, pp. 511-515.

- ISON, A.P., MACRAE, A.R., SMITH, C.G., BOSLEY, J., 1994, "Mass Transfer Effects in Solvent-Free Fat Interesterification Reactions: Influence on Catalyst Design", Biotechnology and Bioengineering, v. 43, pp. 122-130.
- ITOYAMA, K., TOKURA, S., HAYASHI, T., 1994, "Lipoprotein Lipase Immobilization onto Porous Chitosan Beads", Biotechnology Progress, v. 10, pp. 225-229.
- IWAI, M., OKUMURA, S.B., TSUJISAKA, Y., 1980, "Synthesis of Terpene Alcohol Esters by Lipase", Agricultural Biology and Chemistry, v. 44, pp. 2731-2732.
- JAEGER, K-E., REETZ, M.T., 1998, "Microbial Lipases Form Versatile Tools for Biotechnology", TIBTECH, v. 16, pp. 396-403.
- JAMIL, N.I.N., OMAR, I.C., 1998, "Restoration of Rice Husk-Adsorbed Lipase Activity after Rehydration", Biotechnology Techniques, v. 12, pp. 347-352.
- JANSSEN, A.E.M., VAN DER PADT, A., VANT' RIET, V., 1993, "The Effect of Organic Solvents on the Equilibrium Position of Enzymatic Acylglycerol Synthesis", Biotechnology and Bioengineering, v. 41, pp. 95-103.
- JENSEN, R.G., GALLUZZO, D.R., BUSH, V.J., 1990, "Selectivity is an Important Characteristics of Lipases (Acylglycerol Hydrolase)", Biocatalysis, v. 3, pp. 307-316.
- JESUS, P.C., JOÃO, J.J., SILVA, P.L.F., BURLIN, G., NASCIMENTO, M.G., 1997, "Organo-gel: Um Novo Sistema para a Imobilização de Lipases e sua Aplicação em Síntese Orgânica", Química Nova, v. 20, n. 6, pp. 664-672.
- JONES, J.B., 1986, "Enzyme in Organic Synthesis", Tetrahedron, v. 42, pp. 3351-3403.
- JONZO, M.D., HIOL, A., DRUET, D., COMEAU, L.C., 1997, "Application of Immobilized Lipase from *Candida rugosa* to Synthesis of Cholesterol Oleate", Journal of Chemical Technology and Biotechnonology, v. 69, pp. 463-469.

- JUANG, R-S., TSENG, R-H., WU, F-C., LEE, S-H., 1997, "Adsorption Behavior of Reactive Dyes from Aqueous Solutions on Chitosan", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 70, pp. 391-399.
- KENNEDY, J.F., ROIG, M.G., 1995, "Principles of Immobilization of Enzymes". In: Wiseman, A. (ed), Handbook of Enzyme Biotechnology, 3 ed., pp. 235, 246, 249, London, Great Britain, T.J. Press.
- KENNEDY, J.A., WHITE, C.A., 1985, "Principles of Immobilization of Enzymes". In: Wiseman, A. (ed.), Handbook of Enzyme Biotechnology, 2 ed., Chichester, Great Britain, John Wiley and Sons.
- KWON, S.J., SONG, K.M., HONG, W.H., RHEE, J.S., 1995, "Removal of Water Produced from Lipase-Catalysed Esterification in Organic Solvent by Pervaporation", Biotechnology and Bioengineering, v. 46, pp. 393-395.
- LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K., VEGER, C., 1987, "Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents", Biotechnology and Bioengineering, v. 30, pp. 81-87.
- LASKIN, A.I., 1985, In: Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology, 2 ed., London, Great Britain, The Benjamin/ Cummings Publishing Co. Inc.
- LANGRAND, G., TRIANTAPHYLES, C., BARATTI, J., 1988, "Lipase Catalyzed Formation of Flavour Esters", Biotechnology Letters, v. 10, n. 8, pp. 549 -554.
- LANGONE, M.A.P., 1998, Síntese de Triglicérides Catalisada por Lipase. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p. 168.
- LEE, K-T., AKOH, C.C., 1998, "Immobilization of Lipases on Clay, Celite 545, Diethylaminoethyl, and Carboxymethyl-Sephadex and their Interesterification Activity", Biotechnology Techniques, v. 12, n. 5, pp. 381-384.

- LEUENBERGER, H.G.W., 1990, "Biotransformation - A Useful Tool in Organic Chemistry", Pure & Applied Chemistry, v. 62, n. 4, pp. 753-768.
- LIE, E., MOLIN, G., 1991, "Hydrolysis and Esterification with Immobilized Lipase on Hydrophobic and Hydrophilic Zeolites", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 50, pp. 549-553.
- LIMA, A.W.O., ANGNES, L., 1999, "Biotálise em Meios-Aquo-Restritos: Fundamentos e Aplicações Analíticas", Química Nova, v. 22, pp. 229-243.
- LIMA, C., SILVA, P.L.F., NASCIMENTO, M.G., REZENDE, M.C., 1996, "The Use of Immobilized Lipases on Chrysolite for Esterification Reactions", Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 7, n. 3, pp. 173-175.
- LINFIELD, W.M., BARAUSKAS, R.A., SIVIERI, L., SEROTA, S., STEVENSON SR, R.W., 1984, "Enzymatic Fat Hydrolysis and Synthesis", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 61, pp. 191-195.
- LINKO, Y.-Y., LAMSA, M., HUHTALA, A., RANTANEN, O., 1995, "Lipase Biocatalysis in the Production of Esters", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 72, pp. 1293-1299.
- MACEDO, G.A., PASTORE, G.M., 1997, "Lipases Microbianas na Produção de Ésteres Formadores de Aroma", Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.17, p. 115.
- MACRAE, A.R., HAMMOND, R.C., 1985, "Present and Future Applications of Lipases", Biotechnology and Genetic Engineering-Reviews, v. 3, n. 9, pp. 193-217.
- MACRAE, A.R., 1983, "Extracellular Microbial Lipases". In: Microbial Enzymes and Biotechnology, Forgy, W. M. Ed., London, Applied Science Publishers, pp. 225-250.

