

**ALESSANDRA MACHADO BARON**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES  
IMOBILIZADAS PARA UTILIZAÇÃO EM BIOCATÁLISE**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção  
do grau de doutor, Curso de Pós-Graduação em  
Química, Departamento de Química, Setor de  
Ciências Exatas,  
Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nadia Krieger

Curitiba  
2008

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À professora Nadia Krieger, por me acolher em sua equipe, pelo incentivo, confiança, otimismo e por todo estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor David Mitchell, do Departamento de Bioquímica da UFPR, por suas colaborações.

Ao Dr Pierre Villeneuve, do CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) Montpellier/France, por aceitar a cooperação com o nosso grupo, pela orientação e por me acolher em sua maravilhosa equipe.

A todos do CIRAD em especial a Clara e Cecilia, aos alunos Claire, Emmanuelle, Luis, Mickaël e técnicos Bruno, Jérôme, Jorge e Nathalie pelas contribuições e amizade.

Ao professor Luiz Pereira Ramos, do Departamento de Química da UFPR pelos conselhos, amizade e contribuições.

Ao LACTEC (Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento), em especial à Karla, pelas análises em microscopia eletrônica de varredura.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica desta universidade, pelas análises em microscopia eletrônica de varredura.

Ao Lamir (Laboratório de Análises de Minerais e Rocahs), em especial ao José, pelas análises termogravimétricas.

Ao Departamento de Física, desta universidade, por permitir o uso do Microscópio de Força Atômica, em especial à Adriana, por auxiliar na utilização do equipamento.

Ao meu esposo, Orlando, por todo incentivo, amor, paciência, compreensão e companheirismo.

A todos os meus familiares, pelo carinho, estímulo e apoio, e especialmente aos meus pais Celso e Neusa, que tanto contribuíram com a minha formação e me ensinaram que devemos ser persistentes com os nossos desejos e objetivos.

Aos meus amados amigos de laboratório, Arquimedes, Arnaldo, Cinthia, Cristiane, Cryshelen, Danielle, Dayane, Doumit, Ednéia, Érika, Joel, Kátia, Malu, Marcelo, Thaís, Safi, Vivian, Virgínia, pelo agradável ambiente de trabalho, pela amizade e conselhos.

A todos os amigos dos Laboratórios de Produtos Naturais e Ecologia Química, ao Laboratório de Química de Fiotobiomassa e Laboratório de Química do Estado Sólido (em especial ao Gregorio), pela amizade e colaborações.

A todos os meus amigos, em especial a Valéria, Luciana, Emmanuel, Matilte, Mires, Sandrinha e Sérgio, Eliane e Marcos, Sander e Janice, pelo apoio, conselhos e amizade.

Aos amigos com quem tive o prazer de conviver em Montpellier, Tatiane, Antônio, Carla, Mariane, Elena, Marcelo e Aline “By”, pela amizade, pelos momentos de descontração e por dividirem alegrias e tristezas.

A todos os colegas da Pós-Graduação do Departamento de Química.

A todos os professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Química.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

À Univille, especialmente às professoras Sandra Furlan e Regina Gern, pela possibilidade de utilização de equipamentos e laboratórios para a purificação da enzima.

À Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Lipases .....	3
2.1.1. <i>Aspectos Gerais</i> .....	3
2.1.2. <i>Características Cinéticas e Físico-químicas das Lipases</i> .....	9
2.1.3. <i>Vantagens e Desvantagens na Utilização de Lipases</i> .....	12
2.2. Imobilização de Enzimas .....	13
2.2.1. <i>Técnicas de Imobilização</i> .....	14
2.2.2. <i>Imobilização de Lipases</i> .....	16
2.3. Biocatálise em Meio Orgânico.....	20
2.3.1. <i>Vantagens e Desvantagens da Biocatálise em Meio Aquo-Restrito</i> .....	21
2.3.2. <i>Principais Fatores que Influenciam a Biocatálise em Meio Orgânico</i> .....	23
2.3.2.1. <i>Água</i> .....	23
2.3.2.2. <i>Sistemas de Solventes Orgânicos Utilizados em Biocatálise</i> .....	26
2.3.2.2.1. <i>Influência do Tipo de Solvente na Eficiência Catalítica das Lipases</i> .....	29
2.4. Aplicações de Lipases em Síntese de Ésteres.....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
3.1. Objetivo Geral.....	40
3.2. Objetivos Específicos.....	40
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
4.1. Introdução .....	42
4.2. Esterilização dos Meios e Equipamentos .....	42
4.3. Microrganismo .....	42
4.4. Produção da Enzima por Fermentação Submersa.....	42
4.5. Produção do Extrato Lipolítico Bruto de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	43
4.6. Ensaio Preliminares de Purificação .....	43
4.6.1. <i>Precipitação com Sulfato de Amônio</i> .....	43
4.6.2. <i>Delipidação do Extrato Lipolítico Bruto</i> .....	45
4.6.3. <i>Liofilização do Extrato Lipolítico Bruto</i> .....	45
4.6.4. <i>Tratamento do Extrato Lipolítico Bruto com Isopropanol</i> .....	46
4.7. Purificação do Extrato Bruto por Cromatografia de Interação Hidrofóbica .....	46
4.7.1. <i>Eletroforese SDS-PAGE</i> .....	47
4.8. Estudos de Imobilização .....	48
4.8.1. <i>Seleção do Suporte para Imobilização</i> .....	48
4.8.1.1. <i>Procedimentos de Imobilização</i> .....	49
4.8.2. <i>Cinética de Imobilização</i> .....	51
4.9. Simultânea Produção e Imobilização de Lipases (SPIL) .....	52
4.9.1. <i>Planejamento Fatorial</i> .....	53
4.10. Estudos de Utilização da Lipase em Biocatálise em Solventes Orgânicos .....	54
4.10.1. <i>Estabilidade da Lipase Livre e Imobilizada à Temperatura</i> .....	54
4.10.2. <i>Reações de Esterificação do Oleato de Etila</i> .....	55

4.10.3. Determinação da Regiosseletividade e Tiposseletividade da enzima .....	56
4.10.4. Aplicação das Lipases em Reações de Transesterificação .....	59
4.10.4.1. Ensaios preliminares .....	59
4.10.4.2. Otimização da Produção de Ésteres Etilícos do Óleo de Mamona .....	60
4.11. Métodos Analíticos.....	63
4.11.1. Determinação de Atividade Lipolítica.....	63
4.11.1.1. Método da Hidrólise do pNPP em Meio Aquoso .....	63
4.11.1.2. Método da Hidrólise do pNPP em Solventes Orgânicos .....	65
4.11.1.3. Método Titulométrico (pH-Stat).....	66
4.11.1.4. Método de Lowry-Tinsley.....	68
4.11.2. Determinação de Proteínas .....	68
4.11.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	68
4.11.4. Análises em Microscopia de Força Atômica (MFA) .....	69
4.11.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	70
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
5.1. Produção e Purificação da Enzima.....	71
5.1.1. Caracterização do Extrato Bruto .....	71
5.1.2. Liofilização e Delipidação do Extrato Bruto .....	71
5.1.3. Efeito do Isopropanol na Atividade e na Estabilidade da Lipase.....	74
5.1.4. Purificação do Extrato Bruto por Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH) .....	75
5.1.5. Desagregação do Extrato Lipolítico Confirmada por Microscopia de Força Atômica .....	78
5.2. Estudos de Imobilização.....	80
5.2.1. Influência da Adição do Isopropanol Durante a Imobilização .....	80
5.2.2. Seleção do Suporte para Imobilização .....	81
5.2.3. Cinética de Imobilização .....	85
5.3. Simultânea Produção e Imobilização de Lipases (SPIL) .....	86
5.3.1. Estudo da Imobilização SPIL Via Delineamento Fatorial .....	88
5.4. Estudos de Utilização da Enzima em Biocatálise em Solventes Orgânicos.....	96
5.4.1. Efeito da Temperatura na Estabilidade em Solventes Orgânicos da Lipase Livre e Imobilizada .....	96
5.4.2. Reações de Síntese em Meios Aquo-Restritos.....	99
5.4.2.1. Esterificação do Ácido Oléico com Etanol Utilizando a Enzima Livre e Imobilizada .....	99
5.4.2.2. Determinação da Regiosseletividade e Tiposseletividade .....	104
5.4.2.3. Aplicação da Lipase Imobilizada em Reações de Transesterificação .....	109
5.4.2.3.1. Efeito da Atividade de Água ( $a_w$ ).....	110
5.4.2.3.2. Efeito da Concentração da Enzima .....	112
5.4.2.3.3. Efeito da Razão Molar (óleo:álcool).....	113
5.4.2.3.4. Efeito da Temperatura .....	114
5.4.2.3.5. Adição do Etanol em duas Etapas .....	115
5.4.2.3.6. Discussão dos Resultados Referentes ao Estudo de Transesterificação .....	116
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>120</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>123</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>124</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reações catalisadas por lipases. Adaptado de Paques e Macedo (2006).....	4
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática para a hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases. Fonte: Fureby et al. (1997).....	5
<b>Figura 3.</b> Modelo estrutural da lipase de <i>Burkholderia (Pseudomonas) cepacia</i> ligada a 1-fenoxi 2-acetoxi butano. Fonte: Protein Data Bank.....	5
<b>Figura 4.</b> Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica. Adaptado de Paques e Macedo (2006). ....	7
<b>Figura 5.</b> Mecanismo catalítico de lipases. Fonte: Jaeger et al. (1999). ....	8
<b>Figura 6.</b> Principais métodos para imobilização de enzimas. Fonte: Dalla-Vecchia et al. (2004). ....	14
<b>Figura 7.</b> Sistemas de controle de $a_w$ mais utilizados em biocatálise: a) adição direta do sal hidratado no meio reacional b) pré-equilíbrio (individualmente) do substrato, solvente e do biocatalisador. Fonte: Kvittingen (1994). ....	24
<b>Figura 8.</b> Influência da variação de hidratação do biocatalisador ( $a_w$ e porcentagem de água) sobre o rendimento da reação de alcóolise entre a trilaurina (C12) e <i>n</i> -butanol catalisada pela lipase de <i>Carica papaya</i> . Condições: 55 °C, 10% m/m da enzima livre, sem co-solvente. Atividade ótima ( $a_w$ ) para a síntese de 0,22, correspondente a 2% (m/m) de água. Fonte: Villeneuve (2007). ....	25
<b>Figura 9.</b> Atividade da $\alpha$ -quimotripsina ( $\square$ ), da lipase de <i>Mucor</i> sp. ( $\bullet$ ), e da lipase de <i>Candida rugosa</i> (*) em função do $\log P_{\text{octanol}}$ de alguns solventes. (-) unidades arbitrárias. (Fontes: Vermue e Tramper, 1995; Zaks e Klibanov, 1985).....	28
<b>Figura 10.</b> Velocidades iniciais da reação de esterificação do <i>R,S</i> feniletanol com ácido láurico em diferentes solventes (expressos pelo $\log P$ ) catalisadas pelas lipases Chirazyme L2,C3 e ChiroCLEC-PC (Roche Diagnostics). Fonte: Chua e Sarmidi (2006). ....	30
<b>Figura 11.</b> Número de publicações entre 1998 e 2007, usando como palavras-chave: lipase e biodiesel. Fonte: Web of Science em 10/05/2008. ....	36
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática para a produção do extrato lipolítico bruto de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. ....	44
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática do processo de imobilização por adsorção física da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. ....	50
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática para a simultânea produção e imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. ....	53
<b>Figura 15.</b> Sistema TLC-FID composto, por exemplo, por 10 hastes de sílica denominadas S-III <i>Chromarods</i> (a). Em cada haste é possível depositar (por meio de aplicação automática)	

uma amostra contendo lipídeos (b). Após a eluição e secagem em forno (c), as hastes são analisadas no Iatroskan (d). ..... 57

**Figura 16.** Equipamento AquaLab, utilizado para dosar a atividade de água ( $a_w$ ) da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. (a) Região onde a amostra foi depositada antes da medida da  $a_w$ . ..... 61

**Figura 17.** Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada por lipases. .... 63

**Figura 18.** Representação esquemática para a hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases. Adaptado de Mendes et al. (2005). .... 67

**Figura 19.** Atividades residuais e específicas do extrato bruto de *Burkholderia cepacia* LTEB11 após a delipidação, utilizando diferentes sistemas de solventes. EB: extrato bruto em solução; EB-Li: extrato bruto liofilizado; L-L: EB-Li após extração líquido-líquido com metanol/clorofórmio (1:9); S-L 1, S-L 2, S-L 3 e S-L 4: EB-Li após extração sólido-líquido com metanol/clorofórmio (1:9); butanol/clorofórmio (9:1); butanol/clorofórmio (1:9) e *n*-heptano respectivamente. .... 72

**Figura 20.** Estabilidade do extrato bruto de *Burkholderia cepacia* LTEB11 com diferentes concentrações de isopropanol, (10 a 80% v/v) e diferentes temperaturas e tempos de incubação. Condições: (a) 30 min, 37 °C; (b) 16 h, 25 °C, agitação de 200 rpm. A atividade residual foi calculada em relação ao extrato bruto incubado em tampão sem isopropanol. .... 76

**Figura 21.** Perfil cromatográfico dos extratos brutos em coluna de interação hidrofóbica Octyl Sepharose (CIH). Condições: Eluição com gradiente (1) tampão Tris-HCl 0,02 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5; 2) tampão Tris-HCl 0,02 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5, com 60% de isopropanol. Frações de 1 mL, vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>; injeção de 5 mL; volume das frações 1 mL. Absorvância a 280 nm: (●) não-delipidado e (■) delipidado. Atividade (U.mL<sup>-1</sup>): (▼) não-delipidado e (■) delipidado. .... 77

**Figura 22.** Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto (tratado com isopropanol) por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Octyl Sepharose CL-4B. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: extrato bruto; linha 3: extrato bruto tratado com isopropanol 30 %, linha 4: frações eluídas da Octyl Sepharose CL4B. Foram aplicadas 3 mg de proteína. Revelação por nitrato de prata. B) Zimograma utilizando MUF-Butirato como substrato. Fonte: Lima (2004). .... 77

**Figura 23.** Imagem em Microscopia de Força Atômica (MFA) do extrato bruto purificado da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 (sem isopropanol) adsorvida no suporte hidrofóbico Accurel EP 100. (a) Imagem 1x1 µm. 10 (b). *Phase image* da Figura 23a. .... 79

**Figura 24.** Imagem em Microscopia de Força Atômica (MFA) do extrato bruto purificado da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 com 30% de isopropanol adsorvida em silício. 24a. Imagem 4x4 µm. 24b. Imagem 2x2 µm 24c. Imagem 1x1 µm. As imagens obtidas a partir da solução enzimática contendo isopropanol são mais homogêneas. .... 79

**Figura 25.** Imagem em Microscopia de Força Atômica (MFA) do extrato bruto purificado da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 sem isopropanol adsorvida em silício. 25a. Imagem

4x4 $\mu\text{m}$ . 25b. Imagem 2x2 $\mu\text{m}$ . 25c. Imagem 1x1 $\mu\text{m}$ . Observa-se aglomerados nas imagens obtidas a partir da solução enzimática contendo somente tampão fosfato pH 7,0 20 $\text{mmol.L}^{-1}$ . .....	79
<b>Figura 26.</b> Cinética de imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 em Accurel EP 100. Atividade residual no sobrenadante (■) e proteína (●) residual no sobrenadante determinada pelo método do <i>p</i> NPP aquoso e Bradford (1976), respectivamente. ....	85
<b>Figura 27.</b> Fotomicrografia do suporte Accurel EP 100 antes (a,b) e após (c,d) a simultânea produção e imobilização da lipase (SPIL) de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. Adição do suporte após 12 h de fermentação. Aumento: (a,c) 1000 (b,d) 2000 vezes. ....	87
<b>Figura 28.</b> Valores previstos e observados experimentalmente para a atividade ( $\text{U.mg}^{-1}$ de suporte) da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL. ....	90
<b>Figura 29.</b> Distribuição dos resíduos fornecidos pelo modelo polinomial (Tabela 14). ....	90
<b>Figura 30.</b> Efeito da concentração do suporte (10 a 30 $\text{g.L}^{-1}$ ) e do óleo de oliva (0,25 a 1%) na resposta atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL. (a) 3D e (b) 2D. ....	93
<b>Figura 31.</b> Efeito da concentração do óleo de oliva (0,25 a 1%) e do tempo de adição do suporte na resposta atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL. (a) 3D e (b) 2D. ....	94
<b>Figura 32.</b> Estabilidade a 37 °C da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 livre (extrato bruto liofilizado) e imobilizada em Accurel EP 100 em solventes polares e apolares. Condições: O biocatalisador foi incubado por 3 h (em banho termostatizado), em <i>n</i> -heptano (H), etanol (E) e acetonitrila (A). ....	97
<b>Figura 33.</b> Estabilidade a 50 °C da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 livre (extrato bruto liofilizado) e imobilizada em Accurel EP 100 e HDL-L em solventes polares e apolares. Condições: O biocatalisador foi incubado por 3 h (em banho termostatizado), em <i>n</i> -heptano (H), etanol (E) e acetonitrila (A). ....	97
<b>Figura 34.</b> Cinética da síntese do oleato de etila a 37 °C em <i>n</i> -heptano, catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 livre (90 $\text{U.mL}^{-1}$ do meio reacional) (▲), imobilizada de forma convencional (90 $\text{U.mL}^{-1}$ do meio reacional, 450 mg de suporte) (■) e por SPIL (250 $\text{U.mL}^{-1}$ do meio reacional, 450 mg de suporte) (●); razão molar 1:3 (ácido/álcool). ....	100
<b>Figura 35.</b> Cinética da síntese do oleato de etila a 37 °C em ambiente livre de <i>n</i> -heptano, catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 livre (90 $\text{U.mL}^{-1}$ do meio reacional) (▲), imobilizada de forma convencional (90 $\text{U.mL}^{-1}$ do meio reacional, 450 mg de suporte) (■) e por SPIL (250 $\text{U.mL}^{-1}$ do meio reacional, 450 mg de suporte) (●). ....	102
<b>Figura 36.</b> Cinética de transferência de grupos acila catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Formação de TAGs totais na interesterificação entre tricaprilina (TC8:0) com (a) série homóloga de TAGs saturados e (b) insaturados para TC18 (0 a 3 insaturações). Conversão determinada por cromatografia gasosa. ....	107

<b>Figura 37.</b> Representação estrutural da triricinoleína. ....	108
<b>Figura 38.</b> Transesterificação do óleo de mamona catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: etanólise (●) e metanólise (■). Condições: razão molar 1:3 óleo (3 mmol):álcool (9 mmol), 30 mg de enzima imobilizada, 45°C, 300 rpm. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.....	110
<b>Figura 39.</b> Estudo da influência da atividade de água ( $a_w$ ) da enzima na etanólise do óleo de mamona catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Condições: razão molar 1:3 óleo (3 mmol):álcool (9 mmol), 30 mg de enzima imobilizada, 45°C, 300 rpm, 24 h. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa. ....	111
<b>Figura 40.</b> Efeito da concentração enzimática na reação de etanólise do óleo de mamona catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: (▲) 100, (●) 200, (□) 300, (○) 400 U totais. Condições: razão molar 1:3 óleo(3 mmol):álcool (9 mmol), 45°C, 300 rpm. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.....	112
<b>Figura 41.</b> Efeito da razão molar na reação de etanólise do óleo de mamona catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: 400 U totais de enzima, 45°C, 300 rpm, 8 h. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa. ....	113
<b>Figura 42.</b> Efeito da temperatura na reação de etanólise do óleo de mamona catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: razão molar 1:3 óleo(3 mmol):álcool (9 mmol), 400 U totais de enzima, 300 rpm, (■) 30 °C, (●) 45 °C. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa. ....	114
<b>Figura 43.</b> Efeito da adição do etanol em (■) uma e (●) duas etapas na reação de etanólise do óleo de mamona catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: razão molar 1:3 óleo (3 mmol):álcool (9 mmol), 400 U totais de enzima, 300 rpm, 30 °C. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lipases imobilizadas: aplicações em meios aquo-restritos e estudos de novos materiais para imobilização.....	17
<b>Tabela 2.</b> Diferentes aplicações para as lipases de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizadas. ....	18
<b>Tabela 3.</b> Efeito do solvente orgânico na conversão em oleatos de <i>n</i> -pentila e <i>n</i> -propila catalisada pela lipase de <i>Pseudomonas</i> sp. imobilizada em filmes de caseinato de sódio/glicerol (LPS/CS/G)*. ....	29
<b>Tabela 4.</b> Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção do Biodiesel.....	36
<b>Tabela 5.</b> Alguns exemplos de transesterificação (etanólise ou metanólise) de óleos e gorduras catalisada por lipases. ....	38
<b>Tabela 6.</b> Características principais dos suportes empregados para imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. ....	48
<b>Tabela 7.</b> Variáveis e níveis para o delineamento fatorial fracionário com 3 níveis e 3 variáveis para otimização do processo de produção e imobilização simultâneas (SPIL) da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	54
<b>Tabela 8.</b> Tempo de retenção dos triacilgliceróis utilizados nas reações de interesterificação analisados por cromatografia gasosa (coluna HP1-SIM DIST, 100% dimetilsiloxano). ....	59
<b>Tabela 9.</b> Atividade lipolítica do extrato bruto de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 com diferentes substratos em soluções aquosas.....	71
<b>Tabela 10.</b> Tratamento de delipidação no extrato lipolítico bruto de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 liofilizado. Balanço total dos processos mais efetivos: <i>n</i> -heptano (puro) e CH <sub>3</sub> Cl/ <i>n</i> -butanol 9:1.....	74
<b>Tabela 11.</b> Eficiência da imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 em diferentes suportes. ....	82
<b>Tabela 12.</b> Retenção da atividade em meio orgânico da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em suportes hidrofóbicos e hidrofílicos. Condições: 37°C, 15 min, 200 rpm, substrato <i>p</i> NPP (10 mM) em <i>n</i> -heptano.....	83
<b>Tabela 13.</b> Retenção da atividade em meio aquoso da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em suportes hidrofóbicos e hidrofílicos. Condições: 37°C, 5 min.....	84
<b>Tabela 14.</b> Valores experimentais para a atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizadas por SPIL em Accurel EP 100 para o delineamento fatorial fracionário com 3 níveis e 3 variáveis. ....	89
<b>Tabela 15.</b> Análise de Variância da equação prevista para atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL.....	89

<b>Tabela 16.</b> Coeficientes de regressão para a resposta atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 immobilizadas por SPIL em Accurel EP 100 obtidos a partir da Tabela 14. .	91
<b>Tabela 17.</b> Atividade de esterificação da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 immobilizada e livre.....	101
<b>Tabela 18.</b> Produtos da hidrólise da trioleína catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 immobilizada em Accurel EP 100.....	105
<b>Tabela 19.</b> Atividade de interesterificação da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 immobilizada em Accurel EP 100. Formação de TAGs na interesterificação entre tricaprilina (TC8:0) com (a) série homóloga de TAGs saturados e (b) insaturados para TC18 (0 a 3 insaturações).....	106

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Accurel- polipropileno em pó

Amberlite XAD16- poliestireno-divinilbenzeno em esferas

AMP- alumina meso-porosa

AR- atividade Residual

A<sub>600</sub>- absorbância lida em 600 nm

a<sub>w</sub>-atividade termodinâmica de água  $a_w = p_w/p^{\circ}w$

BSA- soroalbumina bovina

CCD- cromatografia em camada delgada analítica

CIH- coluna de interação hidrofóbica

CFG- cromatografia de filtração gel

CG- cromatografia gasosa

DAT- diatomácea (sílica)

EB: extrato bruto

EB-Li: extrato bruto liofilizado;

L-L- extração líquido-líquido

EVA- polietileno vinil acetato

Glu- ácido glutâmico

HDL-L- hidroxiduplolar-laurato

His- histidina

HOZ-L- hidróxido de zinco-laurato

FPLC- sistema de cromatografia líquida- (*Fast Performance Liquid Chromatography*)

FS- fermentação submersa

LB- meio líquido Lúria Bertani

LTEB- Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biotálise

log P- logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água

MEV- microscopia eletrônica de varredura

MFA- microscopia de força atômica

PET- politereftalato de etila

PEBD- polietileno de baixa densidade

pI- ponto isoelétrico

*p*NPP- palmitato de *p*-nitrofenila

$p_w$ -pressão de vapor da água

$p_w^\circ$ - pressão de vapor da água pura

RM- razão Molar

rpm- rotações por min

Ser- serina

SDS-PAGE- gel de eletroforese composto por poli(acrilamida) dodecil sulfato de sódio

S-L- extração líquido-líquido

SPIL- simultânea produção e imobilização de lipases

TAG- Triacilglicerol

T- temperatura (°C)

TC4:0- tributirina

TC8:0- tricaprilina

TC10:0-tricaprina

TC12:0-trilaurina

TC14:0- trimiristina

TC16:0-tripalmitina

TC18:0- triestearina

TC18:1- trioleína

TC18:2- trilinoleína

TC18:3- trilinolenina

TC18: 1  $\Delta^9$  (OH)- triricinoleina

Ácido ricinoléico- 12-hidroxi-9-cis-octadecenóico

Tr- tempo de Retenção

U.mg<sup>-1</sup> - Unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (atividade específica) ou por mg de suporte

U.mL<sup>-1</sup> - Unidade de atividade enzimática volumétrica

PVC- policloreto de Vinila

m/m- massa/massa

m/v - massa/volume

v/v- volume/volume

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivos utilizar suportes hidrofóbicos e hidrofílicos para imobilizar lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Além disso, visou empregar as lipases em reações de síntese de ésteres através de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios aquo-restritos. Dentre 10 suportes disponíveis para a imobilização, Accurel EP 100 (polipropileno) foi selecionado para os estudos em biocatálise por apresentar a melhor eficiência de imobilização e boa retenção da atividade na hidrólise do *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila) em *n*-heptano. Após a seleção do suporte, o procedimento de imobilização foi inovado através da “simultânea produção e imobilização de lipases” (SPIL). O processo SPIL foi estudado por delineamento fatorial  $3^3$  fracionário com três repetições no ponto central. As variáveis independentes estudadas foram: tempo (h) de adição do suporte, concentração de suporte ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração (% v/v) de óleo de oliva no meio de cultura. A nova metodologia de imobilização, aliada aos estudos por delineamento fatorial, foi viável, pois possibilitou um aumento da atividade da enzima imobilizada de  $1,0 \text{ U.mg}^{-1}$  pela metodologia convencional para  $2,6 \text{ U.mg}^{-1}$ . Nos estudos de biocatálise, comparou-se a produção do oleato de etila utilizando a enzima livre e imobilizada em dois sistemas reacionais: contendo *n*-heptano e o etanol como solvente. Para o primeiro, foi observado que o melhor resultado (95 % de conversão em éster, 1 h) foi obtido quando se utilizou a enzima imobilizada por SPIL. Para o segundo, foi obtido 77,5% e 77,4% de éster, respectivamente para as duas preparações imobilizadas pelo processo convencional e por SPIL e de apenas 38% para a enzima livre, após 48 h de reação. Para as reações de interesterificação foi estudado a tiposseletividade (em *n*-heptano) da lipase imobilizada. Nas reações entre a tricaprilina (TC8:0) e TAGs (triacilgliceróis) contendo resíduos acílicos saturados de 4 a 18 carbonos, os estudos mostraram que a eficiência catalítica aumentou com a diminuição da cadeia carbônica, sendo a porcentagem de interesterificação e a atividade específica maior para a tributirina (TC4:0) ( $2880 \text{ U.mg}^{-1}$  e 86% respectivamente) e menor para a triestearina (TC18:0) ( $368 \text{ U.mg}^{-1}$  e 40%). Nos estudos do efeito da insaturação da cadeia, feitas com 0 a 3 insaturações, a atividade específica da enzima diminuiu com o aumento do número de insaturações na cadeia: foi maior e praticamente igual para a triricinoleína [TC18:1  $\Delta^9$  (OH)] ( $1144 \text{ U.mg}^{-1}$ ) e trilinoleína (TC 18:2  $\Delta^{9,12}$ ) ( $1056 \text{ U.mg}^{-1}$ ) e menor para a trilinolenina (TC 18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) ( $432 \text{ U.mg}^{-1}$ ). Quando se avaliou a porcentagem de interesterificação em 24 h, o maior rendimento foi obtido com a (TC 18:2  $\Delta^{9,12}$ ) (67%). Para as reações de transesterificação, utilizou-se o óleo de mamona para a produção de ésteres (etílicos e metílicos) sem co-solvente. A partir da reação de etanolise, estudou-se a influência da atividade de água do biocatalisador ( $a_w$ ), quantidade de enzima, razão molar, temperatura e adição do etanol em duas etapas. O melhor resultado, foi de 96% de produção de ésteres etílicos em 8 h de reação para um sistema sem controle da  $a_w$ , com 150 mg de enzima (400 U), razão molar óleo:álcool 1:3, temperatura de 30 °C e adição do etanol em uma etapa. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a lipase de *B. cepacia* LTEB11, após a imobilização em Accurel, apresentou maior atividade catalítica. Além disso, sua alta estabilidade em solventes orgânicos e versatilidade para catalisar diferentes reações com transferência de grupos acila, torna-a interessante para aplicações em biocatálise.

## ABSTRACT

The aims of this work were, firstly, to study the immobilization of lipases of *Burkholderia cepacia* LTEB11 on hydrophobic and hydrophilic supports and, secondly, to use the immobilized lipases in esterification, interesterification and transesterification reactions in water-restricted systems for the production of esters. Amongst ten supports, Accurel EP100 (polypropylene) gave the highest immobilization efficiency and the highest *p*NPP-hydrolyzing activity in *n*-heptane. A novel immobilization method, denoted “Simultaneous Production and Immobilization of Lipases” (SPIL), was developed. A 3<sup>3</sup> factorial experiment with three repetitions of the central point was used to optimize this method. The independent variables were the time of addition of the support, the concentration of support added and the concentration of olive oil in the culture medium. These optimization studies enabled an increase in the specific activity of the immobilized preparation from 1.0 U.mg<sup>-1</sup>, obtained for conventional post-cultivation immobilization on Accurel, to 2.6 U.mg<sup>-1</sup>. In the studies of biocatalysis, the synthesis of ethyl oleate was compared using free enzyme, conventionally immobilized enzyme and enzyme immobilized by the SPIL method. Two solvents, *n*-heptane and ethanol, were used in different reactions. In the *n*-heptane system the best result (a 95% ester yield in 1 h) was obtained using enzyme immobilized by the SPIL method. Similar ester yields were only obtained after 3 h with the conventionally immobilized enzyme and after 4 h with the free enzyme. After 48 h in the ethanol system, both the conventionally immobilized enzyme and that immobilized by the SPIL method gave a 77% yield, while the free enzyme gave a yield of only 38%. In interesterification reactions the typoselectivity for fatty acid chain size was studied using tricaprylin (TC8:0) and triacylglycerols containing saturated acyl groups from 4 to 18 carbons. The catalytic efficiency increased with decrease in length of the acyl chain, with the percentage of interesterification and the specific activity being greatest for tributyrin (TC4:0) (86% and 2880 U.mg<sup>-1</sup>, respectively) and lowest for tristearin (TC18:0) (40% and 368 U.mg<sup>-1</sup>). The specificity of the immobilized enzyme for unsaturations was studied using tricaprylin and triacylglycerols C18 with 0 to 3 unsaturations. The specific activity decreased with increase in the number of unsaturations: high values were obtained for triricinolein (TC18:1 Δ<sup>9</sup> (OH), 1144 U.mg<sup>-1</sup>) and trilinolein (TC 18:2 Δ<sup>9,12</sup>, 1056 U.mg<sup>-1</sup>), while a low value was obtained for trilinolenin (TC 18:3 Δ<sup>9,12,15</sup>, 432 U.mg<sup>-1</sup>). The highest percentage interesterification at 24 h was obtained with trilinolein (67%). For the transesterification reactions, ethanolysis of castor bean oil was studied, without any co-solvent. The effects of the water activity, the amount of enzyme, the oil to alcohol molar ratio and the temperature were studied, as well as the addition of ethanol in two stages. The best result, with a 96% ethyl ester yield in 8 h, was obtained with a reaction system without control of water activity, with 150 mg of enzyme (400 U), a 1:3 oil to alcohol molar ratio, a temperature of 30 °C and with a single addition of ethanol. This work has demonstrated that the lipase of *B. cepacia* LTEB11 shows a greater catalytic activity after immobilization in Accurel. Further, the versatility of this enzyme in catalyzing different acyl transfer reactions makes it interesting for applications in biocatalysis.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas vem crescendo nos últimos anos em diferentes campos de aplicação, tais como a indústria química, farmacêutica, cosmética ou de alimentos. As pesquisas dos últimos anos levaram a uma melhor compreensão do comportamento catalítico das enzimas e, juntamente com a engenharia molecular, conduziram às novas aplicações de várias enzimas como, por exemplo, proteases, acilases, oxidase, amilases, glicosidasas, celulases e lipases (Villeneuve, 2007). A respeito das lipases (E.C.3.1.1.3 triacilglicerol éster hidrolases), as aplicações têm destaque na síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica, como por exemplo: a) na indústria oleoquímica, para a hidrólise e interesterificação regioseletiva de óleos e gorduras e síntese de biosurfactantes; b) na síntese de poliésteres biodegradáveis; c) na indústria farmacêutica, na síntese de intermediários de produtos biologicamente ativos, como o naxopreno e ibuprofeno e na resolução de misturas racêmicas, como a síntese do Atenolol, medicamento usado no tratamento de hipertensão; d) na indústria de alimentos: síntese de aromas, síntese do aspartame e na maturação de queijos; e) na indústria de cosméticos: na síntese de ésteres como o palmitato de isopropila (emoliente em produtos para a pele e óleos para banho) e f) produção de biodiesel (Singh et al., 2008; Hasan et al., 2006).