- MALCATA, F.X., REYES, H.R., GARCIA, H.S., HILL JR, C.G., AMUNDSON, C.H., 1990, "Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils - A Review". Journal of American Oil Chemists' Society, v. 67, n. 12, pp. 890-910.
- MARGOLIN, A L., 1991, "Enzymes, Use Them", Chemtech, v. 21, pp. 160-167.
- MARGOLIN, A. L., 1996, "Novel Crystalline Catalysts", TIBTECH, v.14, pp. 223-229.
- MATTIASSON, B., ADLERCREUTZ, P., 1991, "Tailoring the Microenviroment of Enzymes in Water-Poor Systems", TIBTECH, v. 9, pp. 394-398.
- MESSING, R.A., 1975, In: Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, p. 63, New York, USA, Academic Press.
- MONOT, F., 1994, "La Catalyse Enzymatique en Milieu Organique", Revue de L'Institut Français du Pétrole, v. 49, n. 2, pp. 187-208.
- MUKESH, D., JADHAV, S., BANERJI, A.A., THAKKAR, K., BEVINAKATTI, H.S., 1997, "Lipase-Catalysed Esterification Reaction-Experimental and Modelling Studies", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 69, pp. 179-186.
- MURRAY, M., ROONEY, D.; NEIKERK, M.Van, MONTENEGRO, A., WESTHERLY, L.R., 1997, "Immobilization of Lipase onto Lipophilic Polymer Particles and Application to Oil Hydrolysis", Process Biochemistry, v. 32 , n. 6, pp. 479-486.
- MUSTRANTA, A., FORSSELL, P., POUTANEN, K., 1993, "Applications of Immobilized Lipases to Transesterification and Esterification Reactions in Nonaqueous Systems", Enzyme and Microbial Technology, v.15, pp. 133-139.
- NAKAGAWA, H., WATANABE, S., SHIMURA, S., KIRIMURA, K., USAMI, S., 1998, "Enzymatic Synthesis of Terpenyl Esters by Transesterification with Fatty Acid Vinyl Esters as Acyl Donors by *Trichosporon fermentans* Lipase", World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 14, pp. 219-222.

- NELSON, J., GRIFFIN, E.G., 1916, “Adsorption of Invertase”, Journal of American Chemical Society, v. 38, pp. 1109-1116.
- NORIN, M., BOUTELJE, J., HOLMBERG, E., HULT, K., 1988, “Effect of Support Hydrophobicity on the Reaction Rate of Ester Synthesis in Cyclohexane”, Applied Microbiology and Biotechnology, v. 28, pp. 527-530.
- NOVO INDUSTRI, 1986, Product Information, B-347b- GB.
- NOVO NORDISK BIOINDUSTRIALS GROUP, 1995, “A Ação das Enzimas”, Catálogo Informativo, p. 47.
- OGUNTMEIN, G.B., ANDERSON, W.A, MOO-YOUNG, M., 1995, “Synthesis of Geraniol Esters in a Solvent-Free System Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase”, Biotechnology Letters, v.17, pp. 77-82.
- OLIVEIRA, P.C., 1999, Estudo da Imobilização de Lipase em Copolímero de Divinilbenzeno-estireno e Aplicação na Síntese do Butirato de Butila. Tese de M.Sc., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, p. 92.
- OLIVEIRA, P.C., ALVES, G.M., CASTRO, H.F., 1999, “Immobilization Studies and Catalytic Properties of Microbial Lipase onto Styrene-Divinylbenzene Copolymer”, Biochemical Engineering Journal (in press).
- PEREIRA, R.S., 1995, “Fermento Biológico de Padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e seu uso em Sínteses Assimétricas”, Química Nova, v. 18, n. 5, pp. 452-459.
- PEREIRA, E.B., CORTEZ, E.V., SILVA, F.J., COSTA, S.A., CASTRO, H.F., 1994, “Síntese de Ésteres Aromatizantes por Lipase Imobilizada”. In: IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Maringá-PR, Anais, pp. 245-251.

- QUIOCHO, F.A., 1976, "Immobilized Proteins in Single Crystals". In: Mosbach, K. (ed), Methods in Enzymology, v. 44, pp. 551-556, London, Great Britain, Academic Press.
- RESLOW, M., ADLERCREUTZ, P., MATTIASON, B., 1988, "On the Importance of the Support Material for Bioorganic Synthesis - Influence of Material Partition Between Solvent, Enzyme and Solid Support in Water-Poor Reaction Media", European Journal of Biochemistry, v. 172, pp. 573-578.
- SEINO, K., UCHIBORI, T., NISHITANI, T., INAMASU, S., 1984, "Enzymatic Synthesis of Carbohydrate Esters of Fatty Acid (I). Esterification of Sucrose, Glucose, Fructose, and Sorbitol", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 61, pp. 1761-1765.
- SHANLEY, A., 1998, "Enzymes Usher in a New Area", Chemical Engineering, pp. 63-66.
- SHAW, J.F., CHANG, R.C., WANG, F.F., WANG, Y.J., 1990, "Lipolytic Activities of a Lipase Immobilized on Six Selected Supporting Materials", Biotechnology and Bioengineering, v. 35, pp. 132-137.
- SOARES, C.M.F., CASTRO, H.F., MORAES, F.F. de, ZANIN, G.M., 1999, "Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Sílica", Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77/79, pp. 745-757.
- SOLEWICK, E., 1987, "Biotecnologia: Enzimas na Síntese Orgânica", Informativo INT, v. 19, n. 40, pp. 20-25.
- SONNET, P.E., MCNEILL, G.P., JUN, W., 1994, "Lipase of *Geotrichum candidum* Immobilized on Sílica Gel", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 71, pp. 1421-1423.
- STRYER, L., 1992, In: Bioquímica, p. 45, Rio de Janeiro, Brasil, Editora Guanabara Koogan S.A.

- SVANEBOG, C., 1999, "Lipid Structure and Lipases", Enzyme Design, Novo Nordisk, A/S, home page: [http/ www. fys.risoe.dk/ public/ lipase](http://www.fys.risoe.dk/public/lipase).
- TANAKA, A., SONOMOTO, R., 1990, "Immobilized Biocatalyst in Organic Solvents", Chemtech, v. 20, p.112-142.
- VÉZINA, C., 1987, "Biotransformations". In: Bu'Lock, J.D. and Kristiansen, B. (eds), Basic Biotechnology, pp. 463-481, London, Great Britain, Academic Press.
- VIRTO, M.D., AGUD, I., MONTERO, S., BLANCO, A., SOLOZABAL, R., LASCARAY, J.M., LLAMA, M.J., SERRA, J.L., LANDETA, L.C., RENOBALES, M., 1995, "Kinetic Properties of Soluble and Immobilized *Candida rugosa* Lipase", Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 50, pp. 127-136.
- VULFSON, E.N., 1993, "Enzymatic Synthesis of Food Ingredients in Low Water Media", Trends in Food Science and Technology, v. 4, pp. 209-215.
- VULFSON, E.N., 1994, "Industrial Applications of Lipases". In: Woolley, P. and Petersen, S.B. (eds), Lipase: Their Structure, Biochemistry and Application, p. 271-288, Cambridge, Great Britain, Cambridge University Press.
- YAHYA, A.R.M., ANDERSON, W.A., MOO-YOUNG, M., 1998, "Ester Synthesis in Lipase-Catalyzed Reactions", Enzyme and Microbial Technology, v. 23, pp. 438-450.
- YEE, L.N., AKOH, C.C., PHILLIPS, R.S., 1995, "*Pseudomonas sp.* Lipase-Catalyzed Synthesis of Geranyl Esters by Transesterification", Journal of American Oil Chemists' Society, v. 72, p. 1407.
- YONG, Y.P., AL-DURI, B., 1996, "Kinetic Studies on Immobilized Lipase: Esterification of Oleic Acid and Octanol", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 65, pp. 239-248.

- WELSH, F.H., MURRAY, W.D., WILLIAMS, R.E., 1989, "Microbiological and Enzymatic Production of Flavour and Fragrance Chemicals", Critical Reviews in Biotechnology, v. 9, n. 2, pp. 105-169.
- XU, H., LI, M., HE, B., 1995, "Immobilization of *Candida cylindracea* Lipase on Methyl Acrylate-Divinyl Benzene Copolymer and its Derivatives", Enzyme and Microbial Technology, v. 17, pp. 194-199.
- ZAKS, A., EMPIE, M., GROSS, A., 1988, "Potentially Commercial Enzymatic Processes for the Fine and Specialty Chemical Industries", Trends in Biotechnology, v. 6, pp. 272-275.
- ZAKS, A., KLIBANOV, A.M., 1988, "The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media", The Journal of Biology and Chemistry, v. 263, n. 17, pp. 8017-8021.
- ZANIN, G.M., 1989, Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada. Tese de D.Sc., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, p. 454.
- ZANIN, G.M., MORAES, F.F. de, 1989, "Atividade e Energia de Ativação da Amiloglicosidase na Forma Solúvel e Imobilizada", Revista de Microbiologia, v. 20, pp. 367-371.
- ZANIN, G.M., CALSAVARA, L.P.V., KAMBARA, L.M., MORAES, F.F. de., 1998, "Thermal Stability and Energy of Deactivation of Free and Immobilized Amyloglicosidase in the Saccharification of Cassava Starch", Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 70-72, pp. 383-394.

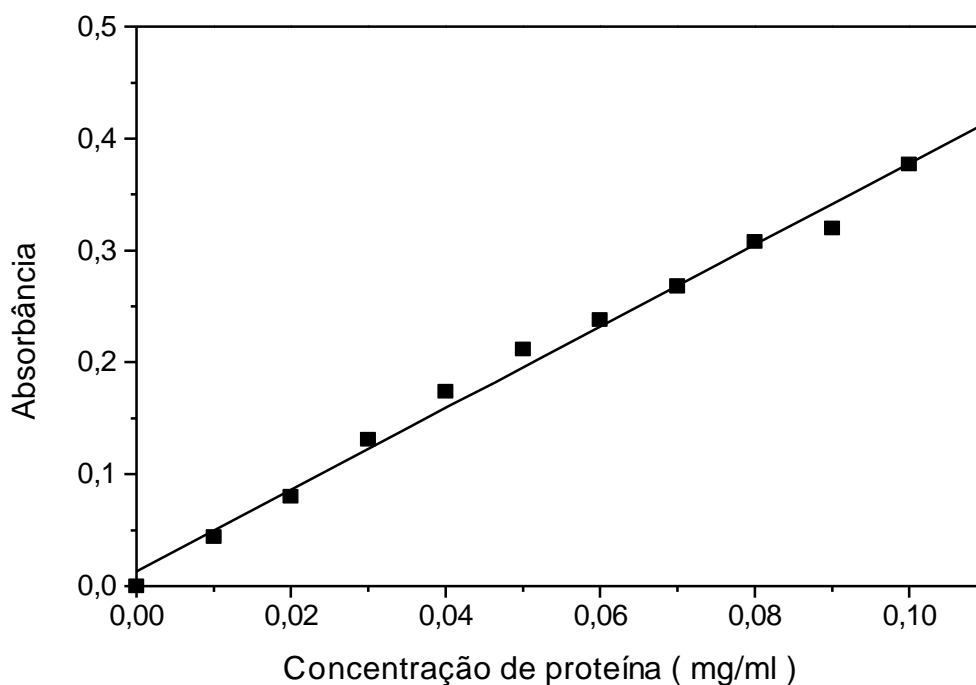
APÊNDICES

APÊNDICE 1
CURVA PADRÃO DE PROTEÍNA

A seguir apresenta-se um exemplo de obtenção da curva padrão para a determinação de proteína pelo Método de Bradford (1976), empregando-se como padrão a BSA. .

Curva de Calibração para Determinação de Proteína pelo Método de Bradford (1976)

<i>Tubo n°</i>	<i>Solução Proteína (ml)</i>	<i>Água (ml)</i>	<i>Conc. Proteína (mg/ml)</i>	<i>Abs. (1)</i>	<i>Abs. (2)</i>	<i>Abs. (3)</i>	<i>Abs. (média)</i>
1	0	4,0	0,00	0	0	0	0
2	0,4	3,6	0,01	0,033	0,054	0,046	0,044
3	0,8	3,2	0,02	0,074	0,08	0,068	0,080
4	1,2	2,8	0,03	0,14	0,131	0,131	0,131
5	1,6	2,4	0,04	0,173	0,164	0,174	0,174
6	2,0	2,0	0,05	0,211	0,21	0,214	0,212
7	2,4	1,6	0,06	0,223	0,247	0,244	0,238
8	2,8	1,2	0,07	0,242	0,277	0,284	0,268
9	3,2	0,8	0,08	0,308	0,311	0,299	0,308
10	3,6	0,4	0,09	0,307	0,32	0,32	0,320
11	4,0	0,0	0,1	0,354	0,377	0,341	0,377



A equação de ajuste para o cálculo do teor de proteína é:

$$\text{Abs} = 0,01332 + 3,6463 \text{ Cp (mg/ml)}, \quad r = 0,9955, \quad \text{desvio padrão} = 0,01208, \quad n = 11$$