Lipases têm sido utilizadas amplamente em meios não-aquosos ou aquo-restritos, devido a sua alta habilidade catalítica em solventes orgânicos, disponibilidade comercial, estereoseletividade e possibilidade de utilização em larga escala de pH e temperatura (20 a 70 °C) (Pilissão e Nascimento, 2006). Mas o conhecimento sobre a atuação destas e de outras enzimas em meios orgânicos é ainda bastante limitado, quando comparado com o que se conhece sobre a atuação de enzimas em fase aquosa (Persson et al., 2002a). O ambiente natural e biológico das enzimas é o meio aquoso, sendo que os fundamentos da enzimologia

em meio não-aquosos foram estabelecidos muito recentemente e mesmo assim, ainda resta muito a esclarecer (Krieger et al., 2004; Klibanov, 2001; Lima e Angnes, 1999).

Apesar da alta eficiência catalítica das enzimas, fatores ligados ao custo e à estabilidade limitam a utilização destes biocatalisadores. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas com a finalidade de minimizar estes inconvenientes, como por exemplo, a imobilização de enzimas, que possibilita a reutilização do biocatalisador, permite a separação dos produtos do meio reacional de forma fácil e muitas vezes melhora a eficiência catalítica da enzima (Wang e Hsieh, 2008; Sabbani et al., 2006).

Dentro deste contexto, este trabalho pretendeu contribuir para o conhecimento dos principais parâmetros que influenciam na imobilização de lipases por adsorção. Procurou-se inovar o procedimento de imobilização através da “simultânea produção e imobilização de lipases” (denominada neste trabalho por SPIL), com a finalidade de reduzir custos do processo mantendo a qualidade do biocatalisador (alta atividade catalítica e estabilidade em reações em solventes orgânicos). Além disso, a posterior utilização das enzimas em biocatálise justificou a realização deste trabalho, cujo objetivo principal foi a preparação e caracterização de lipases imobilizadas, e a sua utilização em síntese de ésteres em meios aquo-restritos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Lipases

#### 2.1.1. Aspectos Gerais

As lipases são biocatalisadores extremamente versáteis e muito eficientes que, ao lado de esterases e proteases, têm uma posição de destaque nestes meios reacionais, devido à gama de reações catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos com baixo teor de água (esterificação, interesterificação, aminólise, lactonização) (Figura 1), (Yin et al., 2006; Kim et al., 2006a), à estabilidade apreciável nestes ambientes e à possibilidade de utilização de condições reacionais brandas (Bouaid et al. 2007; Rassy et al., 2004).

As lipases [glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3)] pertencem a um grupo especial de esterases, cuja definição clássica descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (Figura 2). São constituídas pela tríade catalítica G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G, onde G= glicina; S= Serina; X<sub>1</sub>= histidina e X<sub>2</sub>= ácido glutâmico ou aspártico (Jaeger e Reetz, 1998) (Figura 3). Atuam sobre substratos pouco solúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando, por exemplo, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 8 átomos de carbono), seus substratos naturais, além de serem capazes de catalisarem reações de síntese, em ambientes aquos-restritos (Côté e Shareck, 2008; Ericsson et al., 2008). A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (Brady et al., 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag et al., 1997) e da lipase pancreática humana (Winkler et al., 1990) por difração de raio X, propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas é recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid”, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases.

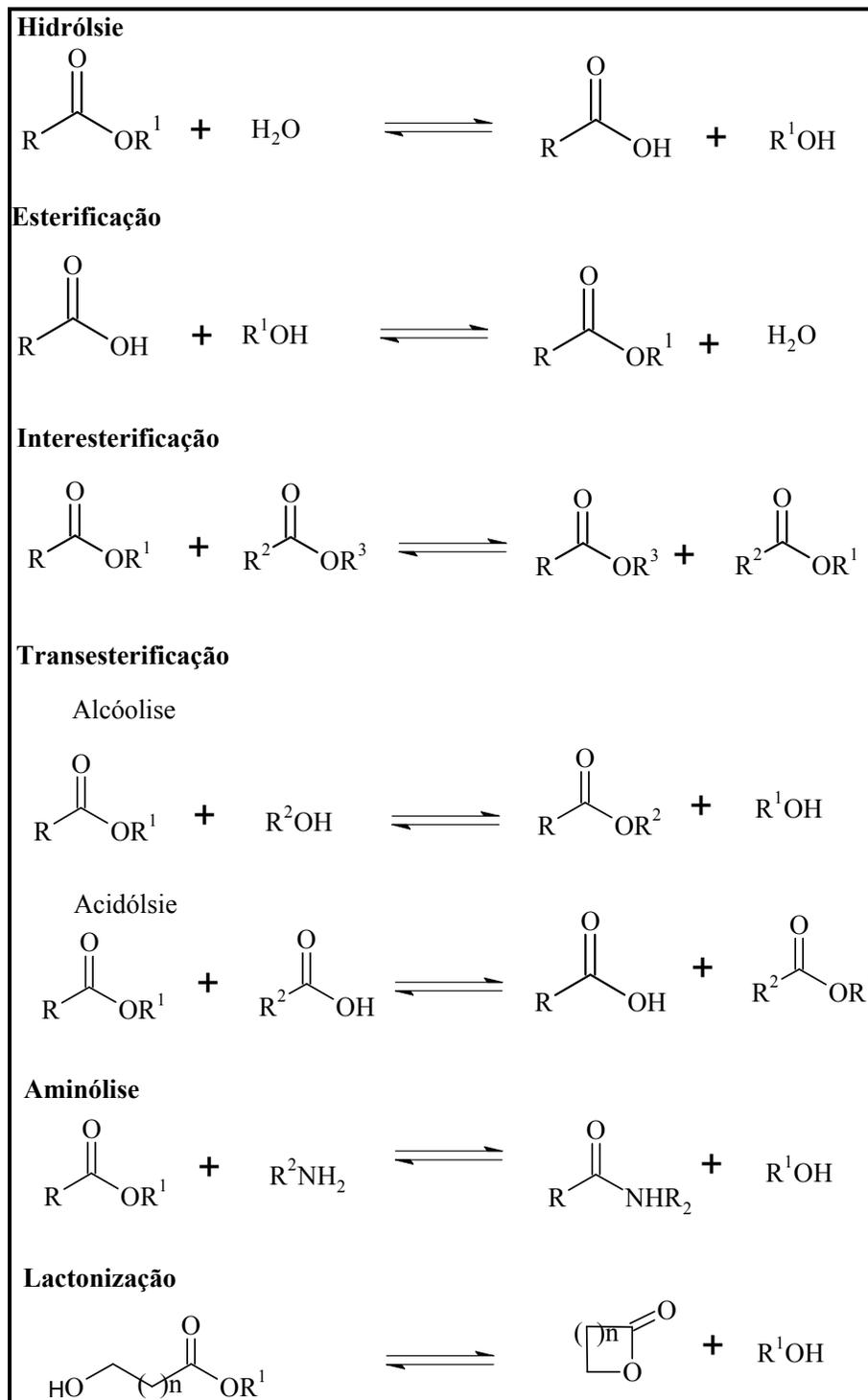
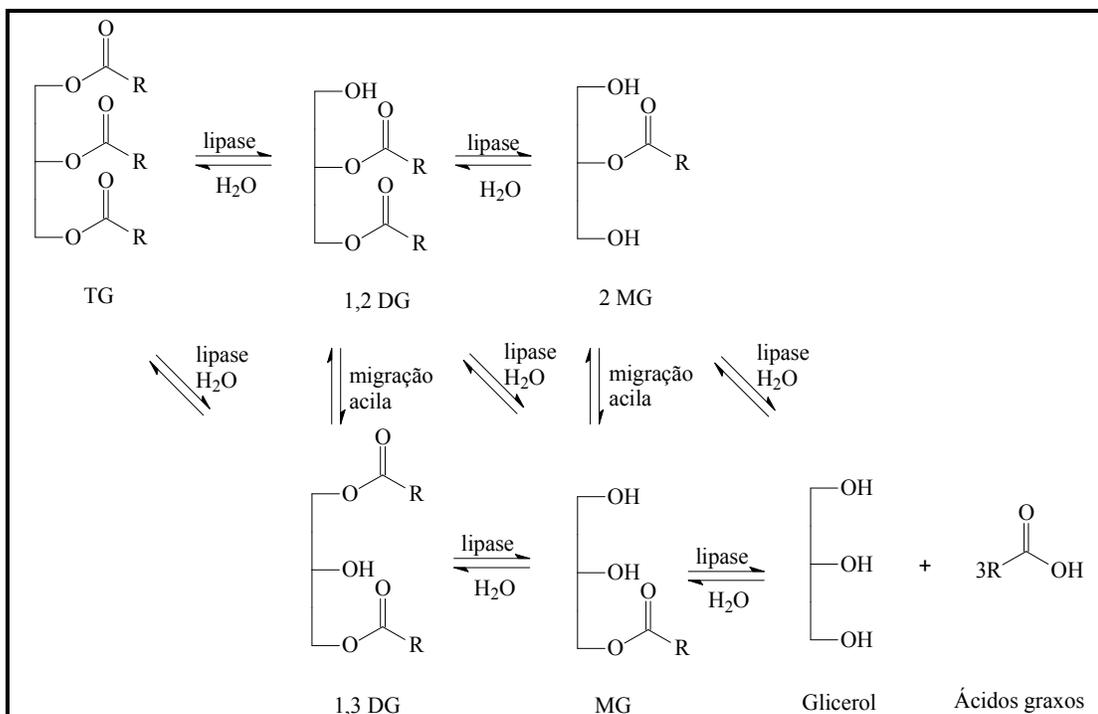
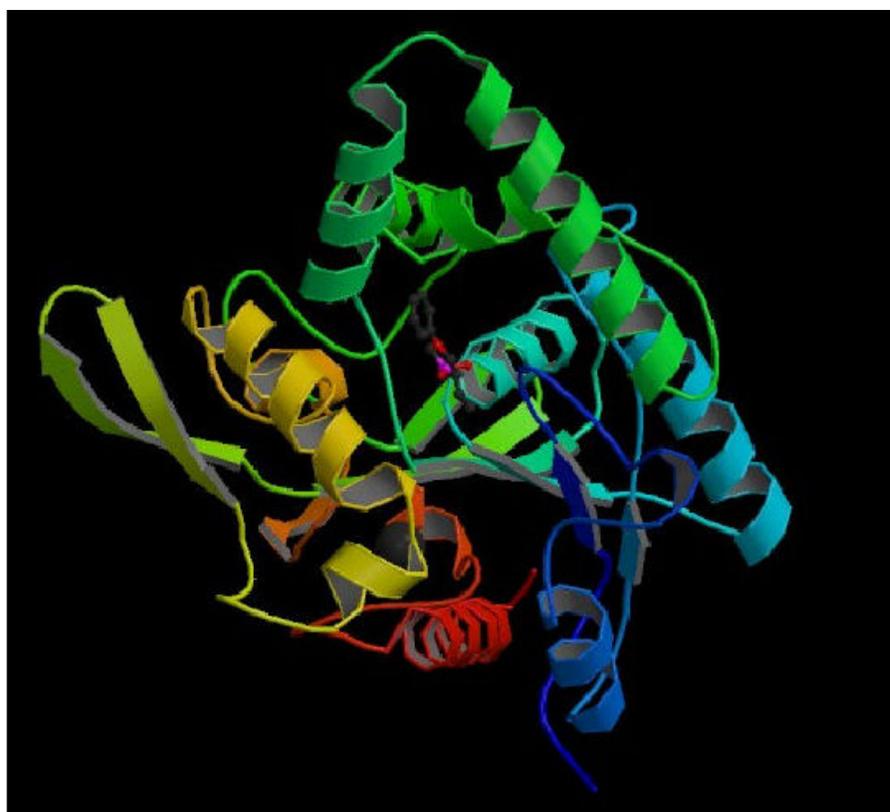


Figura 1. Reações catalisadas por lipases. Adaptado de Paques e Macedo (2006).



**Figura 2.** Representação esquemática para a hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases. Fonte: Fureby et al. (1997).



**Figura 3.** Modelo estrutural da lipase de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* ligada a 1-fenoxi 2-acetoxi butano. Fonte: Protein Data Bank.

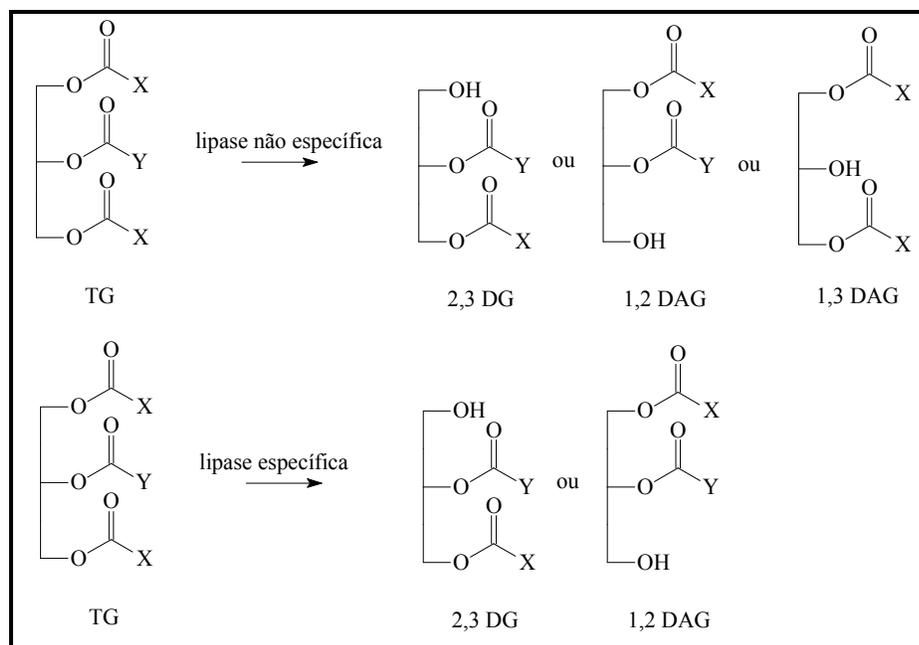
Entretanto, para algumas lipases observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial (Thomas et al., 2005), tendo sido descritas lipases como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a “lid” em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (Jaeger e Reetz, 1998). Por outro lado, algumas lipases são consideradas como esterases (EC 3.1.1.1.), pois embora atuem em reações contendo substratos de cadeia longa possuem uma “lid” incompleta ou não apresentam a “lid” e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica. São exemplos deste comportamento particular a cutinase de *Fusarium solani* e as lipases de *C. antarctica*, *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, (Ali et al., 2004; Nini et al., 2001; Cygler e Schrag, 1997). Além disso, a literatura relata ainda a habilidade de acil-coenzimas (acil-CoA) ativar lipases em soluções aquosas na ausência de uma interface lipídeo-água (Bañó et al., 2003).

As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeias menores são tidas genericamente como esterases (Jaeger et al., 1999); entretanto, mais recentemente tem sido aceita a definição que considera como uma lipase verdadeira a enzima que hidrolisa acilgliceróis acima de 8 carbonos (Côté e Shareck, 2008; Rhee, et al., 2005).

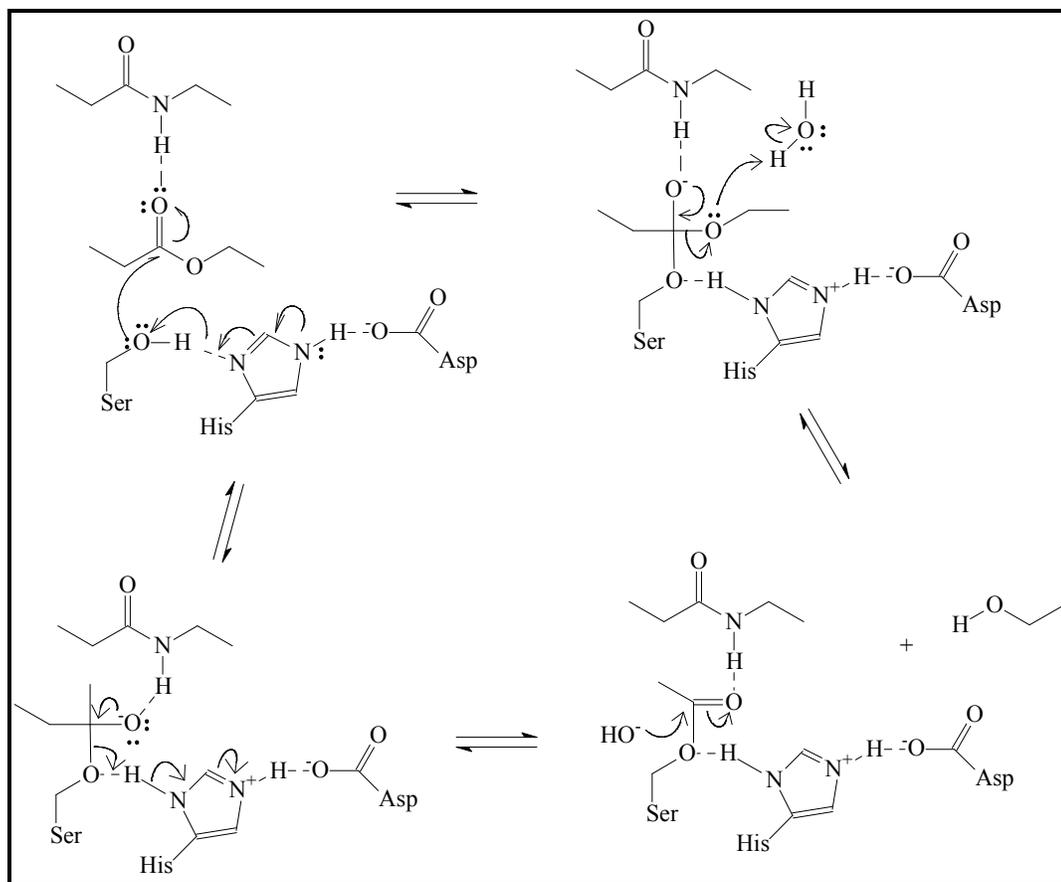
A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (Salameh e Wiegel, 2007; Brockman, 1984; Bier, 1955). Deve-se

ênfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger et al., 1999).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade preferencial das duas enzimas. Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação, de substrato ou por fatores que afetam a ligação enzima-substrato. Há vários tipos de especificidade encontrados: a) quanto ao substrato: diferentes velocidades de hidrólise entre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis catalisadas por uma mesma enzima ou enzimas purificadas de uma mesma fonte; b) posicional ou regioseletividade: hidrólise preferencial de ésteres primários, secundários, terciários ou hidrólise não específica, liberando ácidos graxos das três posições (Figura 4); c) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato ou tiposseletividade: preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações; d) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros, no caso de substratos racêmicos. Pode-se observar também a combinação dos tipos citados ou a ausência de especificidade (Paques e Macedo, 2006; Castro et. al, 2004).



**Figura 4.** Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica. Adaptado de Paques e Macedo (2006).



**Figura 5.** Mecanismo catalítico de lipases. Fonte: Jaeger et al. (1999).

As lipases diferem grandemente com respeito à origem (bacteriana, fúngica, vegetal, animal) e propriedades cinéticas. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de microrganismos, obtidas por meio de fermentação, são preferíveis às de fontes animais e plantas por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. Vários gêneros de microrganismos podem ser empregados para produção de lipases, tais como os fungos dos gêneros *Trichosporon*, *Botrytis*, *Pichia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, leveduras como gênero *Tulopsis*, e *Candida*, e bactérias do gênero *Streptomyces*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (Hasan et al., 2006; Faber, 2004).

### **2.1.2. Características Cinéticas e Físico-químicas das Lipases**

Embora, o pH ótimo das lipases seja normalmente entre 6,0 e 8,0 (Nawani e Kaur, 2007; Shu et al., 2006; Kamini et al., 2000), valores extremos podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, para a lipase de *Kluyveromyces lactis* (Oishi et al., 1999), o pH ótimo para atividade, foi de 2, e a lipase de *P. cyclopium* (Ibrik et al., 1998) apresentou pH ótimo para a atividade de 10. No caso da temperatura para a atividade máxima, valores muito distintos são encontrados entre lipases microbianas: 5 °C, para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* B68 (Luo et al., 2006) e 97°C para a lipase de *Pyrococcus horikoshii* (Ando et al., 2002).

Com relação à estabilidade ao pH, os protocolos experimentais variam com relação aos tempos e condições de incubação adotadas, entretanto, algumas conclusões gerais podem ser observadas. Nas lipases bacterianas, observa-se uma tendência de maior estabilidade em valores alcalinos de pH; entretanto, verifica-se com frequência estabilidade em faixas de pH desde fortemente ácido (pH 2) a fortemente alcalino (pH 12). São exemplos de lipases bacterianas estáveis em ampla faixa de pH as produzidas por *P. aeuruginosa* (Karadzic et al., 2006) estáveis entre pH 4 e 11,5; por *P. cepacia* (Sugihara et al., 1992), estáveis entre pH 3 e 11,5 e por *S. epidermidis* (Simon et al., 1998), estáveis entre pH 2 e 10.

A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial como as lipases, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50 °C. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à termoestabilidade; entretanto, não há padronização nas metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa. Há vários exemplos de lipases bacterianas estáveis em temperaturas acima de 70 °C, como as lipases de

*B. circulans* (Kademi et al., 2000), *P. cepacia* (Sugihara et al., 1992), *S. solfataricus* (Morana et al., 2002), *A. fulgidus* (Manco et al., 2000), *C. rugosa* LIP4 (Lee et al., 2002).

Outras características de lipases, como suas massas molares, encontram-se normalmente entre 19 e 65 kDa (Bandmann et al., 2000; Cygler e Schrag, 1997, Nagao et al., 1996), mas podem variar desde 8 kDa (Sarada et al., 1992) a 180 kDa (Oh et al., 1999). Os pontos isoelétricos (pI) comumente determinado para lipases fúngicas e de leveduras está entre 4 e 6, com algumas exceções com valores de pI entre 7 e 9. Para lipases bacterianas, entretanto, têm sido verificados valores bastante diversos, variando entre 4 e 10 (Lima, 2004).

A espécie bacteriana *P. cepacia*, recentemente renomeada de *Burkholderia cepacia* (Reetz e Jaeger, 1998), é uma bactéria gram-negativa produtora de lipases com características de alta estabilidade e atividade. As lipases produzidas por cepas de *B. cepacia* possuem uma grande estabilidade em solventes orgânicos e um alto grau de enantioseletividade. Como consequência, têm sido utilizadas na resolução quiral de racematos, produzindo enantiômeros puros (Puech-Guenot et al., 2008; Jaeger et al., 1997). Por exemplo, Yang et al. (2007) clonaram a lipase de *B. cepacia* G63 com a finalidade de aumentar sua a estabilidade térmica e em solventes orgânicos. A enzima apresentou atividade ótima a 70 °C e a estabilidade nesta temperatura foi de 86,1% de atividade residual após 10 h. A enzima apresentou estabilidade em solventes orgânicos, destacando-se a sua estabilidade em solução 50% de metanol (atividade residual de 98,3% após 48 h de reação). Observou-se ainda atividade de transesterificação do óleo de soja para a produção de ésteres metílicos: 87,8% de rendimento em ésteres em 72 h em meio reacional contendo 138 mg de enzima, 4,6 g de óleo de soja, 0,6 mL metanol (razão molar 3:1 álcool:óleo), 138 mg de enzima, 5% de água, 40°C e 200 rpm. Estes resultados indicaram que a enzima tem potencial para a produção do biodiesel. Yu et al. (2007) reportaram o isolamento de uma lipase de *B. cepacia* ATCC 25416 com alta enantioseletividade (E=170, 96% de pureza óptica e 50% de conversão) na hidrólise do

acetato de (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanoíla (mentila) para L-mentol. Além disso, lipases de *P. cepacia* estão sendo comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) e têm sido utilizadas como aditivos em detergentes e em reações sintéticas em química orgânica, principalmente na síntese de compostos quirais a partir de misturas racêmicas (Salum et al., 2008; Li e Kanerva et al., 2007; Chebil et al., 2007).

A cepa *Burkholderia cepacia* LTEB11, utilizada neste trabalho, produz uma lipase com massa molar por volta de 33 kDa, caracterizada por eletroforese em gel SDS (Lima, 2004). A escolha deste microrganismo foi devido a algumas características importantes apresentadas pela lipase por ele produzida. Estudos anteriores mostraram que a atividade volumétrica ( $30 \text{ U.mL}^{-1}$ ) frente ao *p*NPP (palmitato de *p*-nitro fenila) produzida no meio de fermentação é alta, quando comparada com a produzida por microrganismos selvagens e também isolados no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (*Penicillium aurantiogriseum*  $13 \text{ U.mL}^{-1}$  em 72 h, *P. corylophilum*  $7 \text{ U.mL}^{-1}$  em 120 h) (Lima et al., 2004; Baron et al., 2005). Além disso, com relação à utilização da lipase de *B. cepacia* LTEB11 em biocatálise, umas das características mais importantes é a sua estabilidade em solventes orgânicos polares e apolares. Experimentos prévios comparativos entre a lipase comercial de *B. cepacia*, produzida pela Amano Pharmaceutical Co. Ltd (Nagoya, Japan) (lipase PS) e a lipase *B. cepacia* LTEB11 em diferentes solventes mostraram que ambas têm alta estabilidade nos solventes orgânicos testados e o solvente onde houve menor estabilidade foi, para as duas, a acetona (100%). A maior atividade residual para a lipase de *B. cepacia* LTEB11 foi observada em etanol 80% ( $195,0 \pm 23\%$ ) e para a lipase de *B. cepacia* da Amano em isopropanol 100% ( $169,9 \pm 7\%$ ). Com relação aos solventes apolares, a primeira foi mais estável em *n*-heptano ( $121,0 \pm 6\%$ ) e a outra em isooctano ( $148 \pm 4,6\%$ ). Outra característica importante com relação à lipase de *B. cepacia* LTBE11 é a sua atividade de esterificação e transesterificação. Estudos anteriores mostraram que a enzima imobilizada em Accurel EP

100 catalisou a síntese do oleato de etila em *n*-heptano com rendimento de 100% em 3 h de reação. O catalisador foi reutilizado por 11 vezes com máxima atividade. Observou-se ainda que a atividade decresceu 50% após 24 vezes de reutilização (Salum et al., 2008). Fernandes et al. (2007) estudaram a viabilidade de utilização da lipase de *B. cepacia* LTEB11 produzida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos agroindustriais na síntese de ésteres etílicos, obtidos por reações de esterificação e transesterificação do óleo de milho. Foi utilizado o próprio fermentado sólido (contendo a enzima) para catalisar as reações de síntese de ésteres. Utilizando 90 U totais de enzima (sólido fermentado), a conversão em oleato de etila (esterificação) foi de 94% em 18 h, razão molar (RM) álcool:óleo 5 e 37 °C. Para a etanolise do óleo de milho, obteve-se 95% de ésteres em 120 h (RM 6, 68 U e 37 °C).

### ***2.1.3. Vantagens e Desvantagens na Utilização de Lipases***

A utilização de lipases e de enzimas em geral em escala industrial apresenta diversas vantagens relativamente à catálise química e aos catalisadores em geral (Villeneuve, 2007; Soo, et al., 2004; Watanabe et al., 2001). Dentre elas, pode-se citar a sua elevada seletividade (químio-, régio- e enantioseletividade); a diminuição de riscos para a saúde, quando utilizadas na indústria alimentar; os baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Além disso, lipases são aceitas ecologicamente, não estão limitadas ao seu papel natural e podem catalisar um grande espectro de reações. Entretanto, algumas desvantagens podem limitar a utilização destes catalisadores, como o alto custo de isolamento e purificação, a possibilidade de causar alergias, a instabilidade da sua estrutura uma vez isolada do meio natural (aquoso), e sua sensibilidade às condições reacionais: enzimas podem ser inibidas por substâncias que estão presentes no meio reacional, desnaturadas por solventes orgânicos ou por temperaturas relativamente elevadas (Faber,

2004). Muitos métodos têm sido propostos a fim de minimizar estes inconvenientes, sendo um deles a imobilização de enzimas sobre suportes sólidos, metodologia escolhida neste trabalho e, que será relatada a seguir.

## **2.2. Imobilização de Enzimas**

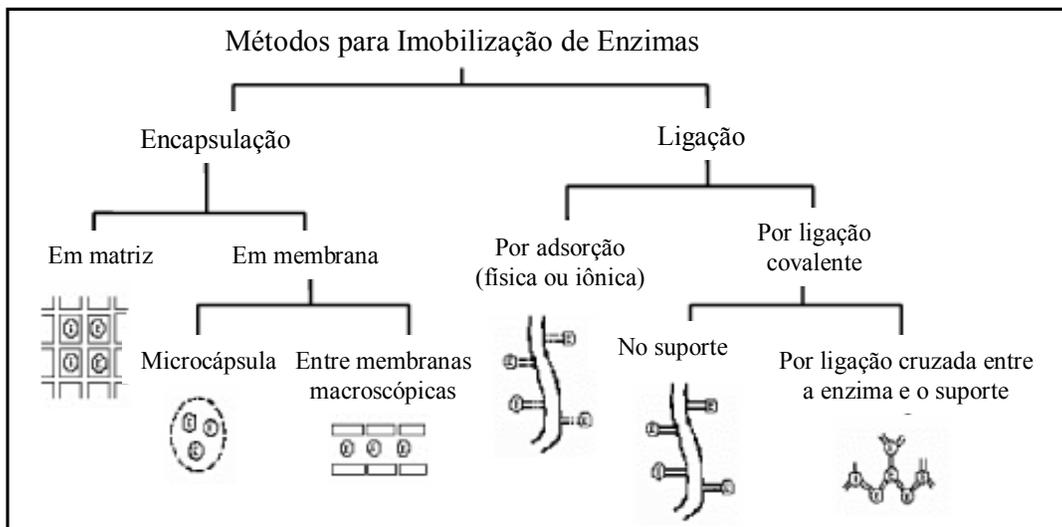
Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio de reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio (Girelli e Mattei, 2006; Paiva et al., 2000). As pesquisas sobre este assunto intensificaram-se a partir dos anos 60, no sentido de estabelecer métodos eficientes de imobilização, quer por meios físicos ou químicos, (Vitolo, 2001).

A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um período razoável de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo o seu uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados pode diminuir o custo do processo, caso este possa ser reutilizado, aumentar a rapidez e a repetibilidade do processo, facilitar na recuperação dos produtos, melhorar o controle de operação de processos em reatores e minimizar a produção de efluentes. Além disso, muitas vezes com o processo de imobilização as propriedades enzimáticas são alteradas, produzindo biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas, dependendo do tipo de imobilização e da enzima (Sebrão et al., 2007; Persson et al., 2002b; Fernandez-Lafuente et al., 1998). Os métodos de imobilização estão disseminados, tanto em aplicações industriais, como em sistemas de análise. Exemplos de aplicações analíticas envolvendo enzimas imobilizadas são os biossensores, os reatores para análises cromatográficas ou em sistemas de análise por injeção em fluxo, podendo ainda destacar-se as aplicações envolvendo *kits* para titulações e para imunoenaios (Lu et al., 2007; Muck e Svatos, 2007, Lima e Angnes, 1999). Entretanto, foram também relatadas algumas

desvantagens com relação aos procedimentos de imobilização, como perda de atividade ou inibição enzimática, limitações difusionais, além de muitas vezes, dependendo do tipo de imobilização, os métodos serem trabalhosos e bastante demorados e acarretarem custos adicionais na produção de um biocatalisador (Villeneuve et al., 2000; Lima e Angnes, 1999). Para que estas desvantagens sejam minimizadas é necessário conhecer as propriedades do suporte, a natureza da enzima e as condições (técnicas) de imobilização (Bryjak et al., 2008).

### 2.2.1. Técnicas de Imobilização

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos (Girelli e Mattei, 2006). Os principais processos de imobilização podem ser promovidos através da encapsulação ou ligação (Dalla-Vecchia et al., 2004; Vitolo, 2001) (Figura 6).



**Figura 6.** Principais métodos para imobilização de enzimas. Fonte: Dalla-Vecchia et al. (2004).

A imobilização por encapsulação pode ser subdividida em: **(a)** separação por membranas - neste método a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável, e que por sua vez pode ser subdividida

em: encapsulamento, onde a enzima é imobilizada no interior de esferas não-rígidas, cujo envoltório é constituído por um polímero geleiforme e semipermeável; ou em membranas fibrosas semipermeáveis, que consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução, através de uma membrana semipermeável. A separação por membranas acarreta em limitações difusionais intensas. **(b)** Entrelaçamento em polímero ou matriz - neste caso, as enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geleiforme. A eficiência do entrelaçamento, a permeabilidade do gel e sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do monômero utilizado. **(c)** Imobilização por formação de ligação covalente - como o próprio nome sugere, a enzima é ligada ao suporte mediante ligações químicas covalentes ou através de ligações cruzadas, que são normalmente estabelecidas entre os aminogrupos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima, com os grupos reativos do suporte. Como as interações entre a enzima e o suporte são fortes, pode ocorrer perda da atividade causada por modificações na estrutura cataliticamente ativa (Foresti e Ferreira, 2007). **(d)** Imobilização por adsorção - este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der Waals”, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, se comparado aos outros tipos de imobilização, e por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica. A adsorção depende do pH da solução enzimática, obtendo-se valores máximos de adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que, no valor de pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada (Vinu et al., 2005; Gonçalves, 1999). A adsorção de enzimas em superfícies pode induzir a algumas alterações conformacionais na molécula da enzima, devido a interações entre a enzima e o suporte. Suportes hidrofóbicos conseguem adsorver maiores

quantidades de enzima e a densidade da camada de adsorção também pode ser maior, relativamente aos suportes hidrofílicos. Estes resultados indicam que as interações entre a enzima e o suporte são bastante fortes nos suportes hidrofóbicos, o que pode causar, em alguns casos, maiores alterações conformacionais na enzima. Quando se utiliza suporte menos hidrofóbicos, a retenção da atividade aumenta, mas a quantidade de proteína adsorvida diminui e as interações entre a enzima e o suporte serão menores. Este tipo de imobilização pode também ser considerado como uma etapa de purificação parcial da enzima, uma vez que a proteína pode ser seletivamente adsorvida sobre o suporte (Gonçalves, 1999).

### **2.2.2. Imobilização de Lipases**

Dentre todos os métodos de imobilização, a adsorção ainda é o mais utilizado, devido à grande porção hidrofóbica das lipases, à facilidade e simplicidade na metodologia, e por ser economicamente mais barato e menos agressivo em relação à atividade enzimática. No caso de lipases, verificou-se que o processo de imobilização por adsorção e por interação hidrofóbica pode propiciar uma ativação da enzima e um aumento de sua estabilidade frente à temperatura (Secundo et al., 2008; Knezevic et al., 2002; Paiva et al., 2000).

Os suportes mais reportados para imobilização de lipases podem ser divididos em duas categorias: matrizes hidrofóbicas e matrizes hidrofílicas com ligantes hidrofóbicos. Lipases usadas industrialmente são imobilizadas em suportes sólidos e estáveis, dentro de uma destas duas categorias (Petkar et al., 2006). Como exemplos, pode-se citar as lipases de *C. antarctica* A e B e *R. miehei* (Roche Diagnostics Penzberg, Germany) imobilizadas em polipropileno (Accurel EP 100) e lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM, IM) e de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL, IM), ambas da Novozym (Bagsvaerd, Danmark), imobilizadas sobre resina de troca iônica e sílica gel respectivamente (Soumanou et al., 2003).

Outros suportes como celite, octil-silica, aminopropil silica, Eupergit C250L, também são comumente utilizados para imobilização de lipases (Petkar et al., 2006).

Nos últimos anos de pesquisas sobre imobilização de lipases, duas vertentes a respeito do assunto vêm sendo reportadas. A primeira diz respeito a estudos utilizando enzimas imobilizadas (normalmente comerciais), visando altos rendimentos de reação, resolução de misturas racêmicas, e reutilização da enzima em reações diversas (Yagiz et al., 2007; Torres et al., 2006, Adamczak et al., 2005; Ghamgui et al., 2004). A segunda está relacionada com estudos visando à utilização de novos materiais para imobilização destas enzimas como nanofibras de polianilina magnética (Lee et al., 2008), polietilenimina-agarose (Torres et al., 2006), membranas de algodão e polisulfona (Tan et al., 2006), sílica mesoporosa hexagonal (Yadav e Jadhav, 2005), entre outros. Quando se estudam novos materiais, buscam-se principalmente suportes que aumentem a atividade relativa após a imobilização, a faixa de pH ótimo para a atividade e a estabilidade térmica (Kim et al., 2006; Ye et al., 2006). A Tabela 1 apresenta alguns exemplos a respeito da utilização de lipases imobilizadas e estudos referentes a novos materiais para a imobilização destas enzimas.

**Tabela 1.** Lipases imobilizadas: aplicações em meios aquo-restritos e estudos de novos materiais para imobilização.

<i>Fontes de Lipases</i>	<i>Finalidade</i>	<i>Principais Resultados</i>	<i>Referências</i>
<i>Pseudomonas sp., Rhizopus oryzae, Mucor javanicus, Aspergillus niger, Candida rugosa (Amano) e Thermomices lanuginosus e Mucor miehei (Novozymes)</i>	Imobilização em filmes de caseinato de sódio/glicerol para síntese de ésteres	Retenção da atividade de 100% para a lipase de <i>Pseudomonas sp</i> e de 300% para a de <i>R. oryzae</i> na síntese do oleato de <i>n</i> -pentila (condições 5 mmol de ácido oléico e <i>n</i> -pentanol, 100 mg de enzima, 35 °C, 24 h). A lipase de <i>Pseudomonas sp.</i> manteve-se estável após a imobilização (144 dias) e foi reutilizada por 8 vezes sem perdas de atividade.	Sebrão et al. (2007).

**Tabela 1.** Lipases imobilizadas: aplicações em meios aquo-restritos e estudos de novos materiais para imobilização (Continuação).

<i>Fontes de Lipases</i>	<i>Finalidade</i>	<i>Principais Resultados</i>	<i>Referências</i>
<i>Mucor javanicus</i> (Fluka)	Imobilização em nanopartículas de sílica funcionalizada (covalente)	Melhor resultado utilizando sílica funcionalizada com etilenediamina e glutaraldeído. Retenção da atividade (R) de 115% (dosagem em butirato de <i>p</i> -nitro fenila). A enzima imobilizada perdeu 10% da atividade a 50 °C e menos de 40% a 60 °C (enzima livre perdeu 35 % e 80% respectivamente) em 2 h de incubação.	Kim et al. (2006).
<i>Candida antartica</i> (CAL-B) Novozymes	Imobilização em polietilenimina-agarose (Entrelaçamento em polímero) Resolução do R,S metanoato de 2-fenil-2-hidroxi acetato	A enantioseletividade (E) é influenciada pelas condições de imobilização. E= 3,5 para imobilização em pH 5,0 e 4 °C e E= 25 para imobilização em pH 5,0 e 25 °C.	Torres et al. (2006).
<i>Candida antartica</i> (CAL-B) imobilizada Chirazyme L-2 Roche Diagnostics	Síntese do oleato de ascorbila	Rendimento máximo de 63% em 24 h com acetona. Reutilização da enzima por 10 dias com rendimento de 30% no último dia. Condições: oleato de metila: ácido ascórbico 4:1; $a_w$ 0,11; 50 mg de enzima; 45 °C, 500 rpm.	Adamczak et al. (2005).
Extrato bruto de <i>Rhizopus oryzae</i>	Imobilização em sílica gel 60, amberlite IRC-50, carboxi metil sefadex, celite 545 e CaCO <sub>3</sub> (Adsorção). Síntese do oleato de n-butila em hexano e meio livre de solvente	Melhor suporte: CaCO <sub>3</sub> eficiência de imobilização (E) de 93,75%. Rendimento máximo: 73% em 24 h com hexano (15 U.mL <sup>-1</sup> do meio reacional). Reutilização por 6 vezes sem decréscimo de atividade. Condições: álcool: ácido 1:1; 37 °C, 200 rpm.	Ghamgui et al. (2004).

A respeito da utilização de lipases imobilizadas oriundas de *B. cepacia*, observa-se diferentes tipo de imobilização, assim como diferentes aplicações destas enzimas imobilizadas. Alguns exemplos podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Diferentes aplicações para as lipases de *Burkholderia cepacia* imobilizadas.

<i>Procedência da Lipase</i>	<i>Suporte/Tipo de Imobilização</i>	<i>Finalidade e Principais Resultados</i>	<i>Referência</i>
LTEB11	Accurel EP 100 (adsorção)	Comparação da atividade, em solvente orgânico, ( <i>n</i> -heptano) da enzima livre, encapsulada em micelas reversas e imobilizada. A enzima imobilizada foi duas vezes mais ativa que a livre e cinco vezes mais ativa que a encapsulada por micelas reversas. A otimização da esterificação do oleato de etila permitiu rendimento de 100% em 3 h de reação e a enzima foi reutilizada 11 vezes sem perdas de atividade.	Salum et al. (2008).
<i>Amano</i>	Encapsulação por sol-gel e ligação cruzada com glutaraldeído	Aplicação em reações contendo solventes orgânicos. A atividade da enzima aumentou (174%) após a imobilização por ligação cruzada.	Hara et al. (2008).
<i>Amano</i>	Hidrogel – <i>beidellite</i> $\text{Na}_x(\text{Al}_2)(\text{Si}_{4-x}\text{Al}_x)\text{O}_{10}(\text{OH,F})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Adsorção)	Verificar a influência de diferentes composições dos íons do suporte na imobilização da enzima. A atividade específica (dosada pela transesterificação do acetato de vinila com <i>n</i> -octanol) foi maior para os suportes com baixa concentração de alumínio e sódio.	Secundo et al. (2008).
<i>Amano</i>	Celite	Resolução de misturas racêmicas ( $\beta$ -lactamas substituídas com flúor) ee 99%	Li e Kanerva (2007).
<i>Amano</i>	Sem descrição	Síntese regioseletiva do fluxuridina de 3'-O-caproila. A conversão foi >99% e a regioseletividade foi de 93,5% (40U de enzima, razão molar de caproato de vinila: fluxuridine 7,5, 35°C, acetona ou acetonitrila)	Li et al. (2007).
<i>Amano</i>	Celite (adsorção)	Síntese do biodiesel (alcóolise) de óleo de <i>Jatropha</i> *. 98% de rendimento, 50°C, 4-5% (m/m) de água em 8 h, 10% de enzima com relação ao óleo (0,5 g), razão molar óleo:álcool 1:4. A enzima foi reutilizada por 4 vezes sem perdas de atividade.	Shah e Gupta (2007).
<i>Amano</i>	Sílica aerogel com fibras de quartzo e secas pela técnica do CO <sub>2</sub> supercrítico (encapsulação)	Estudos de imobilização e aplicação na transesterificação do óleo de girassol com acetato de metila. A enzima imobilizada no gel contendo 40% de metiltrimetoxisilano apresentou os melhores resultados (60% em 350 h).	Orçaire et al. (2006).

**Tabela 2.** Diferentes aplicações para as lipases de *Burkholderia cepacia* imobilizadas (continuação).

<i>Procedência da Lipase</i>	<i>Suporte/Tipo de Imobilização</i>	<i>Finalidade e Principais Resultados</i>	<i>Referência</i>
<i>Amano</i>	Celite (adsorção)	Comparação de preparações enzimáticas para síntese enantioseletiva do (R, S)-4-Hidroxi-3-metil-2-(2'-propenil)-2-ciclopenteno-1-ona com acetate de vinila. A enantioseletividade foi ( <i>E</i> ) >100 a 30°C em 1 h.	Xu et al. (2005).
<i>Amano</i>	Accurel EP 100	Preparação de lipases para uso em solventes orgânicos. A lipase imobilizada apresentou atividade específica (950 U/g) 20 vezes superior ao extrato bruto (48 U/g) na reação entre ácido caproico com 1-fenil etanol em hexano.	Persson et al. (2002b).
<i>Amano</i>	<i>Toyonite</i> 200 M Caulim em condições ácidas), Celite, Amberlite, bolas de vidro (adsorção)	Comparação de imobilização em diferentes suportes. A imobilização das enzimas em <i>Toyonite</i> 200 M apresentou maior seletividade na adsorção de lipases que os demais suportes	Kamori et al. (2000).
<i>Amano</i>	Sol-gel CH <sub>3</sub> Si(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> com nanoestrutura de magnetite (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) (encapsulação)	Atividade de 300% após a imobilização (dosagem pela esterificação do ácido láurico com <i>n</i> -octanol em isooctano).	Reetz et al, (1998).

\**Jatropha* (*Jatropha curcas*): planta conhecida popularmente como “pinheiro manso” cujas sementes contém 37,5% em óleo.

### 2.3. Biocatálise em Meio Orgânico

O termo biocatálise abrange os processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato em um produto que tenha alguma aplicação, com um número limitado de etapas enzimáticas. O termo biotransformação, que é geralmente utilizado quando se usa o microrganismo inteiro no meio reacional, está associado ao metabolismo do microrganismo e consiste em transformar compostos tóxicos em substâncias atóxicas (Wackett e Hershberger, 2001). Em reações metabólicas, a água é o solvente preponderante e conseqüentemente, este solvente foi e ainda é utilizado em inúmeros estudos de cinética enzimática, devido principalmente à idéia preconcebida de que este é o único ambiente adequado para a manutenção da conformação estrutural da enzima cataliticamente ativa.

Entretanto, observou-se que o uso exclusivo de água como solvente em meios reacionais restringia a gama de aplicações da biocatálise e limitava a produtividade de diversos processos, notadamente os que envolviam substratos hidrofóbicos. Por outro lado, a constatação de que muitas enzimas, tais como lipases, esterases, desidrogenases e aquelas responsáveis pelo metabolismo xenobiótico (que transformam compostos tóxicos em menos tóxicos ou atóxicos), que operam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos, levou à conclusão de que estes meios, predominantemente não-aquosos, também podem ser adequados à expressão de atividade enzimática. A convergência destes dois aspectos (limitação do uso da água como meio reacional devido à incompatibilidade dos substratos e constatação de que algumas enzimas são ativas em ambientes com pouca água) conduziu à utilização de diferentes tipos de meios reacionais, como solventes orgânicos, fluidos supercríticos e fluidos iônicos, fases gasosas ou fases sólidas, aos quais se convencionou atribuir a designação de meios não-convencionais ou meio aquo-restritos (Petersson et al., 2007; Krieger et al 2004, Sellek e Chaudhuri, 1999). Entretanto, é importante salientar que, mesmo quando se utiliza o termo “solventes orgânicos”, no caso de reações catalisadas por enzimas, um teor mínimo de água é requerido para a manutenção da sua estrutura cataliticamente ativa (Serdakowski e Dordick, 2008; Klibanov, 2001). Assim, em muitos trabalhos são encontrados termos como “aquo-restritos” e “em solventes orgânicos” ou “não-convencionais” para designar reações catalisadas por enzimas onde a água não é o solvente.

### ***2.3.1. Vantagens e Desvantagens da Biocatálise em Meio Aquo-Restrito***

Inúmeras pesquisas têm demonstrado as vantagens da biocatálise em meios aquo-restritos, oferecendo uma oportunidade ímpar para o desenvolvimento de novas tecnologias. No caso de solventes orgânicos, algumas vantagens ao se utilizar o sistema são: **a)** a catálise pode ser alcançada de forma eficiente com substratos pouco polares e pouco solúveis em

água, o que é especialmente recomendado para lipases, que atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces; **b)** para as reações de esterificação, interesterificação ou transesterificação, catalisadas por enzimas, além da vantagem da maior solubilidade dos substratos e produtos, a biocatálise em ambientes aquos-restritos permite um baixo teor de água no sistema, necessário para deslocar o equilíbrio termodinâmico da reação no sentido da síntese; **c)** o solvente pode induzir modificações na estrutura enzimática, aumentando a sua eficiência catalítica ou a sua especificidade frente ao substrato; **d)** as reações indesejáveis, bem como a inibição da enzima pelo substrato ou pelo produto podem ser reduzidas, uma vez que estes compostos estão normalmente dissolvidos no solvente orgânico, e portanto, fora do contato com a enzima; **e)** a estabilidade térmica das enzimas pode ser aumentada, pois estas assumem uma conformação mais rígida; **f)** a contaminação microbiana diminui; **g)** muitos solventes orgânicos possuem ponto de ebulição menor que da água favorecendo a remoção dos solventes; **h)** finalmente, a imobilização pode ser desnecessária, porque, em princípio, enzimas são insolúveis em solventes orgânicos. Quando, porém, a imobilização é requerida, a simples adsorção da enzima em suportes sólidos, uma vez que ela não desorve do substrato ao meio reacional (Ichinose et al., 2005; Gotor, 2002; Hazarika et al., 2002; Secundo e Correa, 2002; Roy et al., 2001).

As desvantagens que a biocatálise em solventes orgânicos pode apresentar são: **a)** o solvente pode reduzir a atividade enzimática, devido à desnaturação da proteína; **b)** nos sistemas bifásicos pode acontecer a inativação enzimática interfacial; **c)** aumento das limitações difusionais à transferência de massa de substratos ou produtos, uma vez que se introduz, além da fase aquosa, uma ou mais fases, líquida-líquida, no caso da fase orgânica apolar ou líquida-líquida-sólida, quando além do solvente apolar, estiver presente o biocatalisador imobilizado; **d)** deve-se considerar ainda os custos adicionais para a imobilização da enzima, a segurança do processo e o tratamento dos efluentes, incluindo a

possível necessidade de reutilização do solvente orgânico (Castro e Knubovets, 2003; Sellek e Chaudhuri, 1999).

### ***2.3.2. Principais Fatores que Influenciam a Biocatálise em Meio Orgânico***

#### ***2.3.2.1. Água***

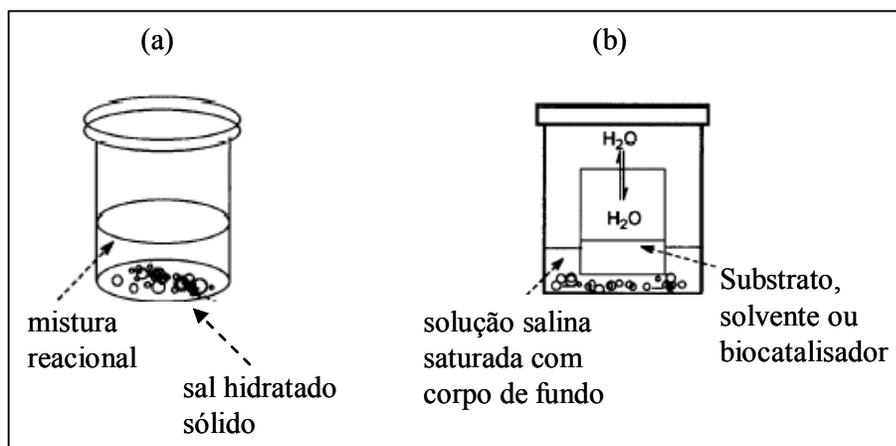
O conteúdo de água é um parâmetro crucial na biocatálise em meio orgânico, sob dois aspectos: o primeiro, relativo ao equilíbrio termodinâmico da reação - em uma reação de síntese, o excesso de água pode deslocar o equilíbrio em favor da hidrólise do produto; o segundo diz respeito à necessidade de uma camada de água ao redor da molécula de proteína, fundamental para a manutenção da sua estrutura terciária e sua atividade catalítica (Foresti et al., 2007; Gayot e Coulon, 2003).

A quantidade mínima de água necessária para manter a enzima ativa denomina-se camada de água essencial, pois protege a enzima de desnaturação pelos solventes orgânicos. A camada essencial de água pode ser quantificada através da atividade termodinâmica da água ( $a_w$ ) (Halling, 1989), que é definida como a pressão parcial da água ( $p_w$ ) sobre a pressão parcial da água pura ( $p_w^\circ$ ) (Equação 1). Citado como o parâmetro mais importante para as reações catalisadas por enzimas, a  $a_w$  é considerada mais eficaz para explicar resultados de rendimentos de reações do que os teores de água (%) do meio reacional (Villeneuve, 2007). A atividade de água representa a umidade relativa do sistema considerado, situando-se os valores de  $a_w$  entre 0 a 1. Em  $a_w$  de 1 já existe uma fase aquosa distinta.

$$a_w = \frac{p_w}{p_w^\circ} \quad (1)$$

Em um sistema de solventes orgânicos, este parâmetro pode ser controlado adicionando misturas de sais com um determinado teor de água ao solvente e aos substratos ou incubando-se separadamente a enzima, o solvente e os substratos em cubas

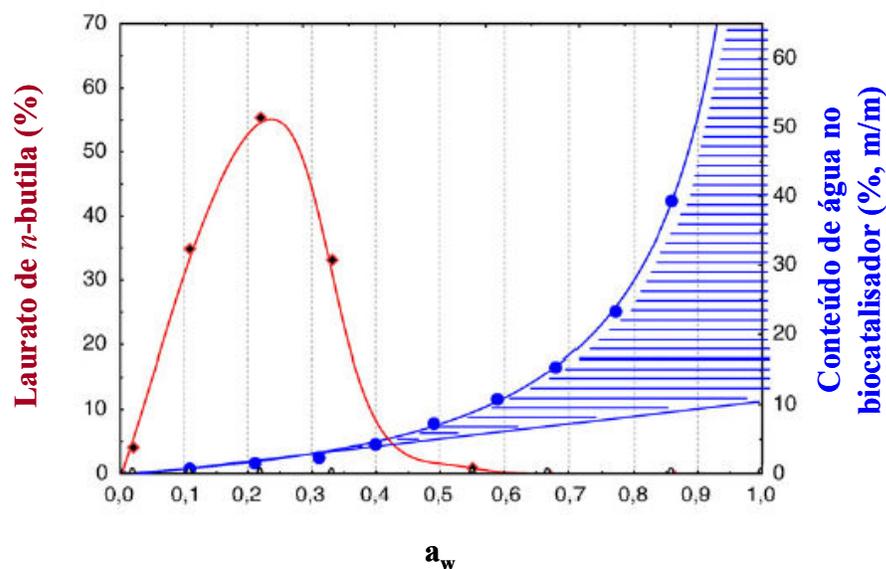
hermeticamente fechadas contendo soluções salinas saturadas (Figura 7 a,b) (Petersson et al., 2007; Sellek e Chaudhuri, 1999; Kvittingen, 1994). Apesar de esta ser a forma mais simples de controle da  $a_w$ , algumas desvantagens podem ser citadas.



**Figura 7.** Sistemas de controle de  $a_w$  mais utilizados em biocatálise: a) adição direta do sal hidratado no meio reacional b) pré-equilíbrio (individualmente) do substrato, solvente e do biocatalisador. Fonte: Kvittingen (1994).

Primeiramente, cita-se a dificuldade de manter o sistema hermeticamente fechado durante a reação para assegurar a  $a_w$  inicial. Em segundo lugar, a  $a_w$  não é controlada durante a reação, já que o equilíbrio para a obtenção de uma determinada  $a_w$  é feito antes da reação. Para minimizar este inconveniente, alguns autores propuseram a adição no meio orgânico de membranas de silicone ou o uso de tubulação semi-permeável de silicone contendo os sais saturados, para permitir um melhor contato destes sais com o meio orgânico (Villeneuve, 2007). Mais recentemente, uma nova metodologia para controlar a  $a_w$  *in situ* foi proposta por Petersson et al. (2007). Estes autores desenvolveram um sistema que contém um sensor que mede a atividade de água no espaço livre do reator. Este sistema é acoplado a um computador e uma unidade de controle é programada para deixar o ar úmido ou seco, ajustando a atividade de água quando necessário.

Para uma mesma reação, o valor ótimo da  $a_w$  depende consideravelmente da enzima empregada ou quando imobilizada, do tipo de suporte, devido aos diferentes grupos funcionais e arranjos tridimensionais que cada enzima possui ou da hidrofobicidade do suporte onde a enzima se encontra imobilizada (Salis et al., 2003). Além disso, o valor ótimo de  $a_w$  depende ainda do solvente e co-solvente, da polaridade e da quantidade dos substratos (Foresti et al., 2007). Entretanto, em geral, quando se estuda reações catalisadas por enzimas contendo diferentes níveis de hidratação governados pela  $a_w$ , o resultado da conversão do produto em reações com transferência de grupos acila, segue o modelo em forma de sino, similar ao apresentado na Figura 8.



**Figura 8.** Influência da variação de hidratação do biocatalisador ( $a_w$  e porcentagem de água) sobre o rendimento da reação de alcóólise entre a trilaurina (C12) e *n*-butanol catalisada pela lipase de *Carica papaya*. Condições: 55 °C, 10% m/m da enzima livre, sem co-solvente. Atividade ótima ( $a_w$ ) para a síntese de 0,22, correspondente a 2% (m/m) de água. Fonte: Villeneuve (2007).

Neste exemplo, estudou-se a habilidade da lipase de *Carica papaya* (látex) de catalisar a reação de alcóólise entre a trilaurina (C12) e *n*-butanol através da variação da  $a_w$  na enzima. O resultado (Figura 8) mostrou, através do perfil em forma de sino, que para esta enzima, a variação da  $a_w$  influenciou fortemente no rendimento do produto. A  $a_w$  ótima para a

formação do laurato de *n*-butila foi de 0,22 correspondente a 2% (m/m) de água na enzima. Além disso, é igualmente importante estudar o efeito da  $a_w$  da enzima através da curva de adsorção de água do biocatalisador (parte azul da Figura 8) a fim de definir seus diferentes níveis de hidratação. Neste exemplo, observa-se que a melhor  $a_w$  para a lipase está situada na região linear da curva de adsorção ( $0,05 < a_w < 0,35$ ). O nível ótimo de hidratação ocorre na parte linear da isoterma de adsorção do biocatalisador, onde as moléculas de água podem formar mono ou camadas múltiplas com a proteína. Para atividades de água maiores que 0,22, ocorre absorção de água em excesso, pela enzima, o que acarreta no deslocamento do equilíbrio da reação em favor da hidrólise, diminuindo a formação do éster (Villeneuve, 2007).

#### **2.3.2.2. *Sistemas de Solventes Orgânicos Utilizados em Biocatálise***

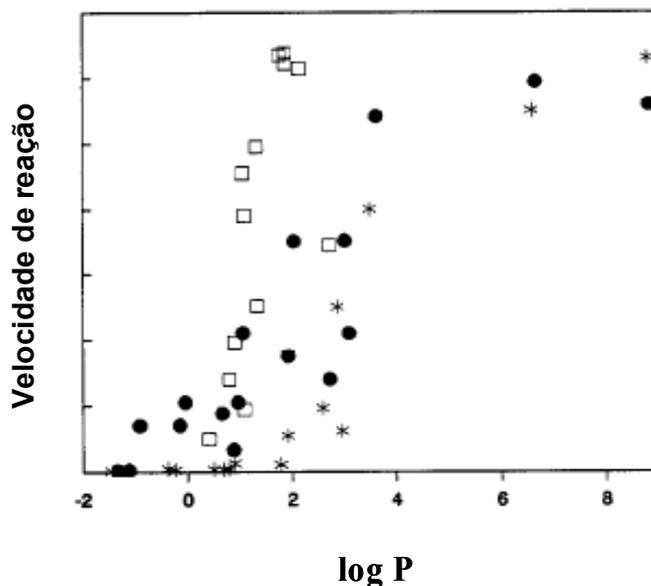
Em biocatálise, a estratégia mais interessante é realizar reações livres de solventes ou co-solventes. Entretanto, quando isso não é possível, a escolha de um solvente adequado é de importância primordial. Para a escolha de solventes, deve-se levar em conta os efeitos do solvente orgânico no sistema reacional, incluído a atividade da enzima, que podem ser diretos ou indiretos. Os indiretos estão relacionados à partição de reagentes e de produtos, à alteração do equilíbrio químico e à transferência de massa em sistemas de duas ou mais fases. Os efeitos diretos são responsáveis pela redução da atividade e pela inativação da enzima através de dois mecanismos: primeiramente, pela interação solvente-enzima, que altera a conformação nativa da proteína, pela quebra das ligações de hidrogênio. A segunda possibilidade de efeito do solvente orgânico sobre a atividade seria pela interação direta com a água essencial em torno da molécula enzimática. Solventes polares são capazes de absorver água e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades

catalíticas por inativação ou desnaturação (Villeneuve, 2007; Gupta e Roy, 2004; Simon et al., 1998).

Basicamente, em biocatálise, a escolha do solvente obedece primariamente à classificação dos solventes em hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo que os hidrofóbicos são geralmente reputados por preservarem a atividade catalítica durante a reação, conforme citado acima. Entretanto, não são apropriados para reações com substratos de diferentes polaridades, como por exemplo, na esterificação de açúcares, que combina uma parte hidrofílica (açúcar) com uma parte hidrofóbica (ácido graxo). Nestes casos, a melhor opção é a escolha de solventes com polaridades intermediárias como os álcoois terciários, por exemplo, pois normalmente não são solventes desnaturantes. Finalmente, para a escolha do solvente, deve-se levar em conta a sua toxicidade. Como um exemplo, pode-se mencionar a piridina, utilizada frequentemente como meio reacional em reações catalisadas por lipases (Therisod e Klibanov, 1986; Mutua e Akoh, 1993; Sin, et al., 1998; Chopineau, et al., 1998). Embora este meio possa às vezes conduzir para maiores rendimentos da reação, seu uso deve ser evitado devido à toxicidade elevada do solvente.

Para classificar um solvente como hidrofóbico ou hidrofílico e verificar o seu efeito na atividade catalítica, vários parâmetros podem ser utilizados (Chua e Sarmidi, 2006; Hazarika et al., 2002; Sellek e Chaudhuri, 1999): o parâmetro de solubilidade de Hildebrand,  $\delta$ ; solvatocromismo do corante,  $E_T$ . Um corante é considerado solvatocrômico quando seus espectros de absorção de UV/Vis ou IR são extremamente sensíveis à mudanças, dependendo da polaridade do solvente onde se encontram. Assim, é possível obter-se uma escala empírica da polaridade de solventes através dos espectros destes compostos em diferentes solventes e assim obter o parâmetro denominado  $E_T$ . Além desses parâmetros, são citados a constante dielétrica,  $\epsilon$ ; o momento dipolar,  $\mu$ , e o parâmetro  $\log P$ , o logaritmo do coeficiente de partição, sendo este último um dos mais utilizados. A medida da hidrofobicidade do solvente

através do log P considera o logaritmo do coeficiente de partição do solvente num sistema padrão n-octanol/água, conhecido como parâmetro de Hansch. O valor de log P de um dado solvente pode ser determinado experimentalmente ou calculado através do método das constantes hidrofóbicas fragmentadas de Rekker (Mannhold e Rekker, 2000).



**Figura 9.** Atividade da  $\alpha$ -quimotripsina ( $\square$ ), da lipase de *Mucor* sp. ( $\bullet$ ), e da lipase de *Candida rugosa* (\*) em função do  $\log P_{\text{octanol}}$  de alguns solventes. (-) unidades arbitrárias. (Fontes: Vermue e Tramper, 1995; Zaks e Klibanov, 1985).

Trabalhos realizados em diferentes sistemas biocatalíticos, envolvendo o uso de solventes com diferentes hidrofobicidades, confirmaram a existência de uma tendência generalizada para a relação entre a atividade catalítica e a hidrofobicidade do solvente, traduzida por uma curva sigmoide (Figura 9). Em média, solventes com log P inferior a 2-3 são considerados desnaturantes, enquanto aqueles com log P superiores a 4-5 são considerados biocompatíveis, muito embora os pontos de inflexão sejam dependentes do biocatalisador. O deslocamento do ponto de inflexão também pode ser motivado pelo grau de agitação do meio (Krieger et al., 2004, Fernandes et al., 2001).

### 2.3.2.2.1. Influência do Tipo de Solvente na Eficiência Catalítica das Lipases

Muitos trabalhos têm reportado a influência do solvente na eficiência catalítica das lipases. Sebrão et al. (2007) estudaram o efeito do solvente na esterificação do oleato de *n*-pentila e *n*-propila usando uma lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada em filme de caseinato de sódio/glicerol. Dos solventes testados (Tabela 3) aqueles com log P acima de 2,50, ou seja, os menos polares, foram os mais eficientes na catálise enzimática, formando os oleatos de *n*-pentila e de *n*-propila com conversões entre 24-58% e 53-60%, respectivamente. Usando solventes com log P menores que 2,50, ou seja os mais polares, os produtos foram obtidos em menores conversões (0-17% para o oleato de *n*-pentila e 0-35% para o oleato de *n*-propila).

**Tabela 3.** Efeito do solvente orgânico na conversão em oleatos de *n*-pentila e *n*-propila catalisada pela lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada em filmes de caseinato de sódio/glicerol (LPS/CS/G)\*.