APÊNDICE 2
2.1. QUANTIFICAÇÃO DO BUTANOL E BUTIRATO DE BUTILA
CALIBRAÇÃO

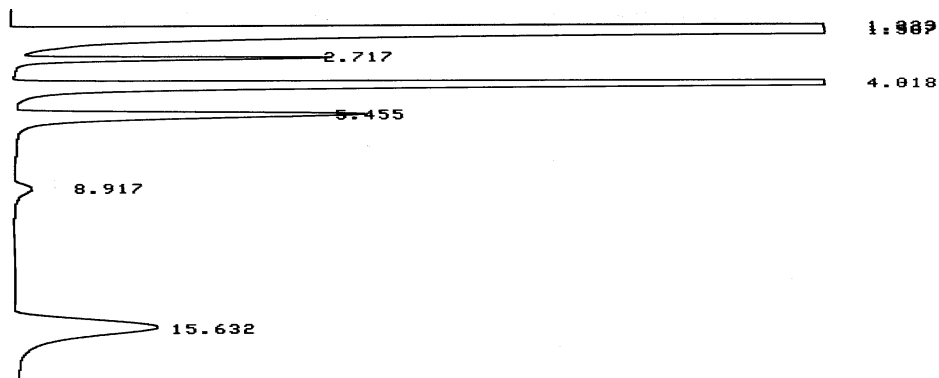
Padrão Interno (PI) HEXANOL				
Amostra sem diluição : Misturar 1 X 1 com PI			Injetar 1 µL	
Temperaturas	Coluna 70° C	Ionizador 190° C	Vaporizador 190° C	
Vazão	Nitrogênio 30ml /min	Hidrogênio 27 ml/min.	Ar Sintético 300 ml/min.	
Atenuação do Cromatógrafo: 1 X 1K				
Calibração				
Idn Nº	Nome	Tempo	Fator	Concentração g/l
1	PI	10,3	1	22,5
2	BUT	3,6	1,53	24,96
2	BB	5,7	1,63	24,50

onde:

PI = Padrão Interno
 BUT = Butanol
 BB = Butirato de Butila

APÊNDICE 2 (continuação)
2.2. QUANTIFICAÇÃO DO BUTANOL E BUTIRATO DE BUTILA
CROMATOGRAMAS

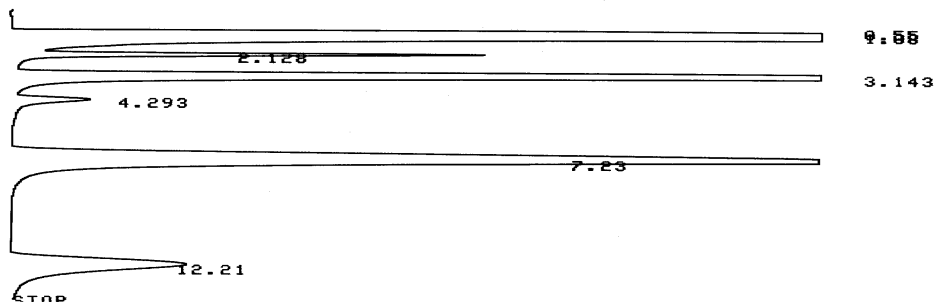
Amostras em diferentes tempos de reação de esterificação (9 e 24 horas)



CHROMATOPAC C-R3A FILE 9
 SAMPLE NO 0 METHOD 43
 REPORT NO 570 SAMPLE WT 100
 IS WT 22.5

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.323	2541382				
2	1.507	481253	SV			
3	2.717	17201	T			
4	4.018	164137	V			
5	5.455	39312	V	2	22.6876	BUT
6	8.917	3316				
7	15.632	42163		1		PI
TOTAL		3288763			22.6876	

START



CHROMATOPAC C-R3A FILE 9
 SAMPLE NO 0 METHOD 43
 REPORT NO 573 SAMPLE WT 100
 IS WT 22.5

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.55	679				
2	1.08	3504285	SV			
3	2.128	19418	T			
4	3.143	216528	T			
5	4.293	7403	TV	2	4.9267	BUT
6	7.23	149191				
7	12.21	36563		1		PI
TOTAL		3934065			4.9267	

APÊNDICE 3

3.1. IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA EM QUITOSANA

Lipase Pancreática: Tipo II – Sigma

Suportes: Quitosana de Grau Analítico, Quitosana de Grau Farmacêutico

Metodologia de Imobilização (Seções 3.3.1)

Enzima oferecida para imobilização: 10 ml de uma solução aquosa contendo 0,5 gramas de lipase em pó (58,9 mg de proteína e 598,4 U)

Massa de suporte: 2,0 gramas

Meio de dispersão: hexano

Tempo de contato: 3 h sob agitação em temperatura ambiente seguida por período adicional de 18 horas em condições estáticas a 4°C.

Recuperação de Proteína (%)

<i>Experimento n°</i>	<i>Tipo de quitosana</i>	<i>Sobrenadante (mg)*</i>	<i>Filtrado1 (mg)*</i>	<i>Filtrado2 (mg)*</i>	<i>Total (mg)</i>	<i>RP (%)</i>
1	analítico	26,12	0,54	0,32	26,98	54,2
2	analítico	27,01	0,41	0,06	27,57	53,26
Valor médio	analítico				27,28	53,70
1	farmacêutico	6,16	0,37	0,36	6,90	88,30
2	farmacêutico	25,61	0,07	0,06	25,74	56,29
Valor médio	farmacêutico				16,32	72,30

* Concentração (mg/ml) X Volume de cada filtrado (ml)

RP (%): Diferença entre a proteína oferecida para imobilização e o total de proteína encontrada nos filtrados dividido pela quantidade de proteína oferecida para imobilização ($P_0 = 58,9$ mg de proteína)

Rendimento de Imobilização (%)

<i>Experimento n°</i>	<i>Tipo de quitosana</i>	<i>MS (g)</i>	<i>Atividade (U/g)</i>	<i>Uads (U)</i>	<i>RI (%)</i>
1	analítico	2,5	8,9	22,30	3,70
2	analítico	2,43	8,4	20,74	4,97
Valor médio	analítico		8,6	21,52	4,33
1	farmacêutico	2,50	25,14	62,85	10,50
2	farmacêutico	2,01	11,10	22,32	3,70
Valor médio	farmacêutico		18,12	42,58	7,10

MS: Massa seca da lipase imobilizada

Atividade: Representa o número de unidades (U) por miligrama de lipase imobilizada (massa seca)

Uads: Refere-se à atividade total obtida (Atividade x MS).

RI (%): Rendimento em termos de atividade. Relação entre a Uads e atividade oferecida para imobilização ($U_0 = 598,4$)

APÊNDICE 3

3.2. IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE MICROBIANA EM QUITOSANA

Lipase Microbiana: *Candida rugosa* Tipo VII

Suportes: Quitosana de Grau Analítico, Quitosana de Grau Farmacêutico

Metodologia de Imobilização (Seções 3.3.1)

Enzima oferecida para imobilização: 10 ml de uma solução aquosa contendo 0,5 gramas de lipase em pó (16,2 mg de proteína e 718,25 U)

Massa de suporte: 2,0 gramas

Meio de dispersão: hexano

Tempo de contato: 3 h sob agitação em temperatura ambiente seguida por período adicional de 18 horas em condições estáticas a 4°C.