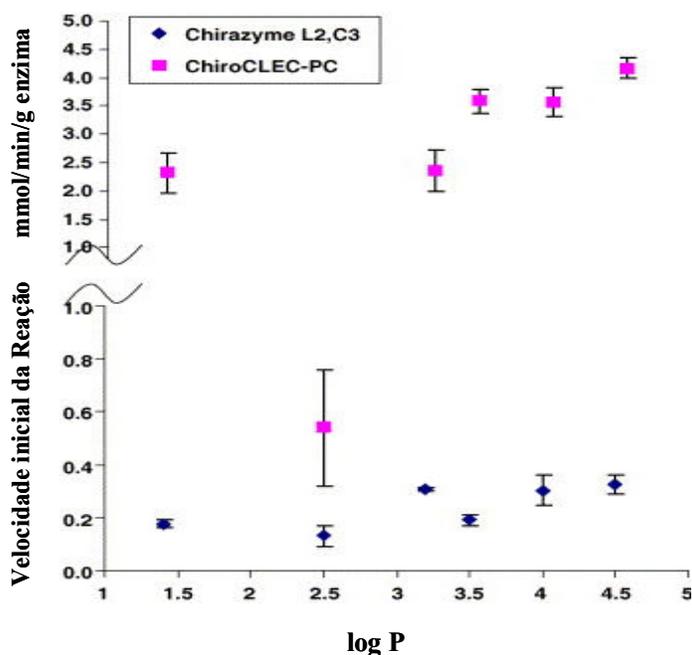
Solvente	Log P	Conversão (%)	
		Oleato de <i>n</i> -pentila	Oleato de <i>n</i> -propila
<i>n</i> -Heptano	4,00	58	53
<i>n</i> -Hexano	3,50	24	55
Cicloexano	3,20	31	60
Tolueno	2,50	39	n.d.
Diclorometano	1,50	6	n.d.
<i>t</i> -Butanol	1,45	8	10
Éter metil <i>t</i> -butílico	1,43	8	35
Éter etílico	0,83	n.d.	n.d.
Acetona	-0,23	8	n.d.
Acetonitrila	-0,33	17	35

\* Condições: 5 mmol de ácido oléico e 5 mmol de álcool, 50 mg de enzima, 35 °C, 24 h, 20 mL de solvente, n.d.: não detectado. Fonte: Sebrão et al. (2007).

Deve-se salientar que, com a acetonitrila, apesar de este ter sido o solvente mais polar neste estudo (log P -0,33), as conversões em oleatos de *n*-pentila e *n*-propila, 17 e 35% respectivamente, foram maiores que com os outros solventes polares, tais como acetona ou

éter etílico (<10%). Este resultado é interessante, considerando-se que muitos substratos são pouco solúveis em solventes pouco polares, podendo assim a acetonitrila também ser utilizada em reações biocatalisadas.

Chua e Sarmidi (2006) estudaram o efeito do solvente na atividade e na enantioselectividade de duas lipases comerciais, ChiroCLEC-PC (lipase de *P. cepacia* imobilizada por ligação cruzada) e Chirazyme L-2 (liofilizada) ambas da Roche Molecular Biochemicals (Alemanha). Para tal, fez-se a resolução do *R,S*-1-feniletanol (50 mM) com ácido láurico (150 mM), a 35 °C, utilizando 25 mL dos seguintes solventes: éter terc-butil metílico (log P 1,4), tolueno (log P 2,5), ciclohexano (log P 3,2), hexano (log P 3,5), heptano (log P 4,0) e isoocatno (log P 4,5). Os resultados mostraram que a enantioselectividade ( $E > 200$ ) das lipases não foi afetada pelo tipo de solvente, mas a eficiência catalítica foi maior para o meio reacional com isoocatno (Figura 10).



**Figura 10.** Velocidades iniciais da reação de esterificação do *R,S* feniletanol com ácido láurico em diferentes solventes (expressos pelo log P) catalisadas pelas lipases Chirazyme L2,C3 e ChiroCLEC-PC (Roche Diagnostics). Fonte: Chua e Sarmidi (2006).

Destaca-se ainda a baixa eficiência catalítica para o tolueno pois, segundo Chua e Sarmidi (2006), solventes que contêm anéis aromáticos podem afetar a eficiência catalítica das enzimas. Além disso, os elétrons  $\pi$  do anel aromático do tolueno podem ter atraído o grupo fenil do álcool e esta interação também prejudicaria o acesso do substrato ao sítio catalítico.

Na síntese do caprilato de glicosila, Antczak et al. (2004) estudaram o efeito do solvente e também constataram que o rendimento da síntese foi maior no solvente mais apolar. Neste estudo, utilizaram a lipase de *Mucor circinelloides* imobilizada no seu próprio micélio e a síntese do caprilato de glicosila foi realizada por 2 h, com 2 mmol de glucose, 2 mml de ácido capróico (C 8), 0,2 g de enzima, a 50 °C e 120 rpm, em 10 mL dos seguintes solventes: éter pentílico (log P 3,90), éter de petróleo (log P 3,20), éter butílico (log P 3,08), éter isopropílico (log P 1,90), terc-pentanol (log P 1,30), éter etílico (log P 0,85) e terc-butanol (log P 0,80). O rendimento máximo (69,2%) foi obtido em éter pentílico. Não houve síntese (no intervalo de 2 h) para o meio reacional éter isopropílico e etílico, e para os demais solventes, os rendimentos foram inferiores a 7%. A diferença principal deste exemplo, com o anterior, diz respeito à natureza dos substratos empregados. No primeiro caso, os substratos são essencialmente apolares, e neste caso, a glucose é uma molécula essencialmente polar e mesmo assim, o rendimento da reação foi maior num meio reacional que continha um solvente apolar (log P 3,90).

Outro estudo relacionado à síntese de ésteres catalisada por lipases demonstrou que o tipo de imobilização (e de suporte) e o tipo de solvente podem influenciar no rendimento da reação (Adamczak et al. 2005). As lipases utilizadas foram as de *Candida antartica* imobilizadas (o suporte não é descrito): A (Chirazyme L-5, suporte 1) e B (Chirazyme L-2, suporte 1, 2 e 3) da Roche Diagnostics (Alemanha), e Novozym SP435 (Novozyme, Dinamarca). A síntese do oleato de ascorbila foi realizada por 24 h, com 0,15 mmol de ácido

L-ascórbico e 0,60 mmol de ácido oléico, a 45 °C, 50 mg de enzima, 500 rpm em 5 mL dos seguintes solventes: etanol (log P -0,24), hexano (log P 3,50), éter de petróleo (log P 3,20) e acetona (log P -0,23). Para todas as enzimas, os rendimentos foram maiores em acetona (máximo de 43% para Chirazyme L-2 com suporte 1). Este exemplo indica que não se pode generalizar que todas as lipases são mais eficientes em solventes apolares. Fatores como tipo de imobilização e suportes, além do tipo de reação, também devem ser considerados.

#### **2.4. Aplicações de Lipases em Síntese de Ésteres**

Os ésteres são considerados uma das classes mais importantes de compostos orgânicos e podem ser obtidos através de diferentes formas, como através de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados, catálise química e mais recentemente por biocatálise. No caso da obtenção por lipases, podem ser através da esterificação, interesterificação e transesterificação, como descrito no item 2.1 (Figura 1) (Adachi e Kobayashi, 2005; Güvença et al., 2002; Chowdary et al., 2001; Alvarez-Macarie e Baratti, 2000).

Inúmeras têm sido as aplicações de lipases em síntese de ésteres. Elas têm sido empregadas para a síntese de aromas e flavorizantes (ésteres com cadeia alquílica entre 2 a 8 carbonos), que apresentam maior aceitação na indústria de alimentos, pois são considerados naturais, por serem obtidos via biocatálise (Dandavate e Madamwar, 2007).

Os monoésteres de carboidratos, um outro exemplo de aplicação de lipases, são surfactantes biodegradáveis e de baixa toxicidade e têm, conseqüentemente, aplicações na indústria de detergentes, alimentos (como emulsificantes), entre outros. A monoacilação regioespecífica dos açúcares envolve diversas etapas de proteção e desproteção, quando executada por catálise química. Por outro lado, a esterificação catalisada por lipase

regioespecífica produz o monoéster em apenas uma etapa (Reyes-Duarte et al., 2005; Ghandi et al., 2000).

Ácidos graxos polinsaturados (*PUFA*), considerados essenciais ao organismo humano, do tipo ácido alfa-linolênico, ácido eicosapentanóico e o ácido docosahexanóico, são encontrados em alguns óleos como, por exemplo, óleo de borage, extraído da planta *Borago officinalis*, óleo de *Evening Primrose*, extraído da planta *Oenothera erythrosepala*, e óleo de peixe, entre outros. Os ácidos polinsaturados, presentes nestes óleos precisam ser extraídos seletivamente para serem empregados em aplicações médicas e aditivos em alimentos. Esta extração tem sido realizada utilizando lipases através de dois processos: (1) hidrólise seletiva do óleo ou (2) esterificação seletiva da mistura de ácidos graxos (Ghandi et al., 2000).

A estruturação de lipídeos ou modificação de óleos ou gorduras tem sido catalisada por lipases regioespecíficas pela possibilidade de prever a alteração e planejar que tipo de modificação é requerida no triacilglicerol, com a finalidade de melhorar as propriedades nutritivas ou reológicas do composto. Nos últimos quinze anos, têm surgido um crescente interesse neste tipo de tecnologia, principalmente pelo fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Desde então, existem alguns produtos comerciais que correspondem a triacilgliceróis modificados por processos enzimáticos utilizando lipases. Por exemplo, o Salatrim<sup>®</sup>, um substituto de ácidos graxos (de baixa caloria), que é comercializado pela empresa Nabisco nos Estados Unidos e obtido por interesterificação enzimática de óleo de colza ou de soja hidrogenado com triacilgliceróis de cadeias curtas como a triacetina ou a tributirina. Do mesmo modo, a empresa Loders-Croklaan, sucursal da Unilever nos Estados Unidos, comercializa o Betapol<sup>®</sup> (substituto de leite materno) e o Marinol<sup>®</sup>, um óleo enriquecido com ácidos graxos polinsaturados (Castro et al., 2004; Ghandi et al., 2000).

As lipases também podem ser usadas para modificação de antioxidantes, através da catálise seletiva destes compostos. Por exemplo, a vitamina C é um antioxidante, mas devido sua característica hidrofílica não pode ser usada para este fim em compostos hidrofóbicos como, por exemplo, as margarinas. Este inconveniente pode ser solucionado através da esterificação dos grupos hidroxilas da vitamina C. A modificação química requer condições drásticas de temperatura e pressão, o que acarreta em uma mistura de produtos. A esterificação catalisada por lipase com ácidos graxos produz ésteres de vitamina C com propriedades antioxidantes promissoras (Adamczak et al., 2005).

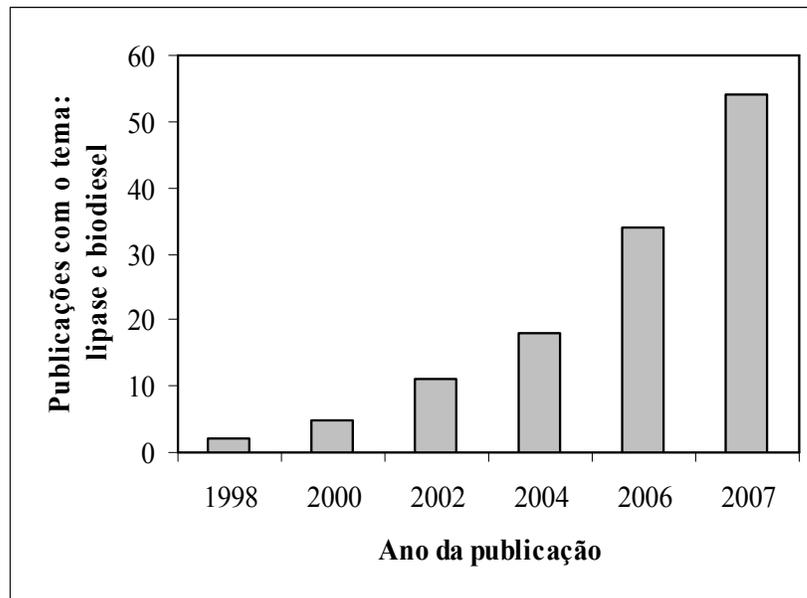
Os ésteres, principalmente os metílicos e etílicos, de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos, ricinoleatos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel. O oleato de etila, também estudado neste trabalho, encontra aplicações como aditivo biológico, plastificante PVC (cloreto de polivinila), agente resistente à água e como fluido hidráulico (Hazarika et al., 2002).

Ainda sobre os ésteres que compõem o biodiesel, algumas considerações serão feitas a seguir.

Uma das aplicações das reações de transesterificação catalisadas por lipases está relacionada com a síntese de ésteres etílicos ou metílicos que podem ser aplicados como biodiesel. Embora grande parte da literatura assuma que os produtos das reações de transesterificação (etanólise ou metanólise) de óleos vegetais ou gorduras de animal sejam o biodiesel (Vasudevan e Briggs, 2008; Chen et al., 2008; Hernández-Martín e Otero, 2008), neste trabalho, optou-se por utilizar os termos quimicamente corretos: transesterificação do óleo de mamona, metanólise ou etanólise do óleo de mamona, enfatizando que os ésteres metílicos ou etílicos podem ser empregados como biodiesel. A opção por não denominar a etanólise ou metanólise do óleo de mamona como “biodiesel de óleo de mamona” se deve ao fato de que este último termo deve ser empregado ao produto final purificado contendo

somente ésteres metílicos e etílicos, cuja qualidade como combustível esteja conforme a Lei brasileira nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 que descreve: o biodiesel pode ser classificado como qualquer combustível alternativo, de natureza renovável que possa oferecer vantagens sócio-ambientais ao ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo em motores de ignição por compressão interna (motores do ciclo diesel). No entanto, o único tipo de biodiesel já regulamentado no território brasileiro corresponde aos ésteres alquílicos derivados de óleos vegetais ou gordura animal. Como combustível, os ésteres alquílicos necessitam de algumas características técnicas que podem ser consideradas imprescindíveis: a reação de transesterificação deve ser completa, com ausência de ácidos graxos, sem traços de glicerina, compostos não-glicerídicos, catalisador residual ou álcool excedente da reação. Portanto, os ésteres alquílicos de óleos e gorduras não podem ser caracterizados como biodiesel se não forem capazes de atender integralmente aos parâmetros fixados pelas especificações como as normas ASTM D6751 (American Standard Testing Methods, 2003), DIN 14214 (Deutsches Institut für Normung, 2003) ou pela Portaria nº 42 da ANP (Agência Nacional do Petróleo, 2005) que, apesar de provisória, já estabelece as propriedades que serão exigidas para que este produto seja aceito no mercado brasileiro.

A síntese de ésteres etílicos ou metílicos pode ser classificada como química ou enzimática de acordo com o tipo de catalisador empregado. Atualmente, o processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, mas a etanólise ou metanólise de óleos e gorduras para a produção de biodiesel por via enzimática, ainda que recente, tem despertado grande interesse da comunidade científica (Lu et al., 2007). Para se ter uma idéia, o número de publicações com este tema (lipase e biodiesel, pesquisa realizada no Web of Science em 10/05/2008) aumentou consideravelmente nos últimos anos (Figura 11).



**Figura 11.** Número de publicações entre 1998 e 2007, usando como palavras-chave: lipase e biodiesel. Fonte: Web of Science em 10/05/2008.

**Tabela 4.** Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção do Biodiesel.

Processo	Vantagens	Desvantagens
Químico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simplicidade</li> <li>• Alto rendimento</li> <li>• Curto tempo de reação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificuldade de separação do catalisador</li> <li>• Impossibilidade de reutilização do catalisador</li> <li>• Dificuldade de utilização de etanol hidratado</li> <li>• Obtenção de produtos com menor grau de pureza</li> <li>• Condições reacionais drásticas</li> </ul>
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Condições reacionais brandas</li> <li>• Facilidade de separação do catalisador</li> <li>• Obtenção dos produtos mais puros</li> <li>• Permite o uso de etanol hidratado na reação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Longo tempo de reação</li> <li>• Custo das enzimas</li> <li>• Desnaturação pelo álcool</li> </ul>

Um aspecto comum a estes dois processos (químico e enzimático) consiste na otimização das condições de reação, de modo a lhes conferir características que os tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais. Entretanto, o processo enzimático, uma vez otimizado, pode-se tornar economicamente viável, além de possibilitar a obtenção de um biodiesel com alta pureza e sem prévia desidratação do álcool (Tabela 4) (Bouaid et al., 2007; Costa Neto, 2002).

Dos exemplos mais recentes encontrados na literatura (Tabela 5), para a obtenção de ésteres metílicos ou etílicos oriundos da transesterificação de óleos ou gorduras utilizando lipases, observa-se que a maioria dos estudos utiliza o metanol como receptor do grupo acila, isto porque, ele é mais reativo, produz ésteres mais voláteis e, no mercado internacional, é mais barato, quando se compara a outros álcoois de cadeia curta. Entretanto, devido a sua toxicidade e devido ao fato do metanol ser produzido a partir do petróleo, alguns autores estão estudando outros álcoois como o etanol, propanol, isopropanol e butanol para a produção de ésteres componentes do biodiesel. O etanol tem maior preferência, pois é considerado renovável (Akoh et al., 2007). Poucos artigos exploram receptores de grupos acila diferentes de álcoois para estas reações de transesterificação. Ainda assim, existem alguns trabalhos que utilizam ésteres de cadeia curta, como o acetato de etila (Modi et al., 2007).

Destaca-se ainda que os ésteres componentes do biodiesel são produzidos, em sua grande maioria e em se tratando de biocatálise, utilizando enzimas comerciais, quando são utilizados solventes, o mais comum é o *n*-hexano (Akoh et al., 2007). Os tempos de reação para estas reações, encontrados em literatura (Tabela 5), estão entre 8 a 24 h para conversões acima de 80%. Os principais fatores que afetam o rendimento destas reações são razão molar álcool:ácido, tipo do álcool, temperatura de reação, quantidade de água, pureza do óleo ou gordura e enzimas.

**Tabela 5.** Alguns exemplos de transesterificação (etanólise ou metanólise) de óleos e gorduras catalisada por lipases.

Tipo de óleo ou gordura	Catalisador	Receptor acila	Solvente	Rendimento (%)	Referência
Girassol	PPL e CRL* imobilizadas em celite	Metanol	<i>n</i> -hexano	25 (PPL), 40 (CRL) 3 h	Sagiroglu (2008).
Girassol	<i>Aspergillus oryzae</i>	Metanol	-	93,6 (8 h)	Chen et al. (2008)
Gordura animal	<i>Candida</i> sp. 99-125 imobilizada em PEG-6000	Metanol	<i>n</i> -hexano	87,4 (10 h)	Le et al. (2007)
Óleo da semente de pinheiro manso	<i>Pseudomonas cepacia</i> (Amano) imobilizada em celite	Etanol	-	98 (8 h)	Shah e Gupta (2007).
Óleo de semente de algodão	<i>Candida antarctica</i>	Metanol	<i>t</i> -butanol	97 (24 h)	Royon et al. (2007).
Óleo da semente de pinheiro manso	<i>Candida antarctica</i> B (Novozym-435) imobilizada	Acetato de Etila	-	91,3 (12 h)	Modi et al. (2007)
Óleo de soja	Lipase recombinante LipB68 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	Metanol	<i>n</i> -heptano	92 (12 h)	Luo et al. (2006).
Óleo de soja	<i>Pseudomonas cepacia</i> (Amano), imobilizada em sol-gel	Metanol, Etanol	-	67 65 (1 h)	Noureddini et al. (2005).
Óleo de mamona	<i>Candida antarctica</i> 435 imobilizada	Metanol	-	97 (24 h)	Yang et al. (2005).

\*PPL: lipase de pâncreas do porco, CRL: lipase de *Candida rugosa*.

Altas quantidades de álcool têm inibido ou desnaturado lipases nos processos de transesterificação para obtenção de ésteres etílicos ou metílicos. Para minimizar este inconveniente, adições do álcool em etapas tem sido uma forma de melhorar a produção dos

ésteres. Shimada et al. (2002), por exemplo, adicionou o metanol em três etapas na transesterificação do óleo de soja e a porcentagem de ésteres formados aumentou de 66% para 90%.

Os fatores quantidade de água e temperatura, nestas e em outras reações com transferência de grupos acila, é mais dependente do tipo de enzima. Valores em porcentagens de água (de 4 a 30%) e temperaturas entre 30 e 40°C são relatados para reações de transesterificação para produção de ésteres componentes do biodiesel (Akoh et al., 2007).

Com relação à pureza do óleo ou da gordura, a literatura relata que óleos de fritura, bruto e de refinarias contêm ácidos graxos livres, fosfolípidos e outras impurezas que podem inativar a lipase durante a transesterificação. Watanabe et al. (2002) compararam a transesterificação de um óleo de soja não degomado e degomado. A lipase de *C. antarctica* não catalisou a reação para o primeiro caso e para o óleo degomado, a conversão foi de 94% após 24 h.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Este projeto teve como objetivos utilizar suportes hidrofóbicos e hidrofílicos para imobilizar lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 e estudar os principais parâmetros que influenciam no processo de imobilização. Além disso, visou empregar as lipases em reações de síntese de ésteres através de reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios aquo-restritos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

##### 1ª Parte: Produção e Purificação da Enzima

- Produzir a enzima por fermentação submersa e purificar a enzima por métodos cromatográficos segundo protocolos já estabelecidos.

##### 2ª Parte: Estudos de Imobilização

- Selecionar suportes que possibilitassem retenção da atividade enzimática, reutilização e estabilidade frente ao solvente e à temperatura, através da:
  - Verificação da eficiência de imobilização e retenção de atividade;
  - Avaliação das mudanças morfológicas nos suportes por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
  - Comparação da atividade da enzima livre com a enzima imobilizada no suporte selecionado;
  - Avaliação de diferentes métodos de imobilização.

##### 3ª Parte: Estudos de Utilização da Enzima em Biocatálise em Solventes Orgânicos

- Avaliar a estabilidade da enzima imobilizada em solventes orgânicos;

- Comparar a produção do oleato de etila em *n*-heptano e etanol usando a enzima livre e imobilizada;
- Determinar a regioseletividade e tiposseletividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em reações de hidrólise e interesterificação respectivamente em *n*-heptano;
- Estudar a transesterificação do óleo de mamona (etanólise e metanólise) catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada;
- Estudar os principais parâmetros que influenciam no rendimento da reação de transesterificação do óleo de mamona catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada: controle de  $a_w$  (atividade termodinâmica de água) no biocatalisador, efeito da concentração enzimática no meio, razão molar dos reagentes, efeito da temperatura e adição do álcool em etapas.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Introdução**

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida nos Laboratórios: Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química, Multi-usuário do Departamento de Física, ambos na Universidade Federal do Paraná (UFPR) e no laboratório de *Lipotechnie* situado na *Maison de Technologie* do *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD) em Montpellier-França. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

### **4.2. Esterilização dos Meios e Equipamentos**

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min.

### **4.3. Microrganismo**

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa bacteriana isolada de uma contaminação de meio de cultura no LTEB (Lima, 2004), e caracterizada pelo Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, CESB/ESIL, Marseille, France como *Burkholderia cepacia* LTEB11.

### **4.4. Produção da Enzima por Fermentação Submersa**

A cepa foi inicialmente crescida em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio Luria Bertani (LB, cloreto de sódio, extrato de levedura e triptona bacteriológica), a 29 °C e

150 rpm. Após 8 h, 1 mL da cultura, correspondente a  $10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, foi inoculado em erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio composto de KNO<sub>3</sub> - 3,54 g.L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1,0 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O - 0,5 g.L<sup>-1</sup>, NaCl - 0,38 g.L<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O - 0,01 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup> e 1% (v/v) de óleo de oliva comercial (marca Gallo).

Para a manutenção, realizada mensalmente, a cepa de *B. cepacia* foi inoculada em 50 mL do meio líquido Luria-Bertani (LB) e cultivada a 29 °C, 200 rpm, durante 12 h ou tempo necessário para se atingir A<sub>600</sub> igual a 0,6, valor este equivalente a  $10^8$  células/mL. Deste meio foi retirado 1 mL e adicionado a 1 mL de glicerol 40% (v/v), previamente esterilizado em autoclave. A cepa foi adicionada de glicerol (40%, v/v) então armazenada sob refrigeração a -18°C.

#### **4.5. Produção do Extrato Lipolítico Bruto de *Burkholderia cepacia***

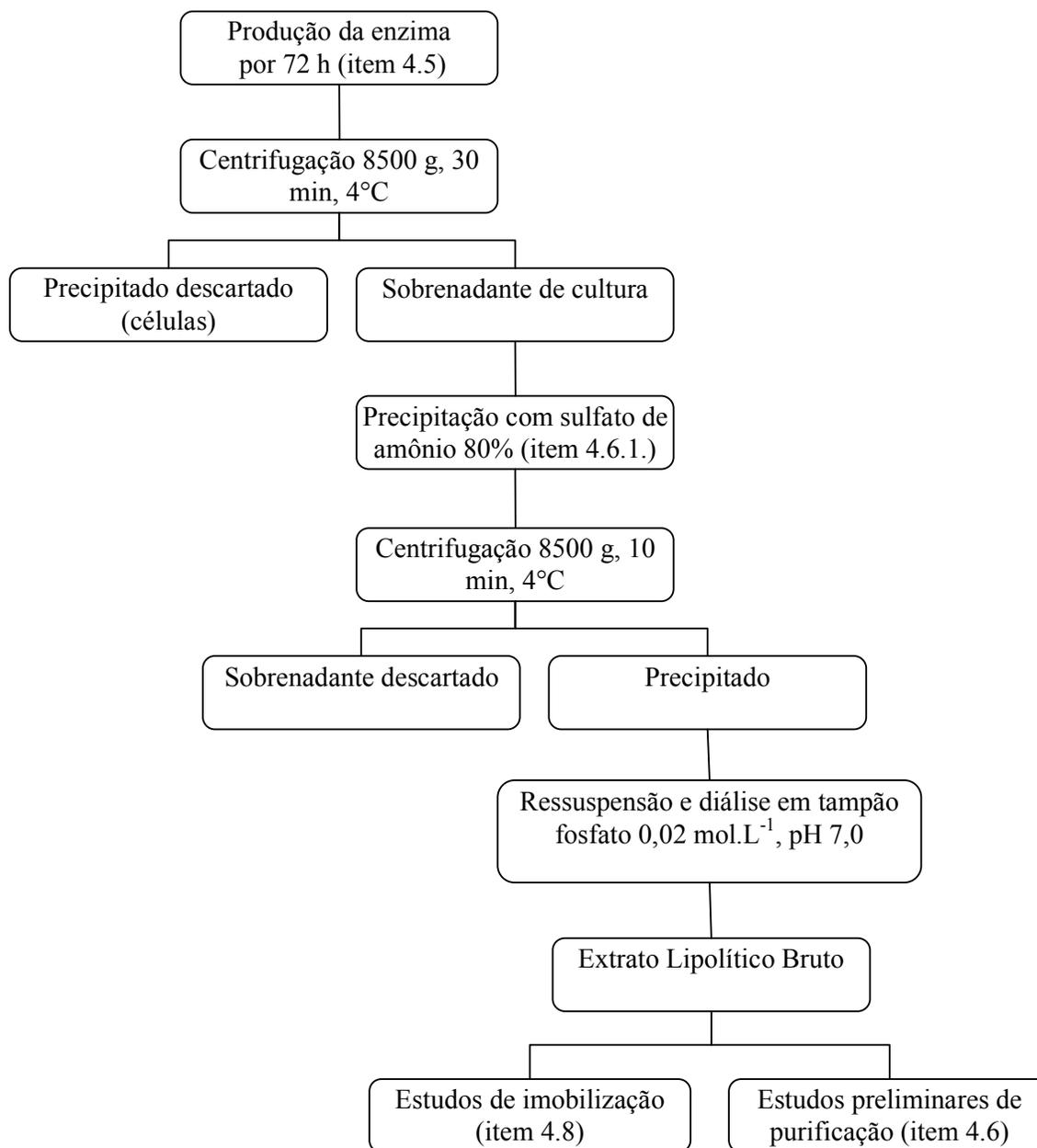
Em todo o trabalho adotou-se a denominação “extrato lipolítico bruto” ou “extrato bruto” para designar o produto contendo atividade lipolítica resultante da precipitação do sobrenadante de cultura com sulfato de amônio a 80% de saturação. Um esquema geral do procedimento para a produção do extrato bruto de *B. cepacia* está apresentado na Figura 12.

#### **4.6. Ensaio Preliminares de Purificação**

##### **4.6.1. Precipitação com Sulfato de Amônio**

Quando a atividade lipolítica era máxima (72 h), os cultivos foram interrompidos e as células, separadas. O conteúdo dos frascos foi centrifugado a 8500 g por 30 min. Sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante (em banho de gelo) até 80% de saturação, com agitação branda. O extrato foi mantido a 4 °C por 12 h, com agitação branda, sendo depois centrifugado a 8500 g por 10 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspenso em um volume mínimo de tampão fosfato 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Esta suspensão foi dialisada

contra este mesmo tampão a 4 °C, com 2 trocas. A fração dialisada foi liofilizada e delipidada (através da extração líquido-líquido e extração sólido-líquido) como descrito a seguir.



**Figura 12.** Representação esquemática para a produção do extrato lipolítico bruto de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

#### **4.6.2. Delipidação do Extrato Lipolítico Bruto**

##### **a) Extração Líquido-Líquido**

Esta etapa teve como finalidade garantir que compostos remanescentes da fermentação (óleos, ácidos graxos e lipídios) não interferissem na imobilização ou na purificação da enzima. Inicialmente, a delipidação foi realizada através da extração líquido-líquido em funil de decantação, utilizando 10 mL do extrato bruto e várias porções (normalmente 8) de 10 mL de uma mistura de solventes (clorofórmio - metanol 2:1).

##### **b) Extração Sólido-Líquido**

Aproximadamente 1 g do extrato bruto liofilizado foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL, sendo adicionados 15 mL de diferentes solventes e misturas (clorofórmio - metanol 2:1, clorofórmio - *n*-butanol 1:9, clorofórmio - *n*-butanol 9:1 e *n*-heptano). Em seguida, agitou-se em agitador orbital a 200 rpm por 15 min e filtrou-se. Para os dois tipos de extração analisou-se a fase orgânica por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas contendo fluoresceína (Sigma) (4.11.3.). Repetiu-se a extração até que nenhuma mancha fosse detectada na placa de CCD. Além disso, a atividade da enzima foi determinada antes e depois do processo de extração para avaliação das perdas durante o processo de delipidação. O método utilizado foi o da hidrólise do *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila, Sigma) em meio aquoso (4.11.1.1.).

#### **4.6.3. Liofilização do Extrato Lipolítico Bruto**

A secagem das amostras, sempre que especificada nos experimentos, foi realizada em liofilizador Jouan LP3<sup>®</sup> modelo 60, durante aproximadamente 24 h, a - 46 °C e sob vácuo de 0,1 mBar.

#### **4.6.4. Tratamento do Extrato Lipolítico Bruto com Isopropanol**

Uma das dificuldades na purificação das lipases é a possibilidade de formação de agregados de alta massa molar devido à presença de lipídeos ou à característica fortemente hidrofóbica que a estrutura protéica das lipases apresenta. Análises preliminares do extrato bruto por cromatografia de permeação em gel indicaram que a enzima estava presente na forma de um agregado de alta massa molar (Lima, 2004). A estratégia utilizada por este autor para a desagregação da enzima foi tratar o extrato bruto com isopropanol 30% (v/v).

No presente trabalho, a existência de agregados de proteínas no extrato lipolítico bruto poderia influenciar na etapa de imobilização da enzima; por isso foi importante continuar os estudos de desagregação da enzima iniciados por Lima (2004). Levando-se em conta a clarificação do extrato (que se apresentava turvo) e a manutenção da atividade enzimática, estudou-se diferentes proporções de isopropanol no extrato bruto (desde 10 a 80% v/v). Para tal, isopropanol foi adicionado ao extrato bruto em diferentes proporções e após meia hora a 30 °C, mediu-se a atividade frente ao *p*NPP (4.11.1.1.). Avaliou-se também a influência da adição do isopropanol ao extrato bruto após 16 h de contato (tempo requerido no procedimento de imobilização da enzima). Para tal, o extrato bruto (0,5 mL) foi adicionado a tubos Eppendorf contendo diferentes proporções de isopropanol (desde 10 a 80% v/v) e agitado em câmara incubadora com agitação orbital (shaker) (200 rpm) por 16 h à temperatura ambiente. Após este procedimento, mediu-se a atividade residual do extrato frente ao *p*NPP em meio aquoso (4.11.1.1.).

#### **4.7. Purificação do Extrato Bruto por Cromatografia de Interação Hidrofóbica**

A purificação do extrato bruto teve como finalidade verificar o efeito da delipidação na desagregação das enzimas e para a realização das análises em microscopia de força

atômica (item 4.11.4). Para tanto, realizou-se o procedimento conforme protocolo estabelecido por Lima (2004).

O extrato bruto foi aplicado em coluna (de 1 cm de diâmetro e 30 cm de altura) contendo 24 mL do gel Octyl Sepharose CL4B (Amersham Bioscience). Este gel é composto por matriz de agarose 4% com ligações inter cruzadas, contendo substituintes octila ligados covalentemente. O tamanho médio das partículas é de 90  $\mu\text{m}$  e o grau de substituição está em torno de 40  $\mu\text{mol}$  de grupos octila/mL de gel. O empacotamento foi realizado manualmente e a coluna foi pré-equilibrada com tampão Tris-HCl pH 7,0 0,02  $\text{mol.L}^{-1}$ . A amostra contendo 30% (v/v) de isopropanol (sem e com delipidação) foi centrifugada a 8500 g por 5 min, injetada na coluna e eluída num sistema de gradiente contendo tampão Tris-HCl (pH 7,0 0,02  $\text{mol.L}^{-1}$ ) e tampão Tris-HCl (pH 7,0 0,02  $\text{mol.L}^{-1}$ ) com isopropanol 60% (v/v), com vazão de 0,4  $\text{mL.min}^{-1}$  em um sistema de cromatografia líquida- FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*, Amersham Bioscience). Frações de 1 mL foram coletadas, num total de 55 alíquotas. As frações com atividade lipolítica foram reunidas, concentradas liofilizadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

#### **4.7.1. Eletroforese SDS-PAGE**

Para acompanhar as etapas de purificação das lipases, as amostras correspondentes aos diversos passos de purificação foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE (gel de eletroforese composto por poliacrilamida dodecil sulfato de sódio), utilizando o método descrito por Laemmli (1970). Os géis utilizados tinham uma concentração de 12% em poliacrilamida, e foram corados para proteínas pelo método do nitrato de prata, de acordo com Blum et al (1990).

A corrida foi realizada em um equipamento Amersham Pharmacia Biotech Power Supply-EP601, com 90 V, 25 mA e o tempo de corrida foi de aproximadamente 10 h.

Amostras de 1, 2 e 4 µg foram aplicadas. Os padrões (Amersham Pharmacia Bioscience) utilizados para a curva analítica foram: fosforilase b, 94 kDa; albumina, 67 kDa; ovalbumina, 43 kDa; amidrase, 30 kDa; inibidor de tripsina 20,1 kDa; α lactalbumina, 14,4 kDa.

#### 4.8. Estudos de Imobilização

##### 4.8.1. Seleção do Suporte para Imobilização

O objetivo desta etapa foi o de selecionar materiais que propiciassem facilidade de imobilização e manutenção da atividade enzimática, além da possibilidade de reutilização da enzima imobilizada.

Os suportes testados estão apresentados na Tabela 6. O processo de imobilização estudado foi a adsorção interfacial (através de interações hidrofóbicas, hidrofílicas ou ligações de hidrogênio) da proteína pelo suporte. As metodologias para imobilização serão descritas a seguir.

**Tabela 6.** Características principais dos suportes empregados para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Suporte	Composição	Procedência	Características
Accurel EP 100	Polipropileno em pó	Akzo Nobel Fase, Obernburg, Germany	Hidrofóbico 0,902 g.cm <sup>-3</sup> , 200 – 1000 µm
Accurel EG 100	Polipropileno em <i>pellets</i>	Akzo Nobel Fase, Obernburg, Germany	Hidrofóbico
Amberlite XAD16	Poliestireno-divinilbenzeno em esferas	Fluka	Hidrofóbico 20 a 60 mesh
PET	Politereftalato de etileno em <i>pellets</i>	Braskem São Paulo-SP	Hidrofóbico
PEBD	Polietileno de baixa densidade em pó	Braskem São Paulo-SP	Hidrofóbico 0,915-0,935 g.cm <sup>-3</sup>

**Tabela 6.** Características principais dos suportes empregados para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 (continuação).

Suporte	Composição	Procedência	Características
EVA	Polietileno vinil acetato em <i>pellets</i>	Braskem São Paulo-SP	Hidrofóbico
HDL-L	Hidroxiduplólamelar- laurato	Prof. Fernando Wypych/ Gregório Arizaga	Hidrofóbico
HOZ-L	Hidróxido de zinco- laurato	Prof. Fernando Wypych/ Gregório Arizaga DQ/UFPR	Hidrofóbico
AMP	Alumina meso-porosa	Prof. Fernando/ Gregório Arizaga Wypych DQ/UFPR	Hidrofilico*
DTA	Diatomácea (sílica)	Brasilminas São Paulo- SP	Hidrofilico

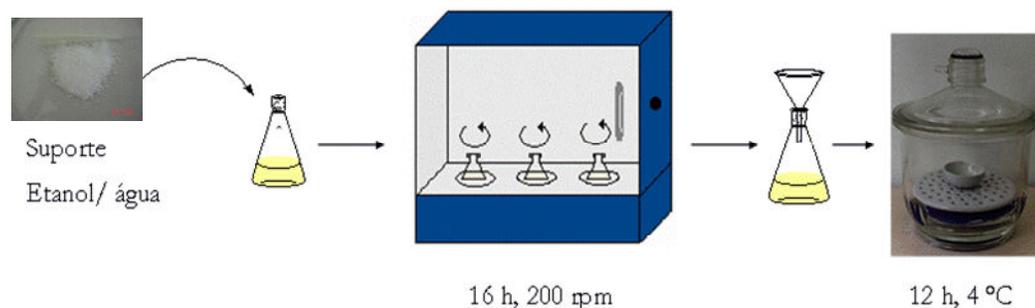
\* obtida pela transformação da caulinita em meta-caulinita e posterior lixiviação da alumina em meio alcalino.

#### 4.8.1.1. Procedimentos de Imobilização

Para os suportes Accurel EP 100 e EG 100, Amberlite, PET, PEBD e EVA, o material (0,1 g) foi umedecido com solução de etanol (com 50% em água, v/v) por 30 min a fim de excluir o ar contido dentro das partículas. Em seguida, lavou-se o suporte com água deionizada e filtrou-se. Para a imobilização, foi utilizado o método proposto por Al-Duri e Yong (1999). Foram colocados em um erlenmeyer 0,1 g do suporte e 4 mL de diferentes concentrações (de 1 a 3 mg de proteína/0,1 g de suporte) da solução lipolítica (delipidada, conforme descrito em 4.6.2/b), com a finalidade de verificar a máxima quantidade de proteína a ser imobilizada por grama de suporte. Esta mistura foi agitada a 200 rpm e temperatura ambiente por 16 h. A mistura foi então filtrada, secada em dessecador a vácuo por cerca de 12 h e armazenada a 4 °C (Figura 13).

Para a alumina meso-porosa (AMP), o material foi lavado com tampão fosfato pH 7,0, 20 mmol.L<sup>-1</sup> para correção do pH (inicial de 10,3) e posteriormente centrifugado.

Retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta. Antes de ser utilizada, a sílica foi ativada em estufa entre 120 e 150 °C durante 12 h. A secagem foi então realizada seguindo esses parâmetros, obtendo-se assim o suporte já ativado. O suporte não utilizado foi armazenado e ativado a cada novo experimento. Tendo-se preparado o suporte, a imobilização foi realizada colocando, em um erlenmeyer, 0,1 g do suporte e 4 mL de diferentes concentrações (de 1 a 3 mg de proteína/0,1 g de suporte) da solução lipolítica (delipidada como descrito em 4.6.2./b), com a finalidade de verificar a máxima quantidade de proteína a ser imobilizada por grama de suporte. Esta mistura foi agitada a 200 rpm e temperatura ambiente por 16 h. A mistura foi então filtrada, secada em dessecador a vácuo por cerca de 12 h e armazenada a 4° C.



**Figura 13.** Representação esquemática do processo de imobilização por adsorção física da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Para os suportes diatomácea (terra diatomácea), HDL-L e HOZ-L não houve preparação prévia dos suportes e o procedimento de imobilização foi o mesmo descrito para a AMP, descrito acima.

A partir dos resultados experimentais, considerando os suportes onde houve imobilização, foram calculados os parâmetros do processo de imobilização E (Eficiência da imobilização) e R (Retenção da atividade), a partir das Equações 1 e 2, respectivamente (Yadav e Jadhav, 2005; Bon et al., 1986):

$$E = \frac{(At_i - At_f).100}{At_i} \quad (1)$$

$$R = \frac{A_o.100}{A_T} \quad (2)$$

Sendo:  $At_i$  : atividade inicial total de hidrólise frente ao *p*NPP, antes da imobilização (U);

$At_f$ : atividade final total de hidrólise frente ao *p*NPP no sobrenadante após a imobilização (U);

$A_o$ : atividade observada do imobilizado ( $U.g^{-1}$  do suporte);

$A_T$  : atividade teórica do imobilizado ( $U.g^{-1}$  do suporte).

U: unidades totais de atividade ( $\mu$ mols do produto/min)

Para o cálculo da eficiência ( $E$ ), considerou-se atividade inicial e final do sobrenadante frente à reação de hidrólise do *p*NPP em meio aquoso (4.11.1.1). Para os cálculos de retenção da atividade ( $R$ ), considerou-se a atividade da enzima imobilizada tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico (4.11.1.2). Neste último, a medida da atividade teórica foi realizada com base na atividade da enzima liofilizada adicionada diretamente ao meio reacional.

#### **4.8.2. Cinética de Imobilização**

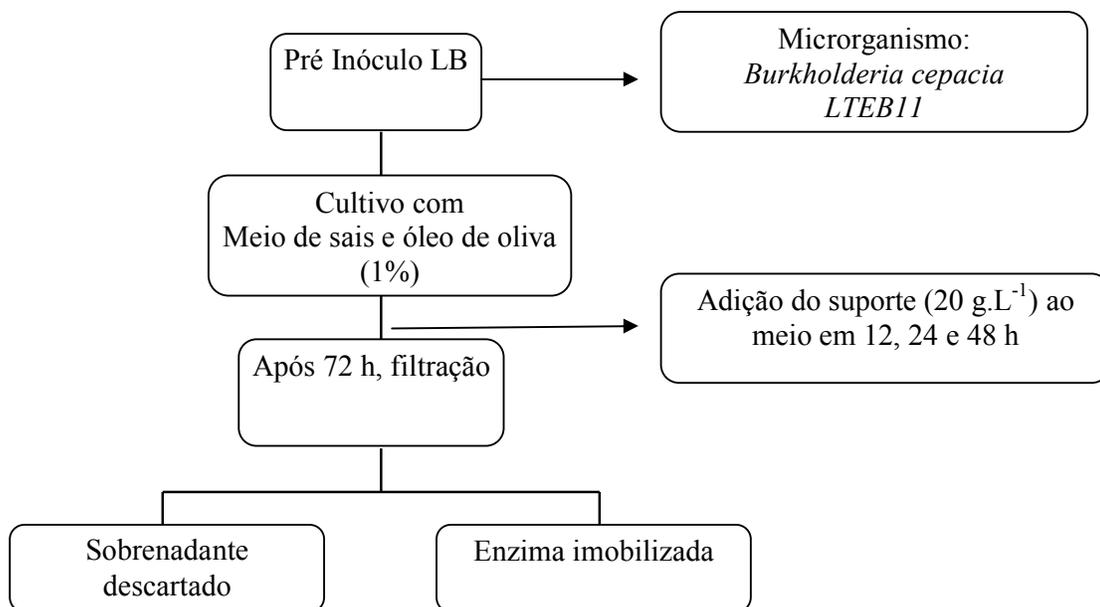
Esta etapa teve como objetivo determinar o tempo de contato entre o extrato lipolítico e o suporte para atingir-se uma quantidade de enzima imobilizada próxima a 100%, o que foi verificado pela ausência de atividade e de proteína no sobrenadante após a imobilização. A cinética foi realizada com o suporte selecionado no estudo de eficiência de imobilização e retenção da atividade. Utilizou-se uma relação de 25 mg de proteína por grama do suporte selecionado (Accurel EP 100). O extrato bruto (200 mL) preparado conforme 4.5. e 4.6.2./b (liofilizado, delipidado e ressuspenso em tampão fosfato de potássio

pH 7,0 50 mmol.L<sup>-1</sup>) foi colocado em contato com o suporte em erlenmeyers de 500 mL, sob agitação de 200 rpm, à temperatura ambiente. Aliquotas de 0,5 mL foram retiradas em 0, 6, 12, 24 e 48 h durante a imobilização. A atividade e a concentração residual de proteína do sobrenadante, medida pelo método do *p*NPP e Bradford (1976), foram expressas em porcentagem de atividade e proteína inicial, respectivamente.

#### **4.9. Simultânea Produção e Imobilização de Lipases (SPIL)**

Como já comentado anteriormente, a imobilização por adsorção é uma metodologia simples e bastante usada para imobilização de lipases. Apesar da simplicidade do processo de imobilização, as etapas anteriores de preparação (purificação parcial) do extrato bruto são trabalhosas, pois envolvem centrifugação do meio de cultura para separação das células, concentração do extrato por precipitação, diálise, liofilização, delipidação e, finalmente, a imobilização. No presente trabalho, este processo foi denominado de “imobilização ou processo convencional”. Com o objetivo de reduzir este número de etapas, foram realizados estudos de produção e imobilização simultâneos (SPIL) da lipase de *B. cepacia* LTEB11 em Accurel EP 100. O suporte foi pré-selecionado nos estudos de imobilização.

O processo SPIL iniciou-se com a inoculação de 1 mL do microrganismo em 150 mL do meio de cultivo contidos em erlenmeyers de 500 mL (conforme 4.5). Após tempos determinados de cultivo (12, 24 e 48 h), transferiu-se o meio de cultura para erlenmeyers de 500 mL contendo 3 g de Accurel EP 100 (lavados previamente com álcool etílico e água destilada e esterilizados) (Figura 14). Esta quantidade de suporte foi escolhida com base na saturação do suporte, calculada em experimentos prévios (4.8.1). A fermentação foi acompanhada durante 72 h (ponto máximo de produção da enzima). A atividade da lipase de *B. cepacia* imobilizada por SPIL foi comparada com a atividade da enzima imobilizada de forma convencional (conforme 4.8).



**Figura 14.** Representação esquemática para a simultânea produção e imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

#### 4.9.1. Planejamento Fatorial

Visando a otimização do processo de imobilização por SPIL, utilizou-se um delineamento fatorial  $3^3$  fracionário com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios (Box e Behnken, 1960). As variáveis independentes estudadas foram: tempo (h) de adição do suporte ( $x_1$ ), concentração de suporte ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ( $x_2$ ) e concentração (% v/v) de óleo de oliva ( $x_3$ ) no meio de cultura. As variáveis, seus níveis e valores reais estão apresentados na Tabela 7. A variável resposta (ou dependente) investigada neste estudo foi a atividade da enzima imobilizada ( $\text{U.mg}^{-1}$  de suporte), dosada através da hidrólise do *p*NPP em meio aquoso (4.11.1.1).

Os dados experimentais foram analisados através da regressão polinomial de segunda ordem representada pela Equação 3 (Shih et al., 2007):

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^3 \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{kij} x_i x_j \quad (3)$$

Sendo: Y a variável resposta (atividade da lipase imobilizada U.mg<sup>-1</sup> de suporte)

$\beta_{k0}$ ,  $\beta_{ki}$ , e  $\beta_{kij}$  os coeficientes constantes e  $x_i$  e  $x_j$  as variáveis independentes não codificadas.

O modelo matemático foi testado para a falta de ajuste pelo teste F através da análise de variância (ANOVA) usando o programa STATISTICA<sup>®</sup> (Data Analysis Software System), versão 5.0.

**Tabela 7.** Variáveis e níveis para o delineamento fatorial fracionário com 3 níveis e 3 variáveis para otimização do processo de produção e imobilização simultâneas (SPIL) da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Variáveis	Símbolo	Níveis		
		-1	0	+1
Tempo de adição do suporte à fermentação (h)	TA	0	12	24
Concentração de suporte no meio de cultura (g.L <sup>-1</sup> )	[S]	10	20	30
Concentração do óleo de oliva (% v/v) no meio de cultura	[O]	0,25	0,625	1,0

#### 4.10. Estudos de Utilização da Lipase em Biocatálise em Solventes Orgânicos

##### 4.10.1. Estabilidade da Lipase Livre e Imobilizada à Temperatura

A estabilidade à temperatura da enzima livre liofilizada (na forma de pó) e imobilizada (processo SPIL com adição do Accurel EP 100 após 12 h de cultivo, 20 g.L<sup>-1</sup> de suporte e meio de cultivo contendo 1% de óleo de oliva), foi estudada em solventes orgânicos. A finalidade destes experimentos foi testar a estabilidade térmica da enzima em solventes hidrofóbicos e hidrofílicos. Três solventes foram testados: etanol (log P -0,24), pela possibilidade de se realizar a síntese do oleato de etila utilizando o etanol como solvente (reação modelo), *n*-heptano (log P 4,0), no qual já se sabia que a enzima era estável (120 ± 6%) (Lima, 2004) e acetonitrila (log P -0,33), pela possibilidade de futuramente a enzima ser

empregada em reações onde se faz necessária a utilização de solventes hidrofílicos, como por exemplo na síntese de ésteres de açúcar (Afach et al., 2005; Kim et al., 2004; Zhang et al., 2002).

Nestes ensaios, utilizou-se 50 mg da enzima imobilizada por SPIL ou de extrato lipolítico liofilizado (delipidado e seco em dessecador à temperatura ambiente, 12 h). Adicionou-se 2 mL do solvente à enzima e incubou-se a 37 °C e 50 °C por 3 h. Após a incubação no respectivo solvente, o material foi filtrado e seco em dessecador (12 h). Utilizou-se 1 mg da enzima imobilizada ou 1 mg do pó para determinar a atividade residual da enzima pelo método do *p*NPP aquoso (4.11.1.1).

#### **4.10.2. Reações de Esterificação do Oleato de Etila**

Reações de síntese do oleato de etila foram realizadas com três diferentes preparações enzimáticas: enzima livre (liofilizada), imobilizada na forma convencional, e imobilizada pelo processo SPIL, utilizando *n*-heptano ou etanol como solvente.

Quando se utilizou o *n*-heptano como solvente, a síntese foi realizada em erlenmeyers de 25 mL, com 5 mL de solvente, 116 µL de ácido oléico (70 mmol.L<sup>-1</sup>) (Carlo Erba, grau de pureza para HPLC), 62 µL de etanol (210 mmol.L<sup>-1</sup>) (Carlo Erba, PA) a 37 °C e com agitação orbital de 200 rpm. No caso da síntese utilizando o etanol como solvente, o volume de etanol foi de 5 mL e a reação foi realizada nas mesmas condições citadas acima. Para comparar a reação onde se empregou a enzima livre e imobilizada de forma convencional, foi adicionada certa quantidade da enzima, de forma que a atividade enzimática adicionada para dois tipos de amostras fossem equivalentes (90 U.mL<sup>-1</sup> do meio reacional). Para a comparação das enzimas imobilizadas de forma convencional e por SPIL, utilizou-se a mesma quantidade de suporte (450 mg). Três controles foram realizados: adicionou-se ao meio reacional (1) enzima livre desnaturada; (2) suporte sem a enzima e (3) enzima

imobilizada e desnaturada. Para a desnaturação, utilizou-se a autoclave a 121 °C, 15 min. A verificação da total desnaturação foi realizada através da dosagem da atividade da enzima (livre e imobilizada) utilizando o método da hidrólise do *p*NPP (4.11.1.1). O curso das reações foi seguido retirando-se alíquotas de 100 µL em diferentes intervalos de tempo. A determinação da atividade enzimática de esterificação foi feita pelo método de Lowry-Tinsley (4.11.1.4.).

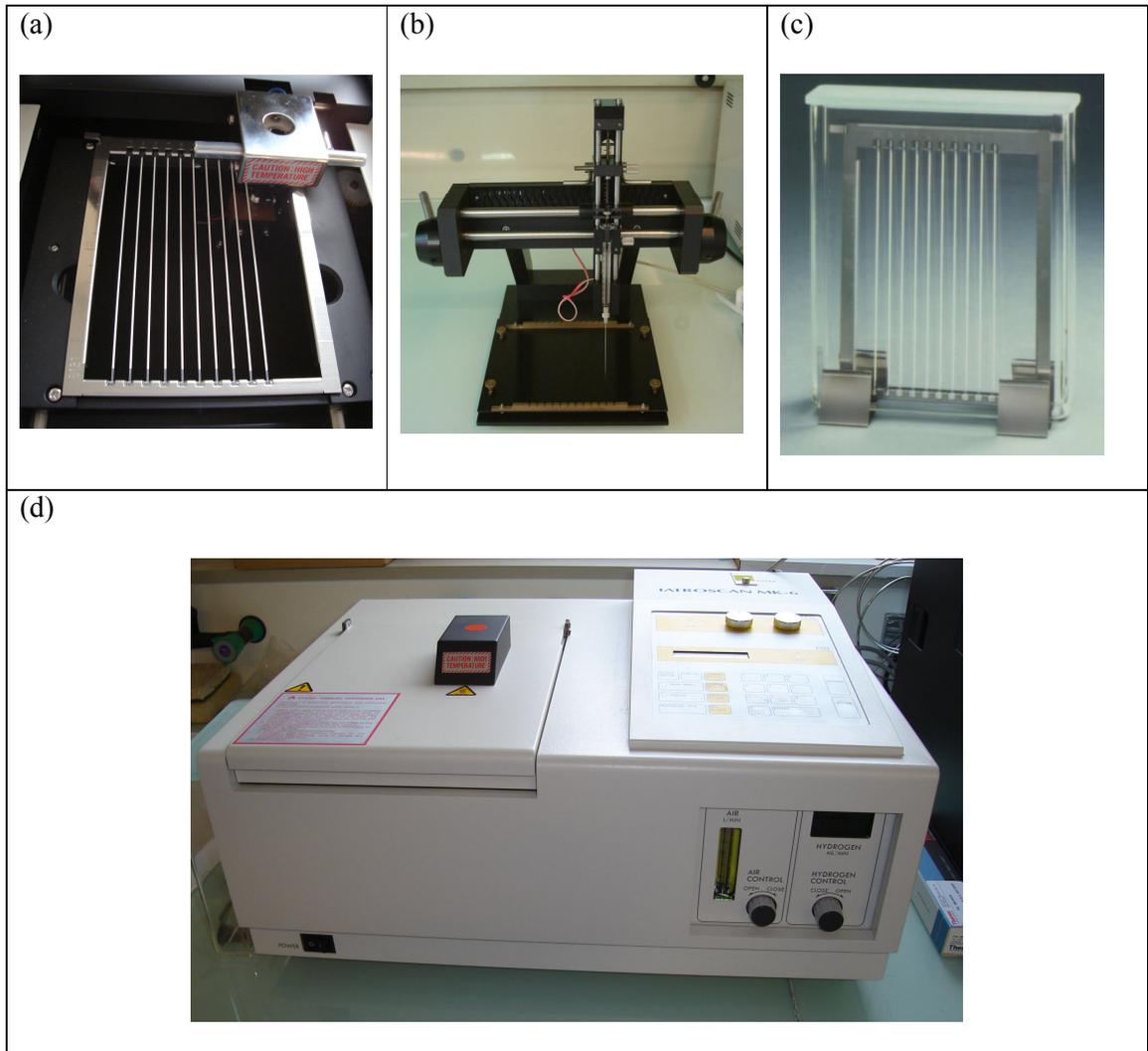
#### **4.10.3. Determinação da Regiosseletividade e Tiposseletividade da enzima**

##### a) Determinação da Regiosseletividade

As lipases produzidas por cepas de *B. cepacia* são não-específicas na forma livre (Kaieda et al., 2001). No presente trabalho investigou-se a possibilidade de alteração desta regiespecificidade após a imobilização em Accurel EP100 por SPIL. A regiosseletividade da lipase foi analisada através da quantificação dos produtos da hidrólise da trioleína por cromatografia em camada delgada com detector de ionização de chama (TLC-FID) (Iatroscan MK-6, Mitsubishi Kagaku Iatron, Tokyo, Japan). A reação foi realizada em fracos de 25 mL com 100 U de enzima (dosadas pelo método do *p*NPP aquoso, item 4.11.1.1), 10 mL de *n*-heptano, 547 µL (500 mg) de trioleína (0,56 mmol), 50 µL de água, a 37 °C e com agitação orbital de 300 rpm. O curso da reação foi seguido retirando-se alíquotas de 200 µL (contendo 20 mg de lipídeos) em diferentes intervalos de tempo.

Após a evaporação do solvente do meio reacional, adicionou-se 1 mL de *n*-hexano às amostras. Alíquotas de 1 µL (contendo 20 µg de lipídeos foram aplicadas sobre hastes de sílica (denominada S-III *Chromarods*, Figura 15). Após a aplicação, fez-se a eluição com uma fase móvel contendo tolueno:clorofórmio:ácido acético (70:28:1) durante 30 min. Em seguida, as hastes foram secadas por 10 min a 150 °C e analisadas em Iatroscan, que analisa o conteúdo lipídico presente no *Chromarods* por FID. A porcentagem de hidrólise representa o

conteúdo relativo de ácidos graxos livres em relação ao conteúdo total dos resíduos acílicos (Equação 4).



**Figura 15.** Sistema TLC-FID composto, por exemplo, por 10 hastes de sílica denominadas S-III *Chromarods* (a). Em cada haste é possível depositar (por meio de aplicação automática) uma amostra contendo lípidos (b). Após a eluição e secagem em forno (c), as hastes são analisadas no Iatroscan (d).

$$\%hidrólise = \frac{[AGL]}{[TAG] + [DAG] + [MAG]} \quad (4)$$

Sendo:

AGL: ácidos graxos livres;

TAG: triacilgliceróis;

DAG: diacilgliceróis;

MAG: monoacilgliceróis.

#### b) Determinação da Tiposseletividade

A tiposseletividade da lipase de *B. cepacia* imobilizadas em Accurel EP 100 por SPIL foi investigada através de reações de interesterificação, utilizando-se como substrato fixo a tricaprilina (C8:0, 0,2 mmol) e variando-se o outro éster, desde C4:0 até C18 (0,1 mmol), saturados ou insaturados: tributirina (C4:0), tricaprina (C10:0), trilaurina (C12:0), trimiristina (C14:0), tripalmitina (C16:0), triestearina (C18:0), trioleína (C18:1  $\Delta^9$ ), triricinoleína [C18:1  $\Delta^9$  (OH)], trilinoleína (C18:2  $\Delta^{9,12}$ ) e trilinolenina (C18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) (todos da FLUKA, grau de pureza 99%).

Para cada reação utilizou-se frascos de 25 mL com aproximadamente 30 mg (100 U, dosadas pelo método do *p*NPP aquoso, item 4.11.1.1.) da enzima imobilizada, 5 mL de *n*-heptano, a 45 °C, agitação orbital de 300 rpm. O curso da reação foi seguido por cromatografia gasosa (CG) retirando-se alíquotas de 10  $\mu$ L em diferentes intervalos de tempo, com uma diluição de 1:10 com clorofórmio para a reação entre a tricaprilina e a triricinoleína e uma diluição 1:20 com *n*-hexano para as demais reações.

A cromatografia gasosa foi realizada em equipamento Fisons (Manchester, Inglaterra), contendo uma coluna (HP1-SIM DIST, 100% dimetilsiloxano) de 15 metros, 0,53 mm de diâmetro interno e 0,5  $\mu$ m de diâmetro de partícula. As condições cromatográficas foram: injeção (1  $\mu$ L) modo split (razão 1:10), detector por ionização em chama a 340 °C, gás de arraste (He) a 5,5 mL.min<sup>-1</sup>. A programação de temperatura foi de 120 a 300 °C, a 20 °C.min<sup>-1</sup>, para as reações de interesterificação contendo tributirina e tricaprilina, e para as reações entre tricaprilina e os demais triacilgliceróis, de 150 a 330 °C a 10 °C.min<sup>-1</sup>, 10 min a

330 °C. A identificação e a quantificação dos ésteres foram feitas pela injeção de cada éster em concentrações conhecidas, injetados antes da adição da enzima. Após obtenção dos cromatogramas, as áreas dos picos de todos os ésteres (reagentes e produtos), analisados em diferentes tempos de reação, foram integradas. O tempo de retenção de cada componente pode ser visualizado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Tempo de retenção dos triacilgliceróis utilizados nas reações de interesterificação analisados por cromatografia gasosa (coluna HP1-SIM DIST, 100% dimetilsiloxano).

Tempo de retenção (min)				
	reagentes		produtos	
	TC 1	TC 2		
TC1 + TC2				
TC8:0+TC4:0	4,8	0,95	2,2	3,5
TC8:0+TC10:0	5,3	8,5	6,4	7,5
TC8:0+TC12:0		11,3	7,5	9,5
TC8:0+TC14:0		14	8,6	11,4
TC8:0+TC16:0		16	9,6	13
TC8:0+TC18:0		18	10,5	14,6
TC8:0+TC18:1		17,8	10,4	14,4
TC8:0+TC18:1(OH)		20,4	11,2	15,8
TC8:0+TC18:2		17,8	10,3	14,4
TC8:0+TC18:3		17,9	10,4	14,5

Sendo: TC-triacilglicerol

#### **4.10.4. Aplicação das Lipases em Reações de Transesterificação**

##### **4.10.4.1. Ensaios preliminares**

Nas reações de síntese de ésteres etílicos por transesterificação foram utilizados como substratos o óleo de mamona e etanol (etanólise) ou metanol (metanólise), sem a utilização do co-solvente *n*-heptano. Foram comparados os desempenhos das lipases imobilizadas pela forma convencional e por SPIL.

As reações foram realizadas em frascos de 25 mL contendo 3 g (contendo 3 mmol, com aproximadamente 90% em triricinoleína) de óleo de mamona (Sigma), 365  $\mu\text{L}$  de metanol (Carlo Erba, PA) ou 525  $\mu\text{L}$  de etanol (Carlo Erba, PA) (razão molar 1:3 óleo:álcool), 30 mg de enzima imobilizada (100 U dosadas pelo método do *p*NPP aquoso, item 4.11.1.1.), 45°C e 300 rpm. O curso da reação foi seguido retirando-se alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do meio reacional em diferentes intervalos de tempo. Em seguida, fez-se uma diluição da amostra de 1:10 ou 1:30 com clorofórmio. A separação dos triacilgliceróis e do produto da transesterificação (ricinoleato de metila ou etila) foi realizada utilizando cromatografia gasosa (CG) como descrito em 4.10.3.b. A programação de temperatura foi de 150 a 330 °C a 10 °C.min<sup>-1</sup>, 10 min a 330 °C. A quantificação dos novos ésteres formados foi realizada através da integração das áreas em comparação com o ricinoleato de metila. Este padrão foi sintetizado a partir da hidrólise química da triricinoleína, que foi metanolizada em uma solução de 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em MeOH (v/v) por 12 h à temperatura de 80 °C, sob refluxo. A mistura foi neutralizada com uma solução de NH<sub>4</sub>OH (25%, v/v) e os ésteres metílicos de ácidos graxos hidroxilados resultantes da esterificação foram extraídos através de uma partição entre CHCl<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O (Monteiro et al., 2007).

#### **4.10.4.2. Otimização da Produção de Ésteres Etilícos do Óleo de Mamona**

A otimização para a produção de ésteres etílicos do óleo de mamona foi realizada através da etanólise do óleo vegetal, estudando-se e os principais parâmetros que podem interferir nas reações catalisadas por lipases, a saber: atividade de água do biocatalisador ( $a_w$ : 0,19; 0,22; 0,29; 0,44; 0,68), concentração de enzima (100, 200, 300 e 400 U), razão molar (óleo:álcool 1:3; 1:6; 1:9; 1:12), temperatura (30, 45 °C) e adição do etanol em duas etapas.

As reações foram realizadas com 3 g de óleo de mamona, 525  $\mu\text{L}$  de etanol (razão molar 1:3 óleo:álcool), 30 mg de enzima imobilizada (100 U dosadas pelo método do *p*NPP aquoso, item 4.11.1.1.), 45°C e 300 rpm. O curso da reação foi seguido por CG como descrito no item (4.10.3.b).

#### a) Atividade de Água do Biocatalisador

Para obtenção das atividades de água requeridas nos experimentos, os preparados enzimáticos foram incubados a 25 °C, durante 5 semanas, em recipientes hermeticamente fechados contendo diferentes soluções salinas saturadas para as atividades de água ( $a_w$ ) requeridos, a saber LiCl ( $a_w= 0,12$ ),  $\text{CH}_3\text{COOK}$  ( $a_w= 0,22$ ),  $\text{MgCl}_2$  ( $a_w= 0,33$ ),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ( $a_w= 0,44$ ),  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  ( $a_w= 0,53$ ) e NaCl ( $a_w= 0,75$ ). Após 2, 4 e 5 semanas de incubação, a  $a_w$  das amostras foi determinada através de um sistema Aqualab (FA-st/I, GBX, Romans, França). O equipamento trata-se de um higrômetro que é calibrado antes da dosagem da  $a_w$  da amostra com solução salina saturada de  $\text{KNO}_3$ . A amostra é adicionada em placas, próprias do equipamento (Figura 16), e analisadas quanto à atividade de água.



**Figura 16.** Equipamento AquaLab, utilizado para dosar a atividade de água ( $a_w$ ) da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. (a) Região onde a amostra foi depositada antes da medida da  $a_w$ .