Recuperação de Proteína (%)

<i>Experimento n°</i>	<i>Tipo de quitosana</i>	<i>Sobrenadante (mg)*</i>	<i>Filtrado 1 (mg)*</i>	<i>Filtrado 2 (mg)*</i>	<i>Total (mg)</i>	<i>RP (%)</i>
1	analítico	3,83	0,55	0,23	4,61	71,54
2	analítico	3,90	0,22	0	4,12	74,60
Valor médio	analítico					73,10
1	farmacêutico	2,90	0,38	0,34	3,62	77,65
2	farmacêutico	2,3	0,72	0,35	3,38	79,10
Valor médio	farmacêutico					78,40

* Concentração (mg/ml) X Volume de cada filtrado (ml)

RP (%): Diferença entre a proteína oferecida para imobilização e o total de proteína encontrada nos filtrados dividido pela quantidade de proteína oferecida para imobilização.

Rendimento de Imobilização (%)

<i>Experimento n°</i>	<i>Tipo de quitosana</i>	<i>MS (g)</i>	<i>Atividade (U/mg)</i>	<i>Uads (U)</i>	<i>RI (%)</i>
1	analítico	2,50	24,86	62,15	8,65
2	analítico	1,93	20,90	40,34	5,62
Valor médio	analítico		22,88	51,24	7,13
1	farmacêutico	2,50	47,15	117,90	16,41
2	farmacêutico	2,43	38,19	92,82	12,92
Valor médio	farmacêutico		42,67	105,40	14,70

MS: Massa seca da lipase imobilizada

Atividade: Representa o número de unidades (U) por grama de lipase imobilizada (massa seca)

Uads: Refere-se à atividade total obtida (Atividade x MS)

RI (%): Rendimento em termos de atividade. Relação entre a Uads e atividade oferecida para imobilização.

APÊNDICE 4

4.1. INFLUÊNCIA DO TIPO DE QUITOSANA NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE

Verificação da eficiência da lipase pancreática imobilizada em quitosana de grau analítico e farmacêutico por meio de sua utilização em bateladas simples.

Substrato:

Butanol (ButOH): 20,4 g/l

Ácido Butírico (ABut): 22,94 g/l

Derivados imobilizados testados:

Lipase pancreática imobilizada em quitosana Sigma: 8,90 U/mg suporte seco

Lipase pancreática imobilizada em quitosana de grau farmacêutico: 25,14 U/mg suporte seco

Reações:

A: 20 ml de substrato + 0,50 gramas (massa seca) de lipase pancreática imobilizada em quitosana de grau analítico

B: 20ml de substrato + 0,50 gramas (massa seca) de lipase pancreática imobilizada em quitosana de grau farmacêutico

As reações foram incubadas numa temperatura de 37°C, com agitação.

Reação A (lipase pancreática imobilizada em quitosana de grau analítico)

<i>Tempo (horas)</i>	<i>ButOH (g/l)</i>	<i>ButOH (mM)</i>	<i>ABut (g/l)</i>	<i>ABut (mM)</i>	<i>Butirato Butila (g/l)</i>	<i>Butirato Butila (mM)</i>	<i>Conversão ButOH (%)</i>	<i>Conversão ABut (%)</i>
0	21,85	295	23,51	266	0	0	-	-
16	20,06	278	22,17	252	0,86	6	8,20	5,60
24	20,00	270	21,30	242	2,60	18	8,46	9,40
32	19,70	267	20,50	233	4,46	31	9,84	12,80
40	19,24	260	20,00	228	6,05	42	11,94	14,92
48	18,05	244	17,95	204	6,93	48	17,40	23,64

Reação B (lipase pancreática imobilizada em quitosana de grau farmacêutico)

<i>Tempo (horas)</i>	<i>ButOH (g/l)</i>	<i>ButOH (mM)</i>	<i>ABut (g/l)</i>	<i>ABut (mM)</i>	<i>Butirato Butila (g/l)</i>	<i>Butirato Butila (mM)</i>	<i>Conversão ButOH (%)</i>	<i>Conversão ABut (%)</i>
0	21,00	284	22,44	255	0	0	-	-
16	20,03	274	21,90	249	0,86	6	4,6	2,41
24	19,90	269	21,56	245	1,58	11	5,23	3,92
32	19,53	264	21,03	239	4,18	29	7,00	6,28
40	18,72	253	19,98	227	6,33	44	10,85	10,96
48	17,25	233	18,04	205	6,62	46	17,86	19,60

APÊNDICE 4

4.2. INFLUÊNCIA DO TIPO DE QUITOSANA NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE

Verificação da eficiência da lipase microbiana imobilizada em quitosana de grau analítico e farmacêutico por meio de sua utilização em bateladas simples.

Substrato:

Butanol (ButOH): 0,27 M

Ácido Butírico (Abut): 0,26 M

Derivados imobilizados testados:

Lipase microbiana imobilizada em quitosana de grau analítico: 24,9 U/mg de suporte seco

Lipase microbiana imobilizada em quitosana de grau farmacêutico: 47,15 U/mg de suporte seco

Reações:

A: 20 ml de substrato + 0,50 gramas (massa seca) de lipase microbiana imobilizada quitosana de grau analítico

B: 20ml de substrato + 0,50 gramas (massa seca) de lipase microbiana imobilizada quitosana de grau farmacêutica

As reações foram incubadas numa temperatura de 37°C, com agitação.

Reação A (lipase microbiana imobilizada em quitosana de grau analítico)

<i>Tempo (horas)</i>	<i>Teor água (ppm)</i>	<i>ButOH (g/l)</i>	<i>ButOH (mM)</i>	<i>ABut (g/l)</i>	<i>ABut (mM)</i>	<i>Butirato Butila (g/l)</i>	<i>Butirato Butila (mM)</i>	<i>Conversão ButOH (%)</i>	<i>Conversão ABut (%)</i>
0	2052	20,10	271	21,64	246	0	0	-	-
8	3453	18,20	246	19,36	220	1,44	10	9,45	10,54
24	4770	17,98	243	17,6	200	4,46	31	10,54	18,70
30	1110	17,46	236	16,72	190	5,18	36	13,13	22,73
48	1933	17,02	230	16,63	189	5,76	40	15,32	23,15

Reação B (lipase microbiana imobilizada em quitosana de grau farmacêutico)

<i>Tempo (horas)</i>	<i>Teor água (ppm)</i>	<i>ButOH (g/l)</i>	<i>ButOH (mM)</i>	<i>ABut (g/l)</i>	<i>ABut (mM)</i>	<i>Butirato Butila (g/l)</i>	<i>Butirato Butila (mM)</i>	<i>Conversão ButOH (%)</i>	<i>Conversão ABut (%)</i>
0	2451	18,54	250	21,37	240	0	0	-	-
8	3766	17,00	230	16,03	180	7,20	50	8,00	25,00
24	2807	12,76	170	11,51	130	14,40	100	32,00	45,83
30	994	11,78	160	9,62	110	15,84	110	36,00	54,17
48	780	9,82	130	8,16	100	17,28	120	47,03	61,81