Verificou-se que, a partir da segunda semana de incubação, não houve mudanças significativas na  $a_w$  das amostras. Para os valores teóricos de  $a_w$  de 0,12; 0,22; 0,33; 0,44; 0,53 e 0,75, o equilíbrio foi atingido quando os valores de  $a_w$  atingiram 0,19; 0,22; 0,29; 0,44 e 0,68, respectivamente.

#### b) Efeito da Concentração da Enzima

Neste estudo, variou-se a quantidade de enzima no meio reacional, mantendo as outras condições descritas no item 4.10.4.2 (a) (razão molar óleo:álcool 1:3, 45 °C,  $a_w$  da enzima de 0,4 e 300 rpm), com a finalidade de diminuir o tempo e aumentar o rendimento da reação. Para tanto utilizou-se 30, 60, 90, 120 mg de enzima imobilizada com unidades totais em atividade no meio reacional de 100, 200, 300 e 400 U (dosadas em pNPP aquoso, item 4.11.1.1.), respectivamente.

#### c) Efeito da Razão Molar (óleo:álcool) e da Temperatura

Foram estudadas as razões molares (óleo:álcool) de 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12 e as temperaturas de 30 e 45°C. As outras condições foram mantidas constantes (120 mg de enzima- 400 U totais, 45 °C,  $a_w$  da enzima de 0,4 e 300 rpm).

#### e) Adição do Etanol em Duas Etapas

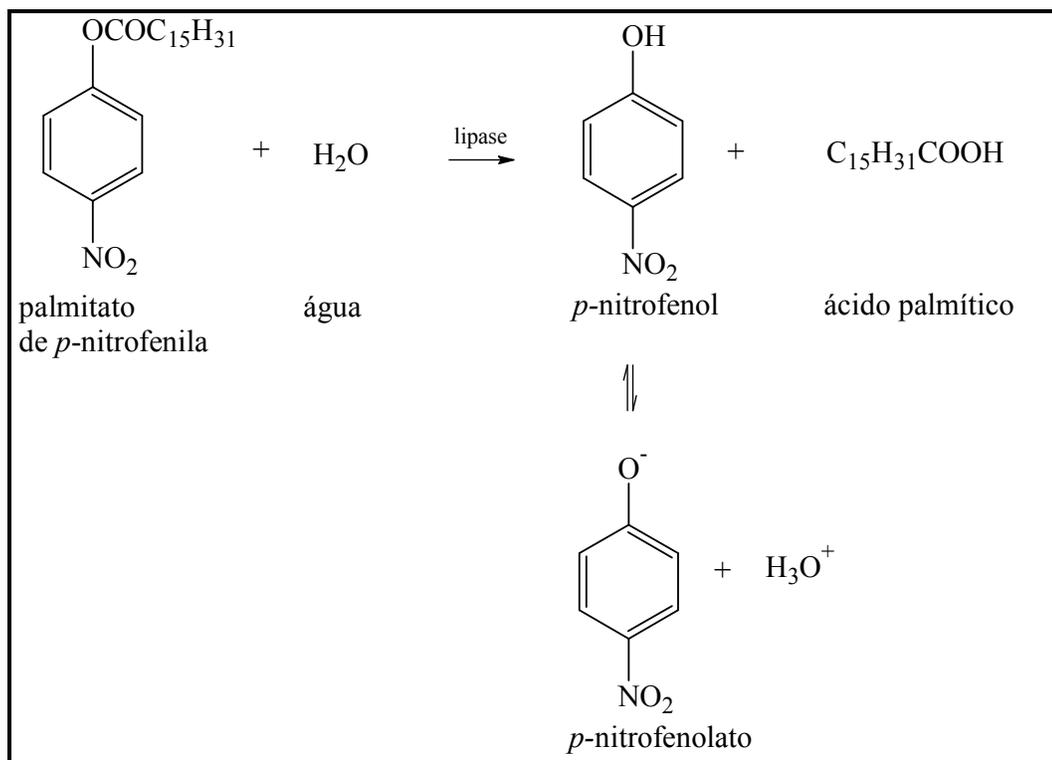
Comparou-se a adição do etanol em uma e em duas etapas, com o objetivo de diminuir o impacto do solvente na atividade da enzima. No primeiro caso, toda a quantidade de etanol requerida no experimento foi adicionada no início da reação; no segundo caso, adicionou-se metade da quantidade (1,5 mmol ou 262,5  $\mu$ L) no início da reação e a outra metade após 4 h de reação. As outras condições foram mantidas constantes, conforme citado acima.

## 4.11. Métodos Analíticos

### 4.11.1. Determinação de Atividade Lipolítica

#### 4.11.1.1. Método da Hidrólise do *p*NPP em Meio Aquoso

Este método espectrofotométrico foi utilizado ao longo de todo o trabalho para determinar a atividade lipolítica durante a fermentação, para estudar a cinética da lipase imobilizada e para a etapa de seleção de suportes. Foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica (Sigma) e o Triton X-100 (Sigma). A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é seguida a 410 nm (Figura 17).



**Figura 17.** Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada por lipases.

### Soluções Utilizadas:

- Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila (Sigma) em isopropanol, em uma concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup>.
- Solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,0.

### Procedimento:

A 1 mL da solução A foram misturados 9 mL da solução B, lentamente e sob contínua agitação. A mistura foi feita imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é instável quando em meio aquoso. Desta solução foram colocados 0,9 mL em cubeta. Estabilizada a temperatura a 37 °C, foi adicionada a solução de enzima (0,1 mL) ou de tampão, quando se preparou o branco. A reação foi feita em cubeta de 1,0 mL e a leitura foi feita sempre contra um branco contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a 37 °C e pH 7,0. A cinética da reação foi acompanhada pela leitura das absorvâncias a cada 20 s durante 1 min.

Para o cálculo da atividade foi utilizado a Equação 4, sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a liberação de 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de extinção molar do *p*NPP, em pH 7,0, ( $9,78 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura.

Na etapa de seleção de suportes, para dosagem da atividade enzimática do material imobilizado, a reação foi realizada com controle de temperatura (banho termostatizado a 37 °C), sob agitação manual em erlenmeyers de 25 mL contendo 10 mL de meio reacional (descrito acima) e iniciada com a adição de 1 mg de enzima imobilizada. A cinética das reações foi seguida em diferentes intervalos de tempo (1 a 5 min) transferindo-se alíquotas de 1 mL para uma cubeta e simultânea leitura das absorvâncias (410 nm).

$$A = \frac{C_{ang} \cdot 60 \cdot ND}{\epsilon \cdot X_{enz}} \quad (4)$$

Sendo:  $C_{ang}$ : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em segundos);

60: transformação de segundos para minuto;

ND: número de diluições;

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar do *p*NPP a pH 7,0;

$X_{enz}$ : volume (em mL) ou massa da enzima imobilizada (em mg).

#### 4.11.1.2. Método da Hidrólise do *p*NPP em Solventes Orgânicos

Para os ensaios de hidrólise de *p*NPP em meio não-aquoso foi utilizada a metodologia descrita por Pencreac'h e Baratti (1996) e otimizada por Lima et al. (2004). A reação foi realizada em *n*-heptano contendo 10 mmol.L<sup>-1</sup> de *p*NPP. A reação é iniciada pela adição da enzima, e em intervalos de tempo de 3 min, amostras são retiradas e o *p*-nitrofenol liberado pela hidrólise enzimática é extraído por uma solução de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (o rendimento de extração é de 75%). A absorbância da fase aquosa é determinada a 410 nm. Para cada tempo de reação é realizado um controle, seguindo-se o mesmo procedimento, mas sem a adição da enzima. O coeficiente de extinção molar (1,82.10<sup>4</sup> L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) é calculado para o *p*-nitrofenol a partir de uma curva de *p*NP em NaOH, nas mesmas condições do ensaio. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto a 37 °C, nas condições de ensaio.

Na etapa de seleção de suportes, para dosagem da atividade enzimática do material imobilizado, a reação foi iniciada com a adição de 10 mg de enzima imobilizada ao meio reacional (5 mL) descrito acima. Para todas as reações de hidrólise (tanto meio aquoso como orgânico) fizeram-se controles para verificar a possibilidade da hidrólise espontânea (reação

sem enzima e sem suporte), assim como para verificar se algum suporte (sem enzima) teria potencial catalítico.

Os cálculos para a atividade da enzima tiveram como base a Equação 5.

$$A = \frac{C_{ang}}{\varepsilon \cdot m_{enz} \cdot 0,75} \quad (5)$$

Sendo:  $C_{ang}$ : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em minutos);

$\varepsilon$ : coeficiente de extinção molar do *p*NPP a pH 13 (NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>);

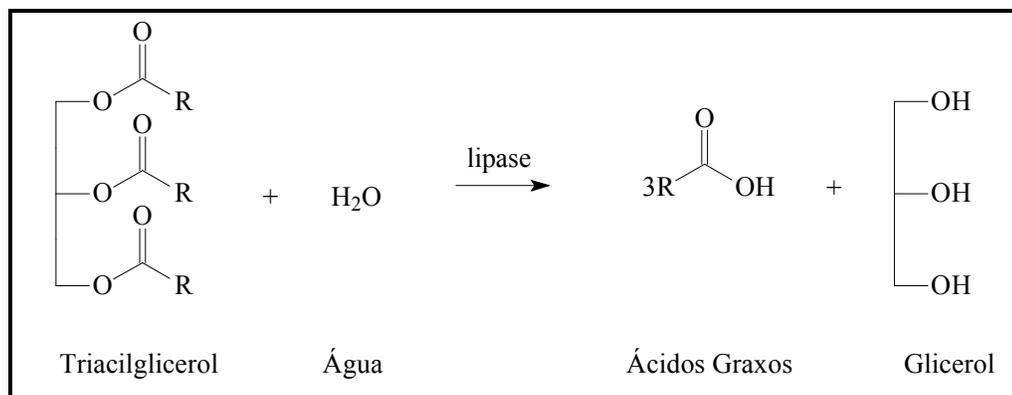
$m_{enz}$ : massa da enzima imobilizada ou liofilizada (em mg).

0,75: correção com relação ao rendimento de extração (75%).

#### 4.11.1.3. Método Titulométrico (pH-Stat)

Este método foi usado para complementar o método da hidrólise do *p*NPP, pois utiliza substratos naturais (triacilgliceróis) das lipases. Como o *p*NPP é um substrato sintético, para ter-se maior confiabilidade de que se está trabalhando com uma lipase verdadeira, deve-se realizar ao menos alguns ensaios com substratos naturais destas enzimas. Além disso, o método possibilita a dosagem da enzima imobilizada diretamente no meio ou do extrato bruto liofilizado (pó), sem prévia ressuspensão em tampão, como no método do *p*NPP.

A determinação da atividade de lipases por titulometria foi baseada no método proposto por Stuer et al.(1986), com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis (Figura 18).



**Figura 18.** Representação esquemática para a hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases. Adaptado de Mendes et al. (2005).

Foram usados como substratos (Sigma entre 98 e 99% de pureza), a trioleína (TC18:1), tricaprilina (TC8) e tributirina (TC4). Para o primeiro, fez-se uma emulsão contendo 6,25% (v/v) do substrato ( $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ ), 6,25% (m/m) de Triton-X100 e 74,5 % de tampão Tris-HCl  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0 com  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl. Para os outros dois,  $250 \mu\text{L}$  ( $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ ) de tributirina e  $500 \mu\text{L}$  ( $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ ) de tricaprilina foram adicionados diretamente no tampão Tris-HCl  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0 com  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl, sob agitação forte, no próprio frasco de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado). Volumes de 0,2 a 1 mL da solução enzimática ou 10 mg da enzima liofilizada foram adicionadas em 15 mL da solução (ou emulsão) sob agitação magnética (300 rpm) a  $37^\circ\text{C}$ ; a reação foi seguida por 5 min. A solução foi titulada durante este intervalo de tempo em pH-Stat (titulador automático), mantendo-se o pH em 7,0 com uma solução de NaOH  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ . Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos por min, a  $37^\circ\text{C}$ . A atividade foi calculada segunda a Equação 6.

$$A = \frac{\Delta V \cdot [\text{NaOH}] \cdot \text{FC}}{t \cdot X} \quad (6)$$

Sendo:  $\Delta V$ : variação do volume de NaOH consumido na titulação em mL;

$[\text{NaOH}]$ : concentração de NaOH em  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ;

FC: fator de correção do NaOH;

T: tempo em min;

X: volume da solução enzimática (mL), massa da enzima liofilizada ou imobilizada (mg).

#### **4.11.1.4. Método de Lowry-Tinsley**

Este método (Lowry e Tinsley, 1976) foi utilizado para quantificar indiretamente o teor de ésteres formados, a partir do teor residual de ácido oléico produzido durante a síntese de ésteres catalisada pela enzima. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres solúveis em fase orgânica. A atividade em  $\text{U.mL}^{-1}$  foi calculada a partir da curva de calibração construída a partir de concentrações de 0,5 a 4 mg de ácido, preparada nas mesmas condições do ensaio. Uma unidade de atividade enzimática (U) é correspondente à quantidade de enzima que promove o consumo de  $1 \mu\text{mol.min}^{-1}$  de ácido graxo, nas condições do ensaio.

#### **4.11.2. Determinação de Proteínas**

Durante o trabalho foram utilizados diferentes métodos de dosagem de proteínas, de acordo com a presença de interferentes e com a rapidez do ensaio. Os métodos utilizados foram: Bradford (1976), Smith (1985) e leitura direta a 280 nm.

#### **4.11.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Durante delipidação, alíquotas das extrações foram analisadas em cromatoplaças contendo fluoreseceína (Merck). A presença dos ésteres pode ser visualizada em câmara UV a 254 nm e por revelação com iodo. Utilizaram-se como padrões soluções de trioleína e ácido oléico em *n*-heptano. Além disso, as reações de esterificação foram acompanhadas por CCD,

tendo como padrão a solução de ácido oléico. A fase móvel empregada nos dois casos foi: *n*-hexano:éter etílico:ácido acético (7:3:0,1).

#### **4.11.4. Análises em Microscopia de Força Atômica (MFA)**

A microscopia de força atômica (MFA) foi utilizada para confirmar a hipótese de desagregação das proteínas pelo isopropanol (etapa de tratamento do extrato bruto com isopropanol 4.6.4.). Esta técnica tem a principal vantagem de permitir investigar a formação de agregados sem a necessidade de um sofisticado protocolo de preparação da amostra. A informação topográfica pode ser obtida de maneira relativamente fácil e com boa resolução espacial. A amostra foi preparada através da técnica de *spin-coating*, que permite a deposição da solução enzimática sobre uma superfície de forma homogênea. Inicialmente os suportes (materiais usados para a realização das imagens em MFA) foram preparados. Dois tipos de suportes foram empregados, um com características hidrofóbicas (Accurel EP 100) e um de natureza hidrofílica (silício). O Accurel EP 100 foi depositado sobre uma fita adesiva, de forma homogênea, e transferido para uma superfície rígida (em forma de disco com 1 cm de diâmetro). O silício foi cortado em quadrados de 1 cm<sup>2</sup> e em seguida, foi lavado por imersão (10 min, temperatura ambiente) em duas soluções: a) H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: HCl (86:11:3) e b) H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: NH<sub>4</sub>OH (4:1:1). Este tratamento visou preservar a camada de SiO<sub>2</sub>, mantendo a natureza hidrofílica do suporte.

Três tipos de amostras foram analisadas: a primeira foi preparada por meio da deposição de 10 µL da solução enzimática (fração pré-purificada por cromatografia de interação hidrofóbica e diluída com tampão fosfato pH 7,0 20 mmol.L<sup>-1</sup> a uma concentração próxima de 1 pmol.mL<sup>-1</sup>) sobre Accurel. A segunda, através da deposição de 10 µL da solução anterior sobre o silício. Para a terceira amostra, a solução enzimática foi diluída em tampão fosfato pH 7,0 20 mmol.L<sup>-1</sup> com 30% de isopropanol (v/v) e depositada sobre silício.

Tanto o Accurel como o silício, no momento da preparação das amostras foram aderidos em um disco metálico, para que a deposição das soluções pudessem ser realizadas através da técnica de *spin-coating* a 2000 rpm (Mennicke e Salditt, 2002). Após a deposição, os suportes foram lavados três vezes com as respectivas soluções de preparo para eliminar o excesso de material e mantidos em uma sala climatizada a 24 °C e 43% de umidade durante 24 h. As imagens de MFA foram realizadas num equipamento Shimadzu SPM-9500J3 (Departamento de Física-UFPR). Utilizou-se o modo dinâmico, com uma constante de mola de 30 N/m e a ponta com 10 nm de raio de curvatura. A velocidade de varredura foi de 1 Hz e 256x256 pontos foram adquiridos.

#### ***4.11.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

As análises em microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em um microscópio Jeol (Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR) com a finalidade de verificar alterações conformacionais no suporte antes e após o processo de imobilização de lipases por SPIL, bem como, verificar se houve a adsorção de células do microrganismo no suporte, já que a imobilização ocorre durante a fermentação. Esta técnica permite visualizar o material superficialmente, com aproximadamente 10 nm de espessura. As análises foram realizadas com 0,5 mg de suporte previamente seco. Para obter a imagem da superfície foi necessário depositar um filme de ouro sobre o suporte.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Produção e Purificação da Enzima

#### 5.1.1. Caracterização do Extrato Bruto

A Tabela 9 mostra os valores de atividade lipolítica do extrato bruto produzido por *B. cepacia* LTEB11 frente a diferentes substratos utilizando dois métodos diferentes: hidrólise do *p*NPP (4.11.1.1) e titulométrico (4.11.1.3.). Percebe-se que a atividade hidrolítica aumentou com o decréscimo da cadeia acílica. A maior atividade foi observada com a tributirina ( $40 \pm 3$  U.mg<sup>-1</sup>), sendo de aproximadamente quatro vezes maior do que a obtida contra trioleína ( $13 \pm 0,2$  U.mg<sup>-1</sup>). Apesar da atividade relativamente baixa contra a trioleína, este resultado indica a existência de lipases ditas “verdadeiras” (Jaeger et al., 1999) no extrato bruto.

**Tabela 9.** Atividade lipolítica do extrato bruto de *Burkholderia cepacia* LTEB11 com diferentes substratos em soluções aquosas.

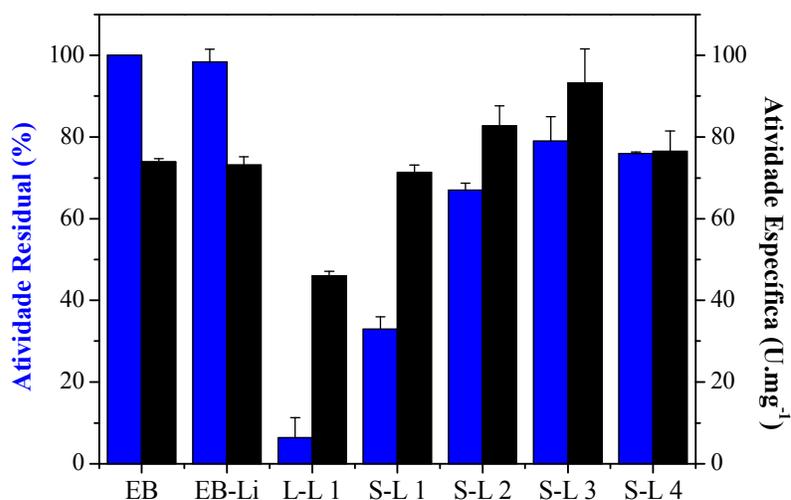
Substrato	Atividade específica *(U.mg <sup>-1</sup> )
<i>p</i> NPP	$48 \pm 2,4$
Tributirina C4	$40 \pm 3$
Tricaprilina C8	$28 \pm 2$
Trioleína C18:1 ( $\Delta^9$ )	$13 \pm 0,2$

\*Proteínas dosadas por Bradford (1976).

#### 5.1.2. Liofilização e Delipidação do Extrato Bruto

Verificou-se que não houve perdas de atividade após o processo de liofilização. Com relação à delipidação, como descrito anteriormente, esta etapa é importante, pois todo e qualquer composto remanescente da fermentação (óleos, ácidos graxos e lipídios) pode servir como substrato para o biocatalisador e, portanto, deve ser retirado do extrato bruto. A

remoção dos lipídeos também pode ser importante para a purificação da enzima, feita em coluna de interação hidrofóbica (CIH), pois estes podem favorecer a saturação da coluna cromatográfica. Como não se tinha noção da estabilidade das enzimas durante o processo de extração com solventes orgânicos, foram testadas dois tipos de extrações: líquido-líquido (solução de extrato bruto/solvente) e sólido-líquido (extrato bruto liofilizado/solvente). A segunda tem a vantagem de não haver formação de interface (enzima em solução com o solvente), que pode ocasionar a desnaturação das enzimas.



**Figura 19.** Atividades residuais e específicas do extrato bruto de *Burkholderia cepacia* LTEB11 após a delipidação, utilizando diferentes sistemas de solventes. EB: extrato bruto em solução; EB-Li: extrato bruto liofilizado; L-L: EB-Li após extração líquido-líquido com metanol/clorofórmio (1:9); S-L 1, S-L 2, S-L 3 e S-L 4: EB-Li após extração sólido-líquido com metanol/clorofórmio (1:9); butanol/clorofórmio (9:1); butanol/clorofórmio (1:9) e *n*-heptano respectivamente.

Os resultados mostraram que a extração líquido-líquido (L-L) causou mais desnaturação da enzima, (atividade residual de  $6,4 \pm 0,3\%$  e atividade específica de  $46 \pm 1,1$  U.mg<sup>-1</sup>) quando comparada com a extração sólido-líquido (S-L 1), (atividade residual de  $33 \pm 2\%$  e atividade específica de  $71,4 \pm 1,7$  U.mg<sup>-1</sup>), usando o mesmo sistema de solventes (metanol/clorofórmio 1:9) (Figura 19). De todos os sistemas testados, os melhores resultados

foram obtidos com os sistemas S-L 3 (clorofórmio: *n*-butanol 9:1 e S-L 4 (*n*-heptano puro), com atividades residuais (A.R) de  $79 \pm 6\%$  e  $76 \pm 0,3\%$ , e atividades específicas de  $93,1 \pm 8 \text{ U.mg}^{-1}$  e  $76,5 \pm 5 \text{ U.mg}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 10). Observou-se portanto, perda de 30% na atividade residual para o sistema S-L 3, mas a atividade específica aumentou de  $76,7 \text{ U.mg}^{-1}$  para  $93,1 \text{ U.mg}^{-1}$ , indicando que houve remoção de outras proteínas, acompanhada da desnaturação parcial da lipase. Como a atividade específica foi maior no sistema S-L 3, este foi o procedimento padrão utilizado para delipidar o extrato bruto nos experimentos posteriores. Todas extrações foram acompanhadas por CCD. Em média, foram realizadas oito extrações para que houvesse total desaparecimento das manchas nas placas.

Quando se trata de delipidação usando solventes orgânicos, deve-se ressaltar a importância da estabilidade da enzima frente a este tratamento que, em média, tende a durar mais de 2 h até que todo o material lipídico seja eliminado. Os resultados aqui obtidos, especialmente com o sistema *n*-butanol/clorofórmio e *n*-heptano são importantes, pois mostraram que o extrato lipolítico foi muito estável nestes solventes. Poucas enzimas possuem o potencial de continuar ativas após o contato com solventes orgânicos, sejam eles puros ou em misturas. A lipase de *Penicillium corylophilum*, por exemplo, é muito estável em *n*-heptano (130% de atividade residual após 30 min de incubação), mas apresenta pouca estabilidade em *n*-butanol (1,7% de atividade residual após 30 min de incubação) (Baron et al., 2005). Rahman et al. (2005) incubaram uma lipase de *Pseudomonas sp.* durante 2 h em vários solventes e a atividade residual máxima foi de 44,5% em 1-pentanol. A mesma lipase perdeu toda atividade em presença de *n*-hexano e apresentou uma atividade residual de apenas 5% após ser incubada em clorofórmio por 2 h. A lipase do *Bacillus sphaericus* 205y foi estudada com relação à estabilidade em solventes orgânicos e foi estável em metanol (120% de atividade residual após 30 min de incubação, 37°C), mas apresentou baixa estabilidade em butanol (23% de atividade residual após 30 min de incubação, 37°C) (Sulong et al., 2006).

**Tabela 10.** Tratamento de delipidação no extrato lipolítico bruto de *Burkholderia cepacia* LTEB11 liofilizado. Balanço total dos processos mais efetivos: *n*-heptano (puro) e CH<sub>3</sub>Cl/*n*-butanol 9:1.

		Amostras			
		EB <sup>(1)</sup>	Liofilizado	Delipidado ( <i>n</i> -heptano)	Delipidado (CH <sub>3</sub> Cl/butanol 9:1)
Quantidade de amostra	V (mL)	20	-	-	-
	m (g)		0,24	0,20	0,20
Atividade	U.mL <sup>-1</sup>	61,0 ± 1,3	-	-	-
	U.mg <sup>-1</sup> do pó	-	4,8 ± 0,2	4,8 ± 0,3	4,6 ± 0,4
	U (totais)	1220,0 ± 18	1200,8 ± 27	927,1 ± 47	961 ± 75
Atividade específica	U.mg <sup>-1</sup>	76,7	70,4	76,5	93,1
Proteína (P)	mg.mL <sup>-1</sup>	0,8 ± 0,06	-	-	-
	µg.mg <sup>-1</sup> do pó		68,9 ± 1,3	62,7 ± 0,7	49,5 ± 2,1
	P (totais)	16,5 ± 0,9	17,0 ± 0,3	12,7 ± 0,15	10,3 ± 0,41
Recuperação	R.A <sup>(2)</sup> (%)	100	98	76	79
	R.P <sup>(3)</sup> (%)	100	100	77	62
	FP <sup>(4)</sup>	-	0,91	0,99	1,21

Sendo: <sup>(1)</sup>EB: extrato lipolítico bruto; <sup>(2)</sup>R.A: recuperação de atividade; <sup>(3)</sup>R.P: recuperação de proteínas; <sup>(4)</sup>FP: fator de purificação.

### 5.1.3. Efeito do Isopropanol na Atividade e na Estabilidade da Lipase

A lipase de *B. cepacia* LTEB11 é produzida na forma de um agregado de alta massa molar (acima de 200 kDa) já no meio de fermentação, e a quebra destes agregados, normalmente por adição de solventes orgânicos, que libera sítios ativos bloqueados nos agregados, pode levar a um aumento da atividade enzimática (Lima et al., 2004). Assim, após

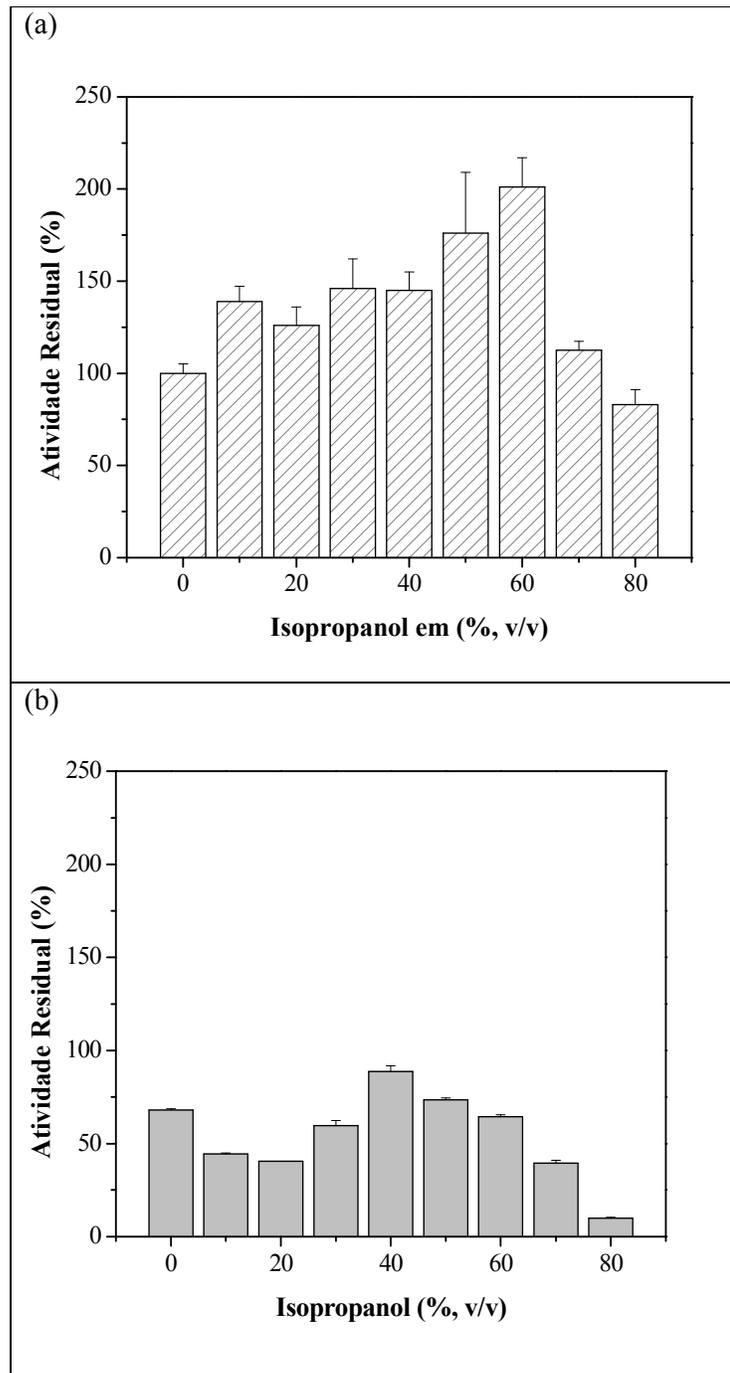
a delipidação, foi realizado um estudo de ressuspensão do extrato bruto em isopropanol, pois estudos anteriores indicaram que a utilização deste solvente favorecia a desagregação da enzima, e poderia assim facilitar as etapas de purificação e provavelmente a de imobilização.

Os resultados obtidos, após a adição do isopropanol em diferentes concentrações e incubação (37°C por 30 min), mostraram que o extrato bruto apresentou não somente estabilidade mas também ativação de até 200%, com os maiores valores de atividade obtidos utilizando-se 60% ( $201 \text{ U.mg}^{-1} \pm 16\%$ ) de isopropanol (Figura 20a). Entretanto, quando o tempo de incubação aumentou para 16 h, mesmo à temperatura ambiente (25 °C, condição de imobilização), a enzima perdeu cerca de 12% de atividade quando incubada com 40% de isopropanol, contra 42% de perdas quando o solvente não é adicionado ao extrato bruto (Figura 20b). Portanto, para fins práticos, a adição de 40% de isopropanol ao extrato bruto foi então adotada para os ensaios de imobilização (item 5.2.1).

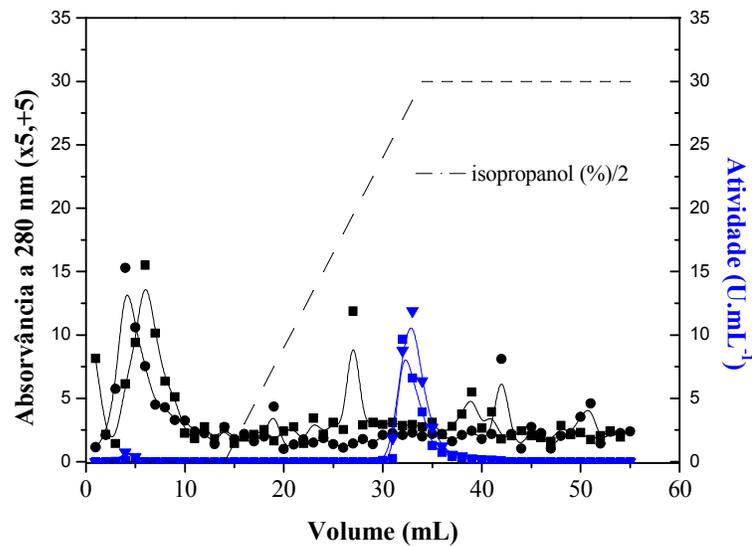
#### ***5.1.4. Purificação do Extrato Bruto por Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH)***

Um dos problemas encontrados por Lima (2004) foi a purificação da lipase de *B. cepacia* à homogeneidade, pois no gel da eletroforese SDS-PAGE obtido após a CIH, sempre apareciam 3 bandas de proteínas mesmo quando se adicionava isopropanol durante a purificação cromatográfica. Isto indicava que além da lipase estudada no presente trabalho, havia outras duas proteínas que não tinham características de lipases em termos de atividade enzimática e massa molar.

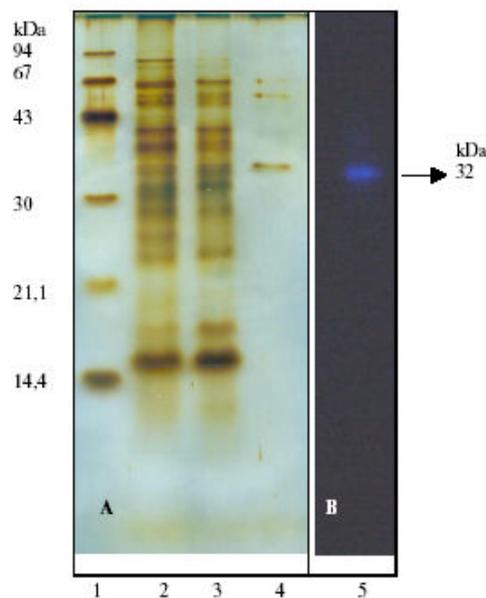
Foram então estudadas duas condições de purificação em CIH. A primeira, seguindo o protocolo descrito por Lima (2004), que utilizava o extrato bruto não delipidado e a segunda, com o extrato bruto após delipidação. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre os perfis cromatográficos da amostra delipidada (Figura 21) e da não-delipidada.



**Figura 20.** Estabilidade do extrato bruto de *Burkholderia cepacia* LTEB11 com diferentes concentrações de isopropanol, (10 a 80% v/v) e diferentes temperaturas e tempos de incubação. Condições: (a) 30 min, 37 °C; (b) 16 h, 25 °C, agitação de 200 rpm. A atividade residual foi calculada em relação ao extrato bruto incubado em tampão sem isopropanol.



**Figura 21.** Perfil cromatográfico dos extratos brutos em coluna de interação hidrofóbica Octyl Sepharose (CIH). Condições: Eluição com gradiente (1) tampão Tris-HCl  $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,5; 2) tampão Tris-HCl  $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 7,5, com 60% de isopropanol. Frações de 1 mL, vazão de  $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ ; injeção de 5 mL; volume das frações 1 mL. Absorvância a 280 nm: (●) não-delipidado e (■) delipidado. Atividade ( $\text{U.mL}^{-1}$ ): (▼) não-delipidado e (■) delipidado.



**Figura 22.** Eletroforese SDS-PAGE após análise do extrato bruto (tratado com isopropanol) por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Octyl Sepharose CL-4B. Linha 1: marcadores de massa molar; linha 2: extrato bruto; linha 3: extrato bruto tratado com isopropanol 30 %, linha 4: frações eluídas da Octyl Sepharose CL4B. Foram aplicadas 3 mg de proteína. Revelação por nitrato de prata. B) Zimograma utilizando MUF-Butirato como substrato. Fonte: Lima (2004).

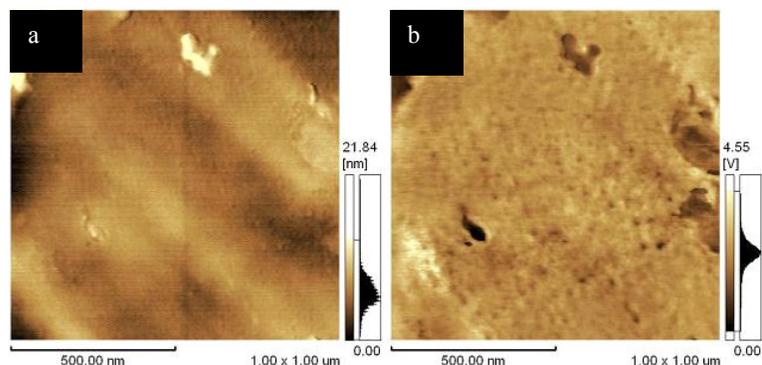
O gel de eletroforese (dados não mostrados) de ambas as amostras (delipidada e não delipidada) mostrou a presença de três bandas (32, 52 e 63 kDa), confirmando os resultados obtidos por Lima (2004) (Figura 22), quando somente a banda de 32 kDa apresentou atividade, indicando a presença de apenas uma enzima com atividade lipolítica. Estes resultados mostraram que a delipidação do extrato bruto não melhorou o grau de purificação da enzima, pois não houve diferenças significativas entre os ensaios.

#### **5.1.5. Desagregação do Extrato Lipolítico Confirmada por Microscopia de Força Atômica**

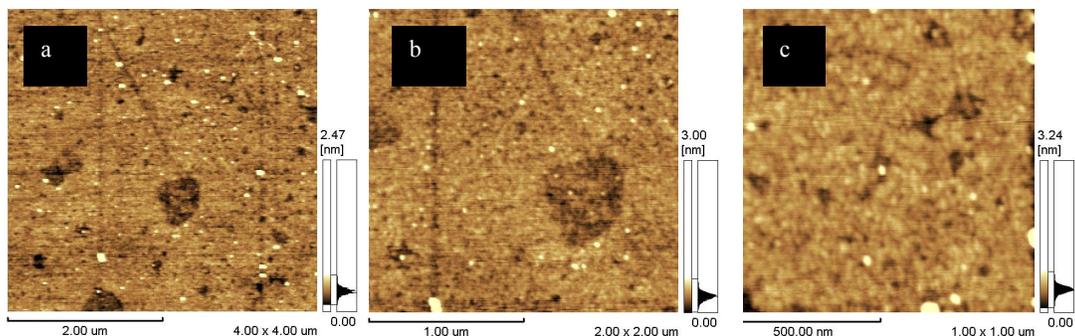
A microscopia de força atômica (MFA) foi utilizada para estudar a possibilidade de desagregação da lipase de *B. cepacia* com a adição de isopropanol, o que justificaria o aumento de atividade encontrado quando da adição do solvente ao extrato bruto (item 5.1.3). Para tanto, o extrato bruto já purificado como descrito anteriormente (sem delipidação, clarificado com 30% de isopropanol e parcialmente purificado por cromatografia de interação hidrofóbica) foi depositado em dois suportes: Accurel EP 100 (hidrofóbico) e silício (hidrofílico). No primeiro (hidrofóbico), usou-se apenas a enzima diluída em tampão fosfato 20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 pois, por se tratar de um material com alta hidrofobicidade, poderia auxiliar na desagregação da lipase de *B. cepacia* também hidrofóbica. No silício, foi colocada a enzima em tampão sem e com isopropanol. Pode-se observar (Figuras 23a e 23b) que, quando o extrato bruto purificado (sem isopropanol) foi depositado em um suporte hidrofóbico (Accurel EP 100), a superfície se apresentou uniforme.

Quando o extrato bruto purificado e adicionado de isopropanol foi depositado em um suporte hidrofílico (silício), observou-se também uma superfície uniforme (Figuras 24a, b e c). Mas, quando a solução enzimática sem isopropanol foi colocada no mesmo suporte, observou-se uma superfície heterogênea. A medida de rugosidade de algumas regiões nas Figuras (24 e 25) mostrou bem estas diferenças de superfície: a rugosidade da superfície na

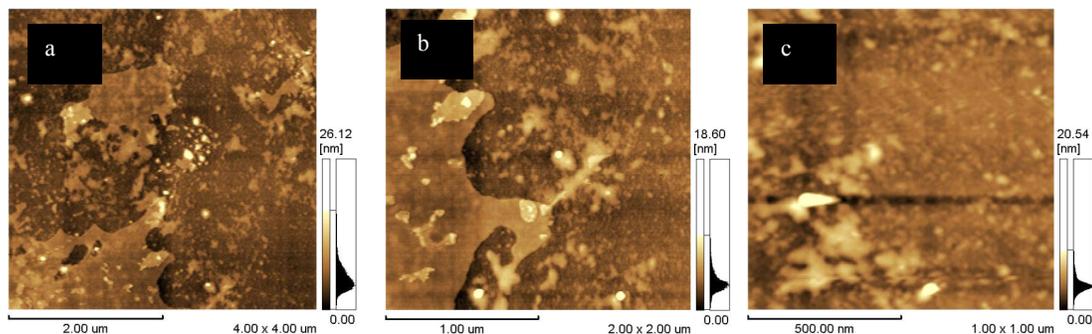
Figura 24c e 25a (silício com e sem isopropanol) foi de 0,422 nm e 3,062 nm, respectivamente.



**Figura 23.** Imagem em Microscopia de Força Atômica (MFA) do extrato bruto purificado da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 (sem isopropanol) adsorvida no suporte hidrofóbico Accurel EP 100. (a) Imagem 1x1  $\mu\text{m}$ . 10 (b). *Phase image* da Figura 23a.



**Figura 24.** Imagem em Microscopia de Força Atômica (MFA) do extrato bruto purificado da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 com 30% de isopropanol adsorvida em silício. 24a. Imagem 4x4  $\mu\text{m}$ . 24b. Imagem 2x2  $\mu\text{m}$  24c. Imagem 1x1  $\mu\text{m}$ . As imagens obtidas a partir da solução enzimática contendo isopropanol são mais homogêneas.



**Figura 25.** Imagem em Microscopia de Força Atômica (MFA) do extrato bruto purificado da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 sem isopropanol adsorvida em silício. 25a. Imagem 4x4  $\mu\text{m}$ . 25b. Imagem 2x2  $\mu\text{m}$ . 25c. Imagem 1x1  $\mu\text{m}$ . Observa-se aglomerados nas imagens obtidas a partir da solução enzimática contendo somente tampão fosfato pH 7,0 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

No caso do suporte hidrofílico sílcio, quando não se adicionou isopropanol, observou-se uma superfície heterogênea, provavelmente de agregados de enzima (Figuras 25 a,b e c) causados por uma maior interação enzima-enzima. No caso do suporte hidrofílico com adição de isopropanol, a presença do solvente diminuiria a hidrofobicidade das moléculas da enzima, o que favoreceria a interação enzima-suporte, produzindo também uma superfície homogênea. Provavelmente o suporte Accurel EP 100, por ser hidrofóbico, favorece a interação suporte com as regiões hidrofóbicas da enzima e devido a isto, a superfície é mais homogênea (interação suporte enzima favorecida) e a formação de agregados seria desfavorecida. Estes resultados sugerem, portanto, que a presença de isopropanol na solução enzimática realmente auxilia na desagregação da lipase.

## **5.2. Estudos de Imobilização**

### ***5.2.1. Influência da Adição do Isopropanol Durante a Imobilização***

Como o estudo anterior (5.1.5) mostrou que o isopropanol proporcionou melhor desagregação nas lipases de *B. cepacia*, estudou-se a influência da presença do isopropanol no processo de imobilização. Para tanto, a imobilização em Accurel EP 100 foi realizada com o extrato bruto (delipidado conforme item 4.6.2./b e ressuspenso em tampão fosfato pH 7,0 0,05 mol.L<sup>-1</sup>) contendo isopropanol (40% v/v) e comparada com a imobilização sem isopropanol. Este experimento teve por finalidade verificar se a desagregação enzimática (observada por MFA) aumentava a eficiência e a atividade da enzima imobilizada. A eficiência de imobilização (E, que significa o quanto de enzima adsorveu sobre o suporte, Eq. 1, item 4.8.1.1.) foi determinada e foi constatado que em ambos os casos houve aproximadamente 100% de imobilização após 16 h. Posteriormente, foram feitos os ensaios de produção do oleato de etila, utilizando-se 100 mg da enzima imobilizada na presença ou na ausência de isopropanol. Os resultados mostraram que a síntese utilizando a enzima imobilizada em

presença de isopropanol foi menos eficiente (conversão em éster de 71%) do que a síntese onde se utilizou o biocatalisador imobilizado sem o isopropanol (conversão em éster de 94%), após 10 h de reação. A atividade em  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de suporte também foi inferior para a síntese utilizando a enzima imobilizada em presença de isopropanol ( $4,4\cdot 10^{-3} \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), em comparação ao outro procedimento sem isopropanol ( $5,7\cdot 10^{-3} \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Portanto, devido à retenção da atividade ter sido menor quando se prepara a imobilização da enzima em presença do isopropanol, o procedimento selecionado para imobilizar a lipase em Accurel EP 100 ou em qualquer outro suporte foi com a solução enzimática sem a adição de isopropanol.

### **5.2.2. Seleção do Suporte para Imobilização**

Foram estudados onze suportes, como mostra a Tabela 11, avaliando-se inicialmente a eficiência de imobilização e a retenção da atividade em meio aquoso (método da hidrólise do *p*NPP, 4.11.1.1.) e em meio orgânico (hidrólise do *p*NPP em *n*-heptano, 4.11.1.2.).

Observou-se (Tabela 11) que o suporte que apresentou a maior eficiência (100%) foi o Accurel EP 100, tendo apresentado saturação entre 25 e 30 mg de proteína por grama de suporte, pois já na última concentração observou-se atividade residual no sobrenadante após a imobilização. Não houve imobilização da enzima nos polímeros EVA, PET e PEBD nas condições estudadas neste trabalho. Para os demais suportes, a capacidade de adsorção de proteínas foi muito menor que a do Accurel EP 100, nas mesmas condições experimentais. Entretanto, o fato de se ter conseguido uma eficiência de 100% na imobilização não garantia que a enzima estivesse ativa no suporte, pois este parâmetro apenas mostra o desaparecimento da atividade no sobrenadante após a imobilização. Por isso, foram feitos os ensaios de atividade do imobilizado, utilizando-se o método da hidrólise do *p*NPP em meio orgânico e aquoso. Nesta etapa de seleção dos suportes, considerando apenas os suportes onde houve

imobilização, foram dosadas as atividades do material imobilizado onde a eficiência foi maior.

**Tabela 11.** Eficiência da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 em diferentes suportes.

	Suporte	Razão proteína (mg)/massa suporte (g)				
		10	15	20	25	30
Eficiência (%) <sup>(a)</sup>	Accurel EP 100 pó	100	100	100	<b>100</b>	99
	Accurel EG100 <i>pellets</i>	32	42	<b>43</b>	40	30
	Amberlite	49	59	<b>92</b>	65	69
	AMP	20	45	<b>64</b>	52	32
	EVA	0	0	0	0	0
	DTA	<b>50</b>	14	11	0	0
	HDL-L	<b>62</b>	50	32	30	26
	HOZ-L	<b>82</b>	77	70	70	67
	PET	0	0	0	0	0
	PEBD	0	0	0	0	0

a) Eficiência (%) – calculada por diferença entre a atividade inicial do extrato bruto e a atividade final do sobrenadante após a imobilização. Accurel: polipropileno; Amberlite: poliestireno-divinilbenzeno AMP: alumina meso-porosa, EVA: polietileno vinil acetato, DTA: diatomácea, HDL-L: hidroxiduplólamelar-laurato, HOZ-L: Hidróxido de zinco-laurato, PET: Politereftalato de etileno em pellets, PEBD: Polietileno de baixa densidade em pó.

Observou-se (Tabela 12) que as atividades de hidrólise em meio orgânico foram muito baixas, comparadas às atividades em meio aquoso (Tabela 13), sendo a maior atividade observada para a enzima imobilizada no Accurel EP 100 ( $1,80 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  para o meio orgânico e  $1,1 \pm 0,14 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  para o meio aquoso), dando uma razão O/A (meio orgânico/meio aquoso) de 0,0016. Resultados semelhantes foram obtidos por Pencreac'h e Baratti (1996) na hidrólise do *p*NPP em meio orgânico (*n*-heptano) e aquoso (solução contendo goma arábica e Triton X-100) utilizando a lipase de *B. cepacia* liofilizada (Amano Pharmaceutical Co. Ltd. Nagoya, Japan). Em geral, lipases têm atividade significativamente menor em meios orgânicos do que em meio aquoso (Rahman et al., 2005; Pencreac'h e

Baratti, 1996). Isto pode ser atribuído ao efeito negativo do solvente sobre a conformação cataliticamente ativa da enzima ou ao teor de água presente no sistema, pois, em se tratando de uma reação de hidrólise, a reação não é favorecida em baixos teores de água. A dosagem de atividade hidrolítica em meio orgânico é importante, porque previne ou evita a dessorção da enzima ao meio reacional e mostra que a enzima imobilizada é ativa em solventes orgânicos.

**Tabela 12.** Retenção da atividade em **meio orgânico** da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em suportes hidrofóbicos e hidrofílicos. Condições: 37°C, 15 min, 200 rpm, substrato *p*NP (10 mM) em *n*-heptano.

<b>Suporte</b>	<b>Atividade teórica (U.mg<sup>-1</sup> de suporte)</b>	<b>Atividade real (U.mg<sup>-1</sup> de suporte) em meio orgânico</b>	<b>R (%)</b>
Accurel EP 100	9,3.10 <sup>-4</sup>	1,8.10 <sup>-3</sup> ± 1.10 <sup>-4</sup>	<b>193</b>
Accurel EG 100	2,6.10 <sup>-4</sup>	1,4.10 <sup>-4</sup> ± 5.10 <sup>-6</sup>	53
Amberlite	6,2.10 <sup>-4</sup>	5.10 <sup>-5</sup> ± 1.10 <sup>-5</sup>	8
HDL-L	2,2.10 <sup>-4</sup>	7.10 <sup>-4</sup> ± 1.10 <sup>-5</sup>	<b>318</b>
HOZ-L	3,1.10 <sup>-4</sup>	3.10 <sup>-4</sup> ± 1.10 <sup>-5</sup>	97
AMP	4,4.10 <sup>-4</sup>	4.10 <sup>-5</sup> ± 9.10 <sup>-6</sup>	9
DTA	1,7.10 <sup>-4</sup>	2,6.10 <sup>-4</sup> ± 2.10 <sup>-5</sup>	<b>150</b>

Sendo: Accurel: polipropileno, Amberlite: poliestireno-divinilbenzeno, AMP: alumina meso-porosa, DTA: diatomácea, HDL-L: hidroxiduplomalamar-laurato, HOZ-L: Hidróxido de zinco-laurato.

A retenção da atividade (R= atividade real da enzima imobilizada/atividade teórica da enzima imobilizada) foi maior que 100% para o HDL-L (318%), Accurel EP 100 (193%) e DTA (150%) em meio orgânico e maior ou igual a 100% para o DTA (166%) e para o Accurel EP 100 (100%) em meio aquoso (Tabelas 12 e 13). Este parâmetro indica quanto de atividade está presente no suporte após o processo de imobilização em comparação com a enzima livre. Os valores de retenção são dependentes da imobilização e do meio reacional

onde se realiza a reação. Retenções distintas de 100% indicam que houve modificações estruturais na enzima favoráveis ou não à catálise, após a imobilização. No caso específico, a atividade da enzima imobilizada (em HDL-L por exemplo) em meio orgânico foi maior quando comparada à enzima liofilizada (retenções acima de 100%), indicando que o processo de imobilização não causou nenhuma inativação ou desnaturação da enzima. Este resultado era esperado, já que a atividade da enzima liofilizada tende a ser baixa devido à formação de agregados insolúveis em solventes orgânicos (Persson et al., 2002b), o que acarreta um aumento dos efeitos difusionais e, conseqüentemente, uma diminuição da velocidade de reação.

**Tabela 13.** Retenção da atividade em **meio aquoso** da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em suportes hidrofóbicos e hidrofílicos. Condições: 37°C, 5 min.

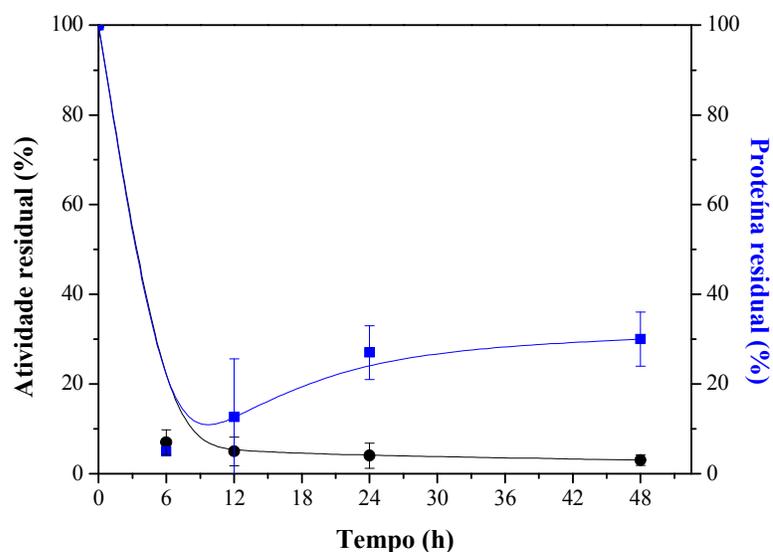
<b>Suporte</b>	<b>Atividade teórica (U.mg<sup>-1</sup> de suporte)</b>	<b>Atividade real (U.mg<sup>-1</sup> de suporte) em meio aquoso</b>	<b>R (%)</b>
Accurel EP 100	1,1	1,1 ± 0,140	<b>100</b>
Accurel EG 100	0,4	0,02 ± 0,001	5
Amberlite	1,0	0,06 ± 0,005	6
HDL-L	0,7	0,5 ± 0,008	70
HOZ-L	0,9	0,2 ± 0,010	22
AMP	0,7	0,2 ± 0,040	29
DTA	0,6	1,0 ± 0,040	<b>167</b>

Para as dosagens em meio aquoso (Tabela 13), os valores de retenção indicaram que as mudanças conformacionais da enzima foram favoráveis à catálise quando a enzima foi imobilizada em DTA (R de 167%) e Accurel EP 100 (R de 100%). Para HDL-L, R foi igual a 70%, que é um valor relativamente baixo, mas que não impossibilita a utilização deste suporte. Baseado principalmente na atividade de hidrólise em meio orgânico, o Accurel EP

100 e o HDL-L são os suportes mais promissores para a realização dos estudos relacionados à cinética de imobilização e utilização da lipase de *B. cepacia* imobilizada em biocatálise. Estudos de reatividade dos suportes [controles de reação de hidrólise do *p*NPP- (4.11.1.2.) e esterificação do oleato de etila, (4.10.2.), usando o suporte sem a enzima] indicaram que o HDL-L atua como catalisador em reações de esterificação e que além disso, absorve boa parte do ácido graxo presente no meio reacional, interferindo na disponibilidade de substrato para a reação de síntese, e conseqüentemente, nos resultados. Assim, a enzima imobilizada em HDL-L não foi utilizada a partir desta etapa do trabalho. Portanto, para etapas subseqüentes utilizou-se somente o Accurel EP 100 como suporte para a imobilização da lipase de *B. cepacia*.

### 5.2.3. Cinética de Imobilização

A cinética de imobilização da lipase de *B. cepacia* em Accurel EP 100 mostrou que em 6 h houve quase total desaparecimento da atividade residual no sobrenadante (93% para o Accurel EP 100) (Figura 26).



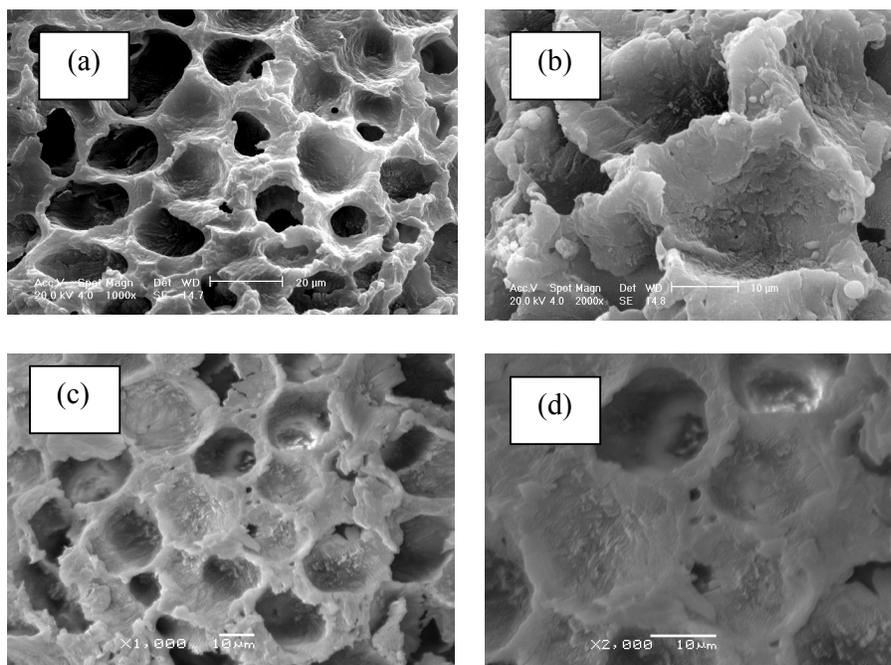
**Figura 26.** Cinética de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 em Accurel EP 100. Atividade residual no sobrenadante (■) e proteína (●) residual no sobrenadante determinada pelo método do *p*NPP aquoso e Bradford (1976), respectivamente.

Nos estudos de eficiência de imobilização anteriores (5.2.2) foram constatados 100% de eficiência em Accurel EP 100 após 16 h de imobilização. As diferenças observadas podem ser explicadas pelo procedimento de imobilização, que anteriormente foi realizado em Eppendorfs com agitação em mini-shaker (0,5 mL do extrato e 0,1 g do suporte), e durante a cinética, em erlenmeyers contendo 100 mL do extrato e 2 g do suporte, em agitador orbital (200 rpm). Observou-se ainda que praticamente toda a proteína foi adsorvida nas primeiras 6 h.

### **5.3. Simultânea Produção e Imobilização de Lipases (SPIL)**

Realizou-se a produção de lipases de *B. cepacia* com adição do suporte (Accurel EP 100) diretamente ao meio de cultura durante o cultivo, com o objetivo de reduzir as etapas de preparação do extrato bruto utilizadas para técnica de imobilização dos ensaios anteriores. Estudou-se o tempo de adição dos suportes (12, 24 e 48 h), fixando-se, no meio de cultura, a concentração de suporte em 20 g.L<sup>-1</sup> e a concentração de óleo de oliva em 1,0% (v/v). A atividade da enzima imobilizada foi determinada pelo método *p*NPP aquoso (4.11.1.1). Os resultados mostraram que a atividade foi maior (1,5 U.mg<sup>-1</sup> de suporte) quando o suporte foi adicionado após 12 h de fermentação; para adição em 48 h, a atividade obtida foi de apenas 0,3 U.mg<sup>-1</sup> de suporte. Comparativamente, a atividade da enzima imobilizada em Accurel por SPIL foi 50% maior do que pelo método anterior de imobilização (1,0 U.mg<sup>-1</sup>). Portanto, foi possível obter a enzima imobilizada simultaneamente a sua produção, com uma atividade superior à metodologia convencional. Esses resultados são importantes, pois além de mostrarem que é possível reduzir-se o número de etapas do processo, a metodologia SPIL é inédita para imobilização de enzimas, tendo sido reportada apenas para imobilização de células de microrganismos e posterior utilização em reações em ambientes aquo-restritos ou para a imobilização de células para produção de enzimas (Hama et al., 2007; Nighojkar et al., 2006). Entretanto, neste ponto do trabalho não se sabia se células do microrganismo também

havam sido imobilizadas. Para esclarecer este ponto, investigou-se a possibilidade da presença de células bacterianas adsorvidas sobre o suporte através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).



**Figura 27.** Fotomicrografia do suporte Accurel EP 100 antes (a,b) e após (c,d) a simultânea produção e imobilização da lipase (SPIL) de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Adição do suporte após 12 h de fermentação. Aumento: (a,c) 1000 (b,d) 2000 vezes.

Nas Figuras 27 (a, b), que mostram o suporte antes da imobilização, destacam-se as cavidades vazias, com diâmetro médio de 15  $\mu\text{m}$  antes da imobilização; as Figuras 27 (c, d) mostram o suporte após a imobilização, onde se observa as suas cavidades parcialmente preenchidas. Além disso, aparentemente não há células do microrganismo aderidas ao material, pois estas possuem a forma de bastonetes com 1,2 a 3,2  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,8-1  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Bergey e Holt, 1994). Entretanto como a técnica permite a análise apenas de alguns milímetros de espessura da amostra (1 a 6  $\mu\text{m}$ ), não se pode descartar a possibilidade da presença de células no interior do suporte já que o Accurel é um material poroso e as células poderiam estar aderidas nestas cavidades internas.

### ***5.3.1. Estudo da Imobilização SPIL Via Delineamento Fatorial***

Levando em consideração que a imobilização em Accurel EP 100 foi influenciada pelo tempo de adição do suporte à fermentação, a imobilização por SPIL foi otimizada através de um delineamento fatorial fracionário com três níveis e três variáveis. Incluiu-se o tempo de adição inicial (0 h), pois esta era uma condição que não havia sido estudada e excluiu-se adição do suporte em 48 h, já que a atividade da enzima imobilizada nesta condição havia sido muito baixa. Selecionou-se ainda como variável a concentração de suporte e de óleo de oliva (%) no meio de cultura para verificar se a variação destes parâmetros poderia influenciar na imobilização ou na produção de lipases durante a fermentação. As variáveis e seus níveis, bem como os resultados experimentais, estão mostrados na Tabela 14.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 15) indicou que o modelo polinomial de segunda ordem [Eq. (3)] é estatisticamente significativo e adequado para representar a relação entre a resposta (atividade por mg de suporte) e as variáveis significativas, pois o valor do coeficiente de determinação é satisfatório ( $R^2 = 0,98$ ). Este valor indica que 98% da variação da atividade da enzima imobilizada pode ser atribuída a variáveis independentes e somente 2% da variação total não podem ser explicados pelo modelo, o que sugere que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais (Figura 28). Além disso, a falta de ajuste para a regressão foi não significativa ( $p=0,075$ ), ao nível de 5%, indicando que a equação prevista pode ser usada para qualquer combinação dos valores das variáveis estudadas.

Uma outra forma de avaliar o modelo estatístico utilizado na análise de variância é através dos erros de ajustamento, que devem ser independentes e normalmente distribuídos. Tais verificações foram contempladas quando se analisa a relação entre o número de ensaios e os resíduos (Figura 29), onde se observa uma distribuição aleatória entre os resíduos de todos os ensaios, sugerindo resíduos independentes.

**Tabela 14.** Valores experimentais para a atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizadas por SPIL em Accurel EP 100 para o delineamento fatorial fracionário com 3 níveis e 3 variáveis.

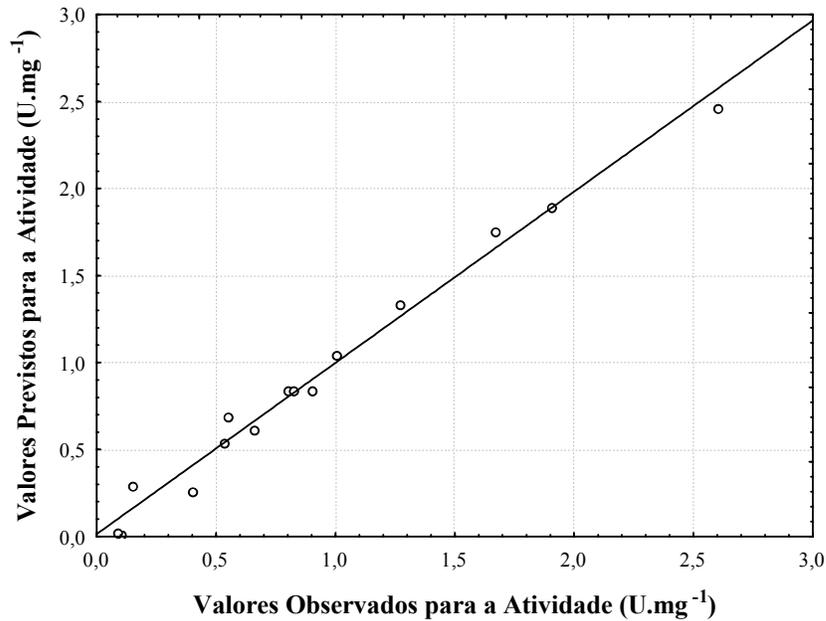
Experimento	Fatores			Atividade (U.mg <sup>-1</sup> de suporte)
	Tempo de adição do suporte (h), $x_1$	Concentração de suporte (g.L <sup>-1</sup> ), $x_2$	Concentração do óleo de oliva (%), $x_3$	
1	-1 <sup>a</sup> (0)	-1(10)	0(0,625)	1,90
2	1(24)	-1(10)	0(0,625)	1,67
3	-1(0)	1(30)	0(0,625)	0,10
4	1(24)	1(30)	0(0,625)	0,53
5	-1(0)	0(20)	-1(0,25)	0,66
6	1(24)	0(20)	-1(0,25)	0,40
7	-1(0)	0(20)	1(1,0)	0,15
8	1(24)	0(20)	1(1,0)	1,00
9	0(12)	-1(10)	-1(0,25)	1,27
10	0(12)	1(30)	-1(0,25)	0,55
11	0(12)	-1(10)	1(1,0)	2,60
12	0(12)	1(30)	1(1,0)	0,085
13	0(12)	0(20)	0(0,625)	0,90
14	0(12)	0(20)	0(0,625)	0,80
15	0(12)	0(20)	0(0,625)	0,82

<sup>a</sup>O número em parênteses representa o número real das condições nos experimentos.