APÊNDICE 5

RENDIMENTOS DE IMOBILIZAÇÃO

Comparação dos Rendimentos de Imobilização de Lipase Microbiana em Quitosana: Adsorção e Ligação Covalente

Lipase: *Candida rugosa* Tipo VII – Sigma
Suporte: Quitosana de Grau Farmacêutico

Experimento 1: Adsorção

Experimento 2: Ligação Covalente

Metodologia de Imobilização (Seções 3.3.1 e 3.3.2)

Enzima oferecida para imobilização: 10 ml de uma solução contendo 0,5 gramas (16,2 mg de proteína, 718,3 U)

Meio de dispersão: hexano

Massa de suporte: 3,0 gramas (seco)

Tempo de contato: 3 h sob agitação em temperatura ambiente seguida por período adicional de 18 horas em condições estáticas a 4°C.

Recuperação de Proteína (%)

<i>Exp. n^o</i>	<i>Sobrenadante (mg)*</i>	<i>Filtrado 1 (mg)*</i>	<i>Filtrado 2 (mg)*</i>	<i>Total (mg)</i>	<i>RP (%)</i>
1	4,12	0	0	4,12	74,55
2	3,83	0	0	3,83	76,40

* Concentração (mg/ml) X Volume de cada filtrado (ml)

RP (%): Diferença entre a proteína oferecida para imobilização e o total de proteína encontrada nos filtrados dividido pela quantidade de proteína oferecida para imobilização ($P_0 = 16,2$ mg de proteína)

Rendimento de Imobilização (%)

<i>Exp. n^o</i>	<i>MS (g)</i>	<i>Atividade (U/mg)</i>	<i>Uads (U)</i>	<i>RI (%)</i>
1	2,26	49,56	112,0	15,60
2	2,05	16,26	33,32	4,63

MS: Massa seca da lipase imobilizada

Atividade: Representa o número de unidades (U) por miligrama de lipase imobilizada (massa seca)

Uads: Refere-se à atividade total obtida (Atividade x MS)

RI (%): Rendimento em termos de atividade. Relação entre a Uads e atividade oferecida para imobilização ($U_0 = 718,3$ U).

APÊNDICE 6 SATURAÇÃO DO SUPORTE

Lipase: *Candida rugosa* Tipo VII – Sigma

Suporte: Quitosana de Grau Farmacêutico

Metodologia de Imobilização (Seções 3.3.1)

Enzima oferecida para imobilização: 10 ml de uma solução aquosa contendo entre 0,1 a 1,0 grama de lipase em pó (3,24-32,4 mg de proteína e 143,5 a 1436,5 U)

Massa de suporte: 3,0 gramas

Meio de dispersão: hexano

Tempo de contato: 3 h sob agitação em temperatura ambiente seguida por período adicional de 18 horas em condições estáticas a 4°C.

Recuperação de Proteína (%)

<i>Enzima/Suporte</i> (g/g)	<i>Proteína/Suporte</i> (mg/g)	U_0	<i>Sobrenadante</i> (mg)*	<i>Filtrado 1</i> (mg)*	<i>Filtrado 2</i> (mg)*	<i>Total</i> (mg)	<i>RP</i> (%)
0,03	1,08	3,24	0,31	0,03	0	0,34	89,50
0,08	2,7	8,10	1,77	0	0	1,77	78,15
0,17	5,4	16,20	4,12	0	0	4,12	74,55
0,25	8,1	24,30	6,43	0	0	6,43	73,54
0,33	10,8	32,40	9,07	0	0	9,07	71,65

* Concentração (mg/ml) X Volume de cada filtrado (ml)

RP (%): Diferença entre a proteína oferecida para imobilização e o total de proteína encontrada nos filtrados dividido pela quantidade de proteína oferecida para imobilização.

Rendimento de Imobilização (%)

<i>Enzima/Suporte</i> (g/g)	<i>Atividade oferecida</i> (U/g de suporte)	U_0	<i>MS</i> (g)	<i>Atividade</i> (U/mg)	<i>Uads</i> (U)	<i>RI</i> (%)
0,03	48	143,7	2,52	12,71	18,4	12,80
0,08	120	359,1	1,94	31,88	61,9	17,22
0,17	240	718,2	2,26	49,56	112,0	15,60
0,25	360	1077,4	2,98	52,75	157,1	14,58
0,33	480	1436,5	3,16	52,17	264,9	11,48

MS: Massa seca da lipase imobilizada

Atividade: Representa o número de unidades (U) por miligrama de lipase imobilizada (massa seca)

Uads: Refere-se à atividade total obtida (Atividade x MS)

RI: Rendimento em termos de atividade. Relação entre a Uads e atividade oferecida para imobilização.

APÊNDICE 7 ATIVIDADE HIDROLÍTICA

Influência do Tempo de Incubação na Atividade Hidrolítica da Lipase Livre e Imobilizada

A atividade enzimática da lipase na forma livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada (Seção 3.4.2) por SOARES *et al.* (1999).

Lipase Livre

<i>Tempo (min)</i>	<i>Atividade (U/mg de suporte)</i>		
	<i>Experimento A</i>	<i>Experimento B</i>	<i>Valor médio</i>
5	4757,0	4759,2	4758
10	2929,6	2927,4	2928
15	2317,0	2319,2	2318
20	1905,0	1902,5	1903
25	1978,6	1974,0	1976
30	1469,0	1460,5	1464
35	-	1250,0	1250
40	1100,0	1096,2	1098

Lipase Imobilizada

<i>Tempo (min)</i>	<i>Atividade (U/mg de suporte)</i>		
	<i>Experimento A</i>	<i>Experimento B</i>	<i>Valor médio</i>
5	198,3	187,4	192,8
10	105,5	137,3	121,4
15	95,6	94,4	95,0
20	88,9	83,9	86,4
25	76,3	80,2	78,2
30	81,8	80,6	81,2
35	51,9	55,6	53,7
40	48,5	-	48,5

APÊNDICE 8
ESTABILIDADE TÉRMICA DA LIPASE

Estabilidade térmica da lipase livre em meio aquoso (Tampão fosfato 0,1M, pH 7,0)

Atividade determinada a 37°C, tempo 5 minutos.

Atividade inicial = 3400 U/mg sólido de enzima livre.

Tempo de incubação: 1 hora

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Atividade</i> (U/mg)	<i>Atividade</i> (U/mg)	<i>Atividade</i> <i>valor médio</i> (U/mg)	<i>Atividade</i> <i>relativa</i> (%)
37	3400	3400	3400	100
40	5100	5100	5100	100
45	2312	1730	2021	59,5
50	1312	1246	1279	37,5
55	656	590,4	623	18,3
60	393,6	195,8	294	8,7

Tempo de incubação: 2 horas

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Atividade</i> (U/mg)	<i>Atividade</i> (U/mg)	<i>Atividade</i> <i>valor médio</i> (U/mg)	<i>Atividade</i> <i>relativa</i> (%)
37	3400	3400	3400	100
40	3114	4080	3597	100
45	1706	1837	1770	52,1
50	853	1312	1082	31,8
55	459	-	459	13,5
60	197	-	197	5,8

Estabilidade térmica da lipase imobilizada em meio aquoso (Tampão fosfato 0,1M, pH 7,0)

Atividade determinada a 37°C, tempo 5 minutos.

Atividade inicial = 51,39 U/mg suporte seco.

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Atividade</i> (U/mg) <i>1h</i>	<i>Atividade</i> <i>relativa</i> (%)	<i>Atividade</i> (U/mg) <i>2h</i>	<i>Atividade</i> <i>relativa</i> (%)
37	51,4	100	51,4	100
40	69,9	100	38,3	74,5
45	32,8	63,8	36,1	70,2
50	27,3	53,2	20,8	40,4
55	22,9	44,7	19,7	38,3
60	22,9	44,7	18,6	36,2

APÊNDICE 9
INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Varição da Concentração do Substrato na Atividade Hidrolítica da Lipase Livre e Imobilizada

Substrato: Emulsão de azeite de oliva em goma arábica 7% (p/v), pH 7,0 (tampão fosfato 0,1M)

Tempo de incubação: 5 minutos

Temperatura 37°C

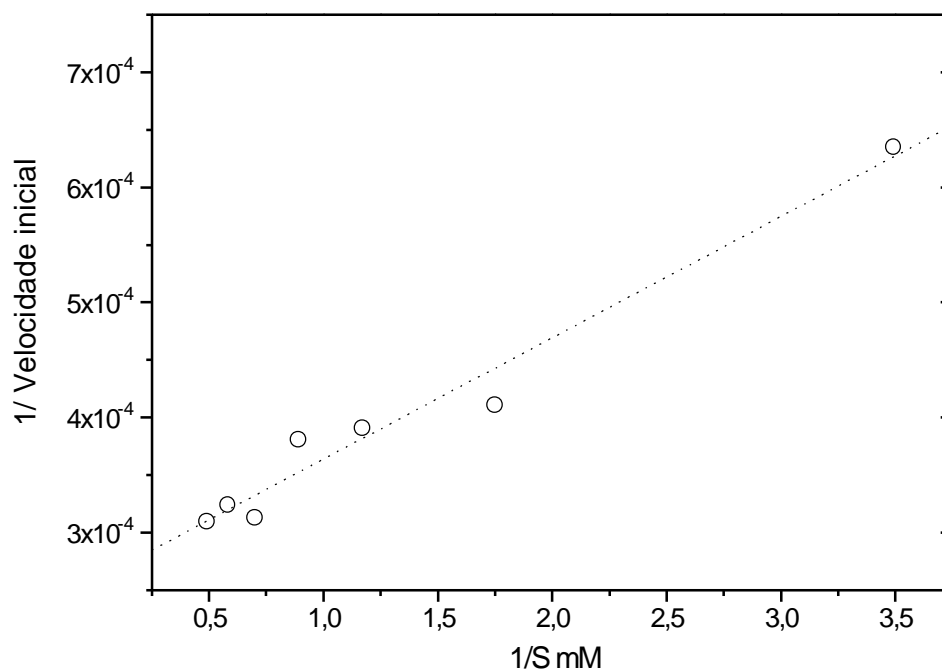
Lipase Livre: Solução 5 mg de sólido de enzima /ml

<i>Concentração do ácido graxo (mM)</i>	<i>Concentração do azeite de oliva (v/v) (%)</i>	<i>Velocidade inicial (mmol /mg sólido.min)</i>
286	10	1574,4
572	20	2427,4
853	30	2558,4
1144	40	2624,0
1430	50	3192,8
1716	60	3083,2
2002	70	3208,0

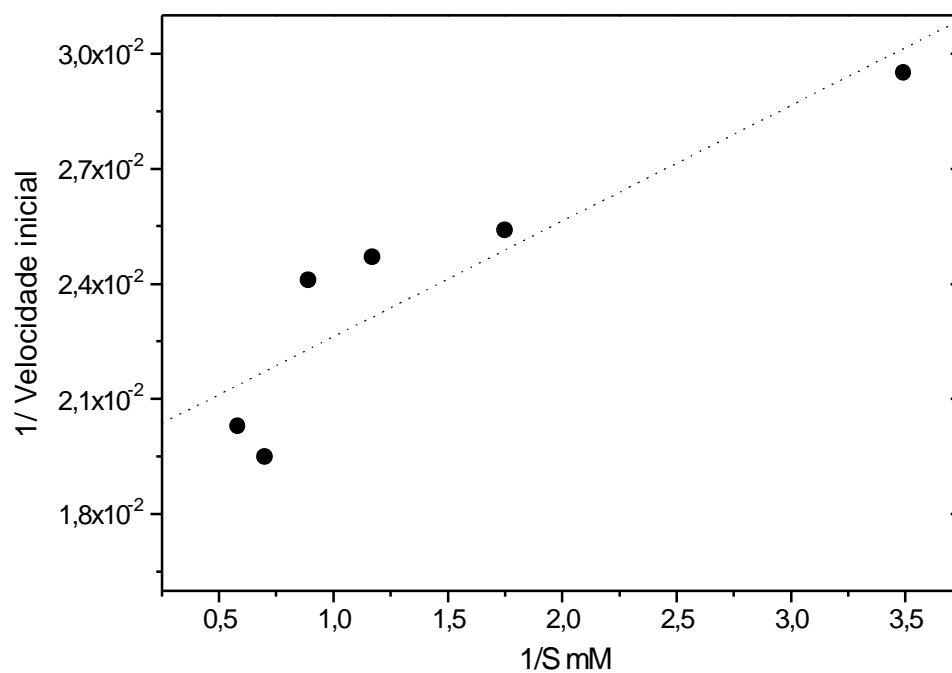
Lipase imobilizada: 0,3 gramas (massa seca)

<i>Concentração do ácido graxo (mM)</i>	<i>Concentração do azeite de oliva (v/v) (%)</i>	<i>Velocidade inicial (mmol/mg suporte seco.min)</i>
286	10	33,9
572	20	39,4
853	30	40,6
1144	40	41,6
1430	50	51,4
1716	60	49,2
2002	70	45,9

APÊNDICE 10
DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE AFINIDADE DA ENZIMA PELO SUBSTRATO
(K_m) e ATIVIDADE MÁXIMA (V_{max})



Equação ajustada para o cálculo dos parâmetros cinéticos da lipase livre (K_m e V_{max}):
 $Y = 0,00026 + 0,00011 * X, r^2 = 0,98434$



Equação ajustada para o cálculo dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da lipase imobilizada:
 $Y = 0,01961 + 0,00176 * X, r^2 = 0,90196.$

APÊNDICE 11

SÍNTESE DE BUTIRATO DE BUTILA

Resultados obtidos na síntese de butirato de butila catalisada por lipase imobilizada em quitosana de grau farmacêutico

Condições experimentais

Volume de substrato:	20 ml
Concentração de butanol	0,3 M
Tempo de duração da reação:	20 horas
Derivado imobilizado:	23,5 U/mg suporte seco
Variável resposta:	Formação do butirato de butila

Matriz do planejamento fatorial 2³ empregado na síntese do butirato de butila

Ensaio	Variáveis			Butanol			Ácido Butírico			Butirato de Butila		Água
	T (°C)	E (g)	Abut (mM)	(g/l)	(mM)	(%)	(g/l)	(mM)	(%)	(g/l)	(mM)	(%)
1	37	0,25	300	19,18	260	-	26,93	310	-	0,67	5	1,69
	37	0,25	300	16,15	220	15,38	20,94	240	22,58	10,47	70	3,23
2	50	0,25	300	18,26	250	-	27,91	320	-	0,77	5	1,71
	50	0,25	300	15,89	210	16,00	29,38	280	12,50	9,01	60	1,07
3	37	0,50	300	19,38	260	-	24,11	270	-	0,75	5	1,67
	37	0,50	300	12,95	170	34,61	12,94	150	44,44	22,12	150	2,64
4	50	0,50	300	20,22	270	-	27,91	320	-	0,78	5,41	1,95
	50	0,50	300	17,26	230	14,81	17,86	200	37,50	19,99	140	2,61
5	37	0,25	600	21,10	280	-	53,68	610	-	1,25	8	2,47
	37	0,25	600	14,68	100	64,28	44,88	510	16,39	14,68	100	2,74
6	50	0,25	600	23,15	310	-	58,30	669	-	1,56	10	2,97
	50	0,25	600	18,84	250	19,35	56,10	640	3,03	11,27	80	2,57
7	37	0,50	600	21,06	180	-	53,68	610	-	1,29	9	2,61
	37	0,50	600	13,60	310	35,71	43,91	500	18,03	27,28	190	2,83
8	50	0,50	600	22,77	310	-	58,30	660	-	1,61	10	3,43
	50	0,50	600	16,24	220	29,03	44,77	510	22,73	21,21	150	3,46
9	43,5	0,375	450	20,19	270	-	41,62	470	-	1,10	8	3,10
	43,5	0,375	450	15,00	200	25,92	31,63	360	23,40	18,21	130	3,67
10	43,5	0,375	450	20,27	270	-	41,62	470	-	1,10	8	3,89
	43,5	0,375	450	15,57	210	22,22	31,73	360	23,40	19,77	140	3,50
11	43,5	0,375	450	20,47	280	-	42,11	480	-	1,11	8	3,63
	43,5	0,375	450	15,87	210	25,00	32,38	370	22,92	20,81	140	3,24

E = massa da enzima; Abut = ácido butírico

APÊNDICE 12
COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DA LIPASE LIVRE, LIPASE IMOBILIZADA
EM QUITOSANA E LIPOZYME NA ESTERIFICAÇÃO DO BUTANOL
COM ÁCIDO BUTÍRICO

Substrato

Butanol (ButOH): 21,7 g/l

Ácido Butírico (Abut): 47,0 g/l

Reações:

A: 20 ml de substrato + 0,30 gramas de lipase livre

B: 20 ml de substrato + 0,30 gramas de lipase microbiana imobilizada em quitosana

C: 20 ml de substrato + 0,30 gramas de Lipozyme

As reações foram incubadas numa temperatura de 37°C, com agitação.

Reação A: Lipase livre (Atividade = 3400 U/mg sólido)

<i>Tempo (horas)</i>	<i>ButOH (g/l)</i>	<i>ButOH (mM)</i>	<i>ButOH (%)</i>	<i>Abut (g/l)</i>	<i>Abut (mM)</i>	<i>Abut (%)</i>	<i>But Butila (g/l)</i>	<i>But Butila (mM)</i>	<i>Teor de água (%)</i>
0	21,20	290	-	47,71	540	-	2,62	18	2,33
2	15,30	210	27,83	41,88	480	12,20	17,63	122	3,97
4	4,80	60	77,35	23,71	270	50,30	33,55	232	2,66
6	0,80	10	96,22	16,81	190	64,76	39,25	272	1,19
24	0,55	7	97,40	17,94	200	62,40	40,30	279	1,24

Reação B: Lipase microbiana imobilizada em quitosana (Atividade = 23,5 U/mg suporte seco)

<i>Tempo (horas)</i>	<i>ButOH (g/l)</i>	<i>ButOH (mM)</i>	<i>ButOH (%)</i>	<i>Abut (g/l)</i>	<i>Abut (mM)</i>	<i>Abut (%)</i>	<i>But Butila (g/l)</i>	<i>But Butila (mM)</i>	<i>Teor de água (%)</i>
0	21,71	290	-	47,20	540	-	2,61	18	1,89
2	26,27	350	-	41,20	470	12,70	8,20	57	2,33
4	20,58	280	5,20	40,91	470	13,32	8,17	56	3,66
6	17,05	230	21,46	39,76	450	15,76	8,47	59	2,64
24	12,56	170	42,15	29,84	340	36,78	24,89	142	1,69
48	5,18	70	76,14	20,91	240	55,70	30,38	211	1,39

Reação C: Lipozyme (Atividade = 28 U/mg suporte seco)

<i>Tempo (horas)</i>	<i>ButOH (g/l)</i>	<i>ButOH (mM)</i>	<i>ButOH (%)</i>	<i>Abut (g/l)</i>	<i>Abut (mM)</i>	<i>Abut (%)</i>	<i>But Butila (g/l)</i>	<i>But Butila (mM)</i>	<i>Teor de água (%)</i>
0	21,72	290	-	47,71	540	-	2,66	18	3,40
2	12,92	170	40,50	34,82	400	27,02	26,94	187	3,31
4	6,66	90	69,34	24,58	280	48,48	33,40	232	2,11
6	1,56	20	92,83	16,07	180	66,32	38,44	267	1,38
24	1,11	10	94,90	15,07	170	68,41	40,32	280	1,45