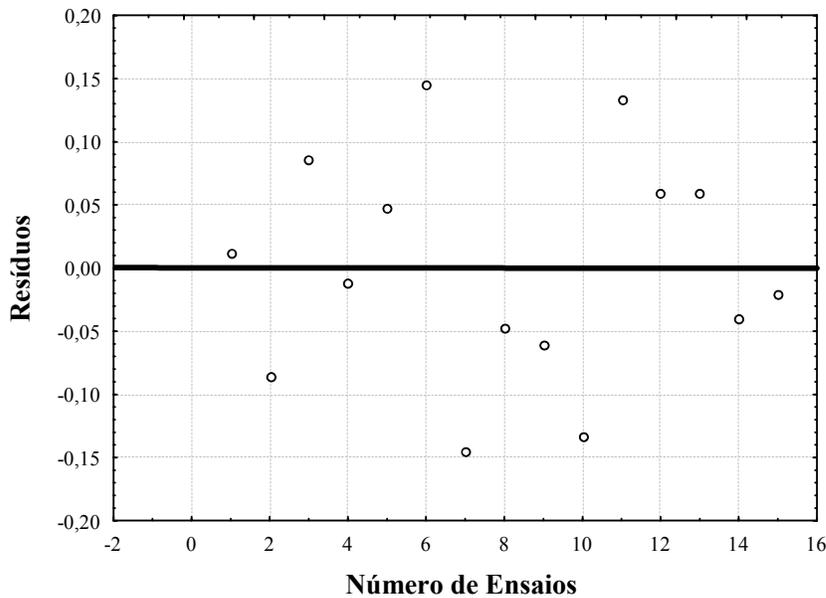
**Tabela 15.** Análise de Variância da equação prevista para atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Gráus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado	p-valor
<b>Regressão</b>	6,91	9	0,77	35	4,77	<0,001
<b>Resíduos</b>	0,11	5	0,022			
<b>Falta de Ajuste</b>	0,10	3	0,03	12,5	19,16	0,075
<b>Erro Puro</b>	0,012	2	0,006	R <sup>2</sup> = 98%		
<b>Total</b>	7,13	14				

significativo p< 0,05.



**Figura 28.** Valores previstos e observados experimentalmente para a atividade ( $\text{U.mg}^{-1}$  de suporte) da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL.



**Figura 29.** Distribuição dos resíduos fornecidos pelo modelo polinomial (Tabela 14).

O modelo previsto obtido aplicando a metodologia de superfície da resposta está representado a seguir pela Equação (4) polinomial de segunda ordem:

$$Y = 0,84 + 0,10x_1 - 0,77x_2 + 0,12x_3 - 0,18x_1^2 + 0,39x_2^2 - 0,10x_3^2 + 0,16x_1x_2 + 0,28x_1x_3 - 0,45x_2x_3 \quad (4)$$

A Tabela 16 mostra os coeficientes de regressão para a resposta polinomial (Y), ou seja, a atividade da enzima imobilizada (expressa em U.mg<sup>-1</sup> de suporte). Representou-se toda a equação (com todos os coeficientes significativos ou não), pois, analisando a equação somente com os coeficientes significativos, há uma diminuição significativa do coeficiente de correlação R<sup>2</sup> (de 0,98 para 0,92).

**Tabela 16.** Coeficientes de regressão para a resposta atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizadas por SPIL em Accurel EP 100 obtidos a partir da Tabela 14.

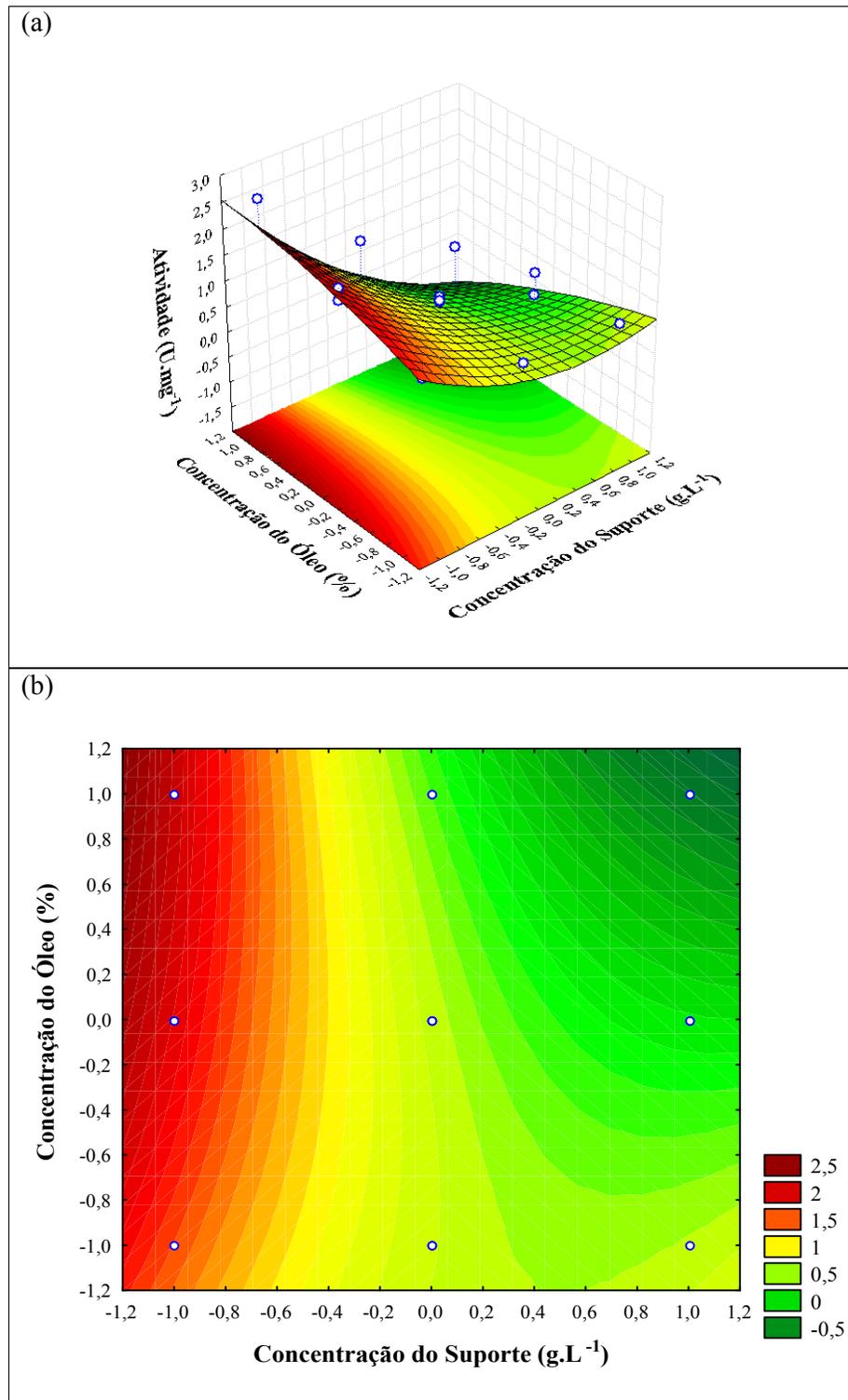
Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	T	p	Limite de Confiabilidade de -95%	Limite de Confiabilidade +95%
Média	0,84	0,086	9,78	0,0002	0,62	1,06
TAS <sup>a</sup> (L)	0,01	0,052	1,88	0,12	-0,04	0,23
[S] <sup>b</sup> (L)	-0,77	0,052	-14,68	0,000026	-0,91	-0,64
[O] <sup>c</sup> (L)	0,12	0,052	2,27	0,072	-0,016	0,25
TAS (Q)	-0,18	0,077	-2,35	0,066	-0,38	-0,017
[S] (Q)	0,39	0,077	5,06	0,0039	0,19	0,59
[O] (Q)	-0,10	0,077	-1,36	0,23	-0,30	0,09
TAS x [S]	0,16	0,074	2,21	0,08	-0,026	0,36
TAS x [O]	0,28	0,074	3,73	0,013	0,086	0,47
[S] x [O]	-0,45	0,074	-6,03	0,0018	-0,64	-0,26

<sup>a</sup>TAS: tempo de adição do suporte (h); <sup>b</sup>[S] concentração do suporte (g.L<sup>-1</sup>); <sup>c</sup>[O] concentração de óleo (%).

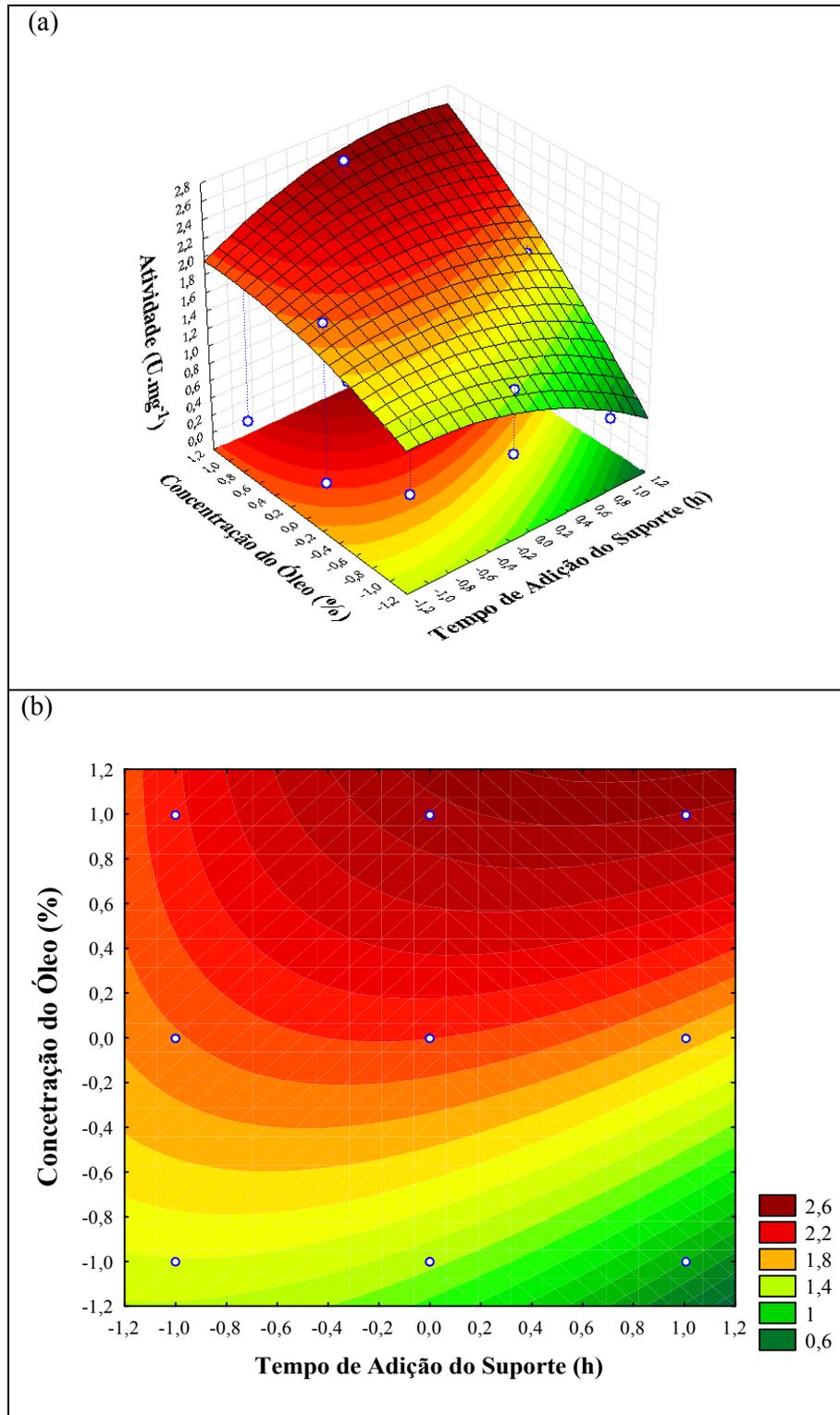
A análise dos efeitos das variáveis (Eq. 4 e Tabela 16), baseando-se no valor de p<0,05, mostrou que o único termo linear importante, dentro da faixa estudada, foi a concentração de suporte adicionado [S] (x<sub>2</sub>), indicando que, com o aumento da quantidade de suporte no meio de cultura, a atividade da enzima imobilizada diminui em 0,8 unidades

aproximadamente. Isto pode ser explicado pelo maior espalhamento da atividade total presente no meio entre as partículas do suporte, ou seja, como há mais suporte disponível, as moléculas de enzima tendem a se espalhar mais sobre o suporte. É ainda interessante ressaltar que a variável tempo de adição do suporte, dentro da faixa estudada (0-24h), não teve significância, ao contrário do que se obteve anteriormente, quando se utilizou um tempo maior de 48 h e obteve-se 4 vezes menos atividade do que quando se adicionou o suporte após 12 h. Dentre os termos quadráticos, foram significativos a concentração de suporte adicionado [S] ( $x_2^2$ ). Analisando-se os efeitos de segunda ordem, ou seja, aqueles resultantes da interação entre duas variáveis, houve interação significativa entre o tempo de adição do suporte ao meio de cultura ( $x_1$ ) (investigado de 0 a 24 h) e concentração de óleo de oliva ( $x_3$ ) (investigada entre 0,25 a 1%). A interação influenciou de forma positiva a atividade da enzima imobilizada, que aumenta em 0,28 unidades quando se passa simultaneamente os dois parâmetros do nível (-1) para (+1). Houve ainda interação de segunda ordem entre a concentração de suporte adicionada ao meio ( $x_2$ ) (investigada de 10 a 30 g.L<sup>-1</sup>) e concentração de óleo de oliva ( $x_3$ ) (investigada entre 0,25 a 1%). A interação influenciou de forma negativa, a atividade do imobilizado diminui em 0,45 unidades quando se passam simultaneamente os dois parâmetros do nível (-1) para (+1).

A partir destes resultados foi possível obter-se algumas conclusões deste conjunto de experimentos, que mostram as tendências previstas pelo modelo matemático.



**Figura 30.** Efeito da concentração do suporte (10 a 30 g.L<sup>-1</sup>) e do óleo de oliva (0,25 a 1%) na resposta atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL. (a) 3D e (b) 2D.



**Figura 31.** Efeito da concentração do óleo de oliva (0,25 a 1%) e do tempo de adição do suporte na resposta atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL. (a) 3D e (b) 2D.

Na Figura 30, observa-se que a relação entre concentração de suporte e concentração de óleo de oliva na fermentação sobre a resposta (atividade da enzima imobilizada) indicou o máximo de atividade (valor previsto de  $2,5 \text{ U.mg}^{-1}$  de suporte e observado de  $2,6 \text{ U.mg}^{-1}$  de suporte) com a mínima quantidade de suporte ( $10 \text{ g.L}^{-1}$  do meio de cultura) e máxima concentração de óleo de oliva (1%). Para este resultado contribuem dois fenômenos: o primeiro é o espalhamento maior da enzima quando se coloca mais suporte no meio, conforme já discutido anteriormente; o segundo tem relação com a maior indução da produção da lipase durante a fermentação quando se utiliza 1% de óleo de oliva no meio. Além disso, a falta de significância da variável tempo de adição do suporte (termo linear) sugere que o suporte pode ser adicionado em uma faixa de tempo de 12 a aproximadamente 20 h sem comprometer os resultados (Figura 31).

Comparando a atividade total obtida em cada erlenmeyer (150 mL), quando o suporte foi adicionado ao meio de cultivo (5200 U da enzima imobilizada em 2 g de suporte e 300 U residuais no sobrenadante em média), em relação ao cultivo sem adição do suporte (5000 U em média), três observações são importantes: primeiramente, percebe-se que a utilização da metodologia SPIL foi viável pois houve produção de atividade lipásica total superior (10%, em média), no meio de cultura. Além disso, para a imobilização convencional seriam necessários, de acordo com o protocolo otimizado no LTEB, para a quantidade de atividade produzida (5000 U), 4 g de suporte. Finalmente, o método SPIL possibilitou um aumento da atividade da enzima imobilizada de  $1,0 \text{ U.mg}^{-1}$  pela metodologia convencional para  $2,6 \text{ U.mg}^{-1}$  dosadas pelo método da hidrólise do *p*NPP aquoso.

Para verificar a reprodutibilidade do método, a enzima foi imobilizada por SPIL, em uma escala de produção em 10 Erlenmeyers (500 mL) nas seguintes condições: adição do suporte ao meio de cultivo entre 12 a 20 h ( $10 \text{ g/L}$ ) com 1% de óleo. A atividade da enzima

imobilizada variou entre 2,3 e 2,8 U.mg<sup>-1</sup> de suporte. Este resultado pode ser considerado bom, em se tratando de processos fermentativos.

#### **5.4. Estudos de Utilização da Enzima em Biocatálise em Solventes Orgânicos**

##### ***5.4.1. Efeito da Temperatura na Estabilidade em Solventes Orgânicos da Lipase Livre e***

##### ***Imobilizada***

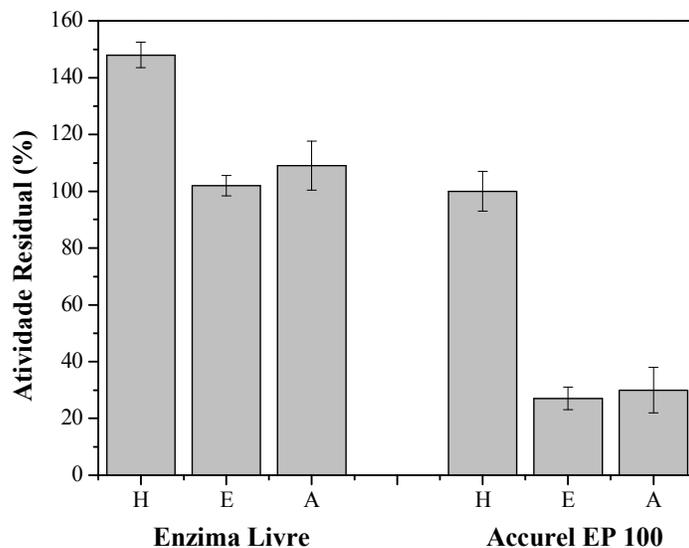
Para este estudo a enzima foi imobilizada pelo processo SPIL com adição do suporte após 12 h de cultivo, 20 g.L<sup>-1</sup> de suporte e meio de cultivo contendo 1% de óleo de oliva.

Antes de se iniciar as reações de biocatálise em meios de solventes orgânicos, foi necessário testar a estabilidade da enzima livre e imobilizada em solventes com polaridades diferentes (*n*-heptano log P 4,0, etanol log P -0,24 e acetonitrila log P -0,33), para iniciar-se os testes das reações de síntese em meios reacionais onde a enzima fosse estável. Para isto, nesta etapa estudou-se conjuntamente a estabilidade da enzima livre e imobilizada em Accurel EP 100 em etanol, acetonitrila e *n*-heptano em duas diferentes temperaturas (37 °C e 50 °C) com 3 h de incubação.

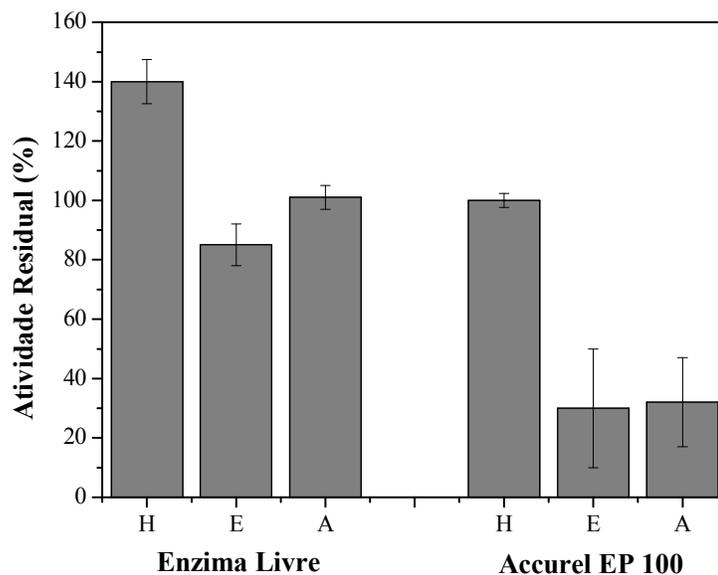
Verificou-se (Figuras 32 e 33) que a enzima livre apresentou uma ativação em *n*-heptano (148 % ± 4,5, 37°C e 140% ± 7,5 a 50 °C) e manteve sua atividade em quase todos outros solventes estudados em ambas as temperaturas, exceto quando incubada em etanol a 50 °C (85 ± 7% de atividade residual). Estes resultados mostram que se pode utilizar a enzima livre em temperaturas relativamente altas, tanto em solventes hidrofóbicos quanto em solventes hidrofílicos.

Por outro lado, a enzima imobilizada em Accurel EP 100 foi estável apenas quando incubada em *n*-heptano, sendo muito menos estável em etanol (27 ± 4 %, 37°C e 30 ± 20 % a 50 °C) e acetonitrila (30 ± 8 %, 37°C e 32 ± 15 % a 50 °C). Apesar da enzima livre ter sido

mais estável nos solventes orgânicos utilizados, a forma imobilizada apresenta a vantagem de poder ser reutilizada e devido a isto, continuou-se a utilizá-la nos experimentos subsequentes.



**Figura 32.** Estabilidade a 37 °C da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 livre (extrato bruto liofilizado) e imobilizada em Accurel EP 100 em solventes polares e apolares. Condições: O biocatalisador foi incubado por 3 h (em banho termostatizado), em *n*-heptano (H), etanol (E) e acetonitrila (A).



**Figura 33.** Estabilidade a 50 °C da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 livre (extrato bruto liofilizado) e imobilizada em Accurel EP 100 e HDL-L em solventes polares e apolares. Condições: O biocatalisador foi incubado por 3 h (em banho termostatizado), em *n*-heptano (H), etanol (E) e acetonitrila (A).

Estes resultados não estão de acordo com a literatura em geral, pois, em muitos casos, a imobilização promove maior estabilidade de lipases frente a alguns solventes orgânicos e à temperatura (Liu e Chang, 2008; Santos et al., 2008; Vaidya e Singhaul, 2008; Wu et al., 2007). No caso do presente trabalho pode ter havido uma adsorção seletiva da enzima que está aderida ao suporte, o que poderia torná-la mais acessível ao solvente orgânico, causando a sua desnaturação. Além disso, a maior atividade residual encontrada para a enzima livre, principalmente em *n*-heptano, pode ser resultado do rompimento dos agregados de alto peso molecular, tornando um maior número de sítios ativos da enzima acessíveis ao substrato. Entretanto uma comparação com os resultados aqui obtidos torna-se difícil, pois poucos artigos encontrados na literatura comparam a estabilidade da enzima (livre e imobilizada) em solventes orgânicos. Nos artigos encontrados, estuda-se: (a) separadamente a estabilidade da enzima imobilizada à temperatura em meio aquoso e a estabilidade em solventes orgânicos em uma determinada temperatura; (b) no caso da estabilidade em solventes é comum encontrar somente a comparação da estabilidade em diferentes solventes da enzima imobilizada em relação à estabilidade em meio aquoso (não se estuda a estabilidade da enzima livre). Para o primeiro caso (a), pode-se citar a estabilidade da lipase de *Arthrobacter* sp imobilizada por adsorção em um polímero parcialmente hidrofóbico GMA-EGDM 75-30 [poli(glicidil metacrilato-*co*-etileno dimetacrilato)]. Esta enzima apresentou, no estudo da estabilidade à temperatura (em meio aquoso), 20% de atividade residual a 60 °C, enquanto a enzima livre não apresentou atividade nesta temperatura. Com relação à estabilidade em solventes, a enzima foi incubada por 48 h a 25 °C em solventes hidrofóbicos e hidrofílicos e a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade quando comparada à forma livre em todos os solventes estudados (Bhushan et al., 2008).

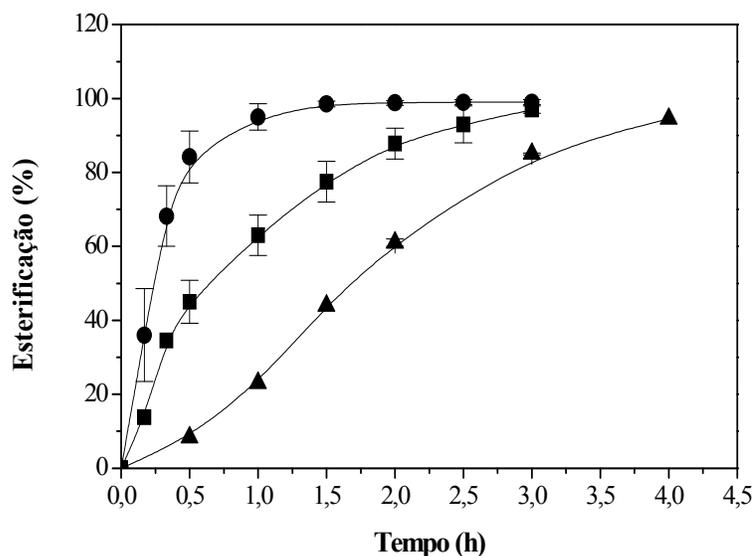
No segundo caso (b), pode-se observar a estabilidade em solventes orgânicos da lipase de *Bacillus coagulans* BTS-3, imobilizada por ligação covalente em Nylon-6. A enzima foi incubada por 30 min a 55°C e apresentou boa estabilidade em presença do *n*-heptano (156%), clorofórmio (115%) e isopropanol (106%), mas foi pouco estável em presença de etanol (44%), acetona (15,8%) e *n*-hexano (10,8%) (Pahujani et al., 2008). Estudo semelhante foi realizado por Wu et al. (2007), que imobilizaram por adsorção a lipase de *Mucor javanicus* em Amberlite XAD-7 (resina acrílica de polaridade moderada). A maior estabilidade foi observada com a acetona (246,5%) seguido do isopropanol (193%), a enzima foi pouco ativa em metanol (10%) e não apresentou atividade em DMSO (dimetilsulfóxido) e DMF (dimetilformamida).

#### **5.4.2. Reações de Síntese em Meios Aquo-Restritos**

As lipases de *B. cepacia* na forma livre (liofilizada) e imobilizada foram testadas em diferentes reações em meios de solvente orgânico. Para tanto, fizeram-se controles para todos os testes, a saber: para a enzima livre, o controle foi realizado com a enzima desnaturada e adicionada ao meio reacional; para a enzima imobilizada, adicionaram-se os suportes sem enzima e com a enzima imobilizada e desnaturada. Para estes controles, todos os resultados foram negativos, ou seja, não houve reação.

##### **5.4.2.1. Esterificação do Ácido Oléico com Etanol Utilizando a Enzima Livre e Imobilizada**

A cinética de síntese do oleato de etila em *n*-heptano e em meio livre de solvente, onde os solventes são os substratos da reação, foi investigada para comparação da eficiência catalítica da enzima livre, imobilizada de forma convencional e na forma SPIL (Figura 34).



**Figura 34.** Cinética da síntese do oleato de etila a 37 °C em *n*-heptano, catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 livre (90 U.mL<sup>-1</sup> do meio reacional) (▲), imobilizada de forma convencional (90 U.mL<sup>-1</sup> do meio reacional, 450 mg de suporte) (■) e por SPIL (250 U.mL<sup>-1</sup> do meio reacional, 450 mg de suporte) (●); razão molar 1:3 (ácido/álcool).

Observa-se que o melhor resultado (95 ± 3,6% de conversão em éster, 1 h) foi obtido quando se utilizou a enzima imobilizada por SPIL. Isto pode ser explicado pela maior atividade específica de esterificação, calculada a partir das velocidades iniciais da reação, para a enzima imobilizada por SPIL, que foi de três e quatorze vezes maior, se comparada à imobilizada de forma convencional e à enzima livre, respectivamente (Tabela 17). Os resultados de atividade específica de esterificação mostram que, no caso da enzima imobilizada por SPIL, a imobilização foi mais seletiva para as lipases do que no caso da imobilização convencional. É provável que, além de ter imobilizado prioritariamente as lipases, para o caso da enzima imobilizada por SPIL a distribuição da enzima possa ter ocorrido de maneira a favorecer a interação enzima-substrato, diminuindo os efeitos difusionais e aumentando a velocidade inicial da reação. Com relação à melhor eficiência catalítica da enzima imobilizada em comparação à livre, este resultado é comum para lipases e provavelmente envolve dois fatores: (a) as interações entre a enzima e o suporte podem

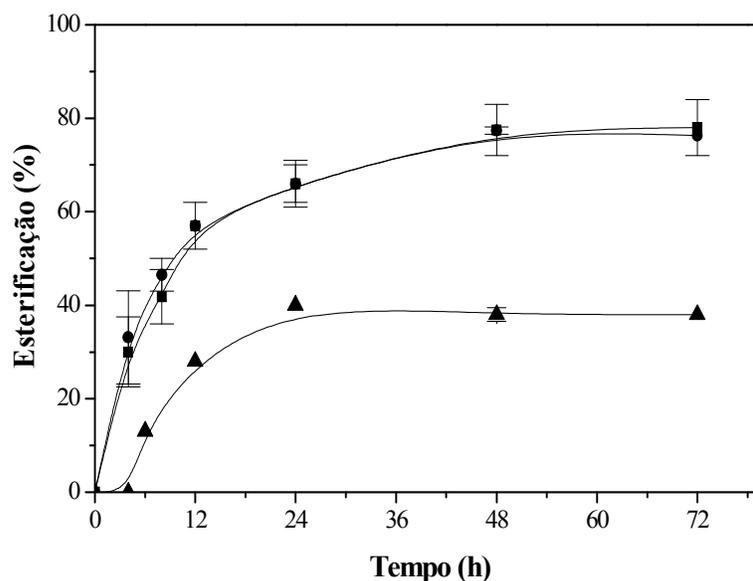
promover a desagregação da enzima, o que aumenta o número de moléculas de enzima disponíveis para catálise ou (b) a imobilização em suportes hidrofóbicos pode favorecer a catálise devido às interações entre o suporte e a enzima, que mantêm aberta a “tampa” hidrofóbica situada sobre o sítio catalítico das lipases, facilitando o acesso do substrato ao sítio catalítico (Petkar et al., 2006).

**Tabela 17.** Atividade de esterificação da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada e livre.

	Enzima imobilizada por SPIL	Enzima imobilizada convencional	Enzima livre
$A_{\text{esp}}$ (U.mg <sup>-1</sup> de proteína)	2,3	1,0	0,16
A (U.mg <sup>-1</sup> de suporte ou pó*)	0,025	0,008	0,007
[P] (mg de P/g de suporte ou pó)	10,6 ± 0,9	8,1 ± 0,1	45 ± 0,3
Quantidade de suporte ou pó (g) utilizada na reação	0,45	0,45	0,23

A= atividade de esterificação;\*enzima livre; [P]= concentração de proteína por Smith (1985) para a enzima imobilizada e Bradford (1976) para a enzima livre.

Um aspecto importante em biocatálise em solventes orgânicos é a eliminação de solventes que não são substratos da reação, visando à diminuição de custos do processo. Neste trabalho, quando o *n*-heptano foi eliminado do meio reacional, e os substratos etanol e ácido graxo passaram a ser os únicos solventes (Figura 35), as porcentagens máximas de esterificação foram menores do que as obtidas em presença de *n*-heptano, e ocorreram em um tempo muito maior: 77,5 ± 5,5% e 77,4 ± 0,8%, respectivamente para as duas preparações imobilizadas pelo processo convencional e por SPIL e de apenas 38 ± 1% para a enzima livre, após 48 h de reação.



**Figura 35.** Cinética da síntese do oleato de etila a 37 °C em ambiente livre de *n*-heptano, catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 livre (90 U.mL<sup>-1</sup> do meio reacional) (▲), imobilizada de forma convencional (90 U.mL<sup>-1</sup> do meio reacional, 450 mg de suporte) (■) e por SPIL (250 U.mL<sup>-1</sup> do meio reacional, 450 mg de suporte) (●).

Estes resultados podem ser atribuídos à desnaturação da enzima pelo etanol, uma vez que alguns autores citam que a utilização de solventes polares pode diminuir a atividade catalítica da enzima devido à interação solvente-enzima, que altera a conformação nativa da proteína pela ruptura das ligações de hidrogênio. Outra possibilidade seria pela interação direta com a água essencial em torno da molécula da enzima, pois solventes polares são capazes de absorver água e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação (Lima et al., 2004; Simon et al., 1998).

A síntese do oleato de etila sem o co-solvente foi estudada por alguns pesquisadores. Por exemplo, Foresti e Ferreira (2007) obtiveram conversão máxima de 75% em 24 h usando 50 mg (26 U) de lipase de *C. antartica* B (CAL-B) imobilizada sobre quitosana. Os mesmos autores (2005) realizaram a esterificação usando a CAL-B imobilizada em polipropileno (23 m<sup>2</sup>/g), e obtiveram conversão de 78,6% em 7h utilizando 300 mg de enzima (1800 U).

Ésteres alquílicos diferentes do oleato de etila, mas sintetizados sem co-solvente também são reportados. A síntese do valerato de etila e do acetato de *n*-hexila foi obtida com conversão máxima de 51% (200 U) e 41% (100U), respectivamente, usando a lipase de *Staphylococcus simulans* imobilizada em CaCO<sub>3</sub> (Karra-Châabouni et al., 2006) após 72 h.

Laudani et al. (2006) compararam a síntese do oleato de octila em presença e ausência de *n*-hexano, utilizando 750 mg da Lipozyme RM IM (Novozym) imobilizada em resina de troca aniônica. As conversões foram de 84 (livre de solvente) e 83% em 7 h, respectivamente. Para este estudo não houve diferenças significativas na conversão do éster, pois os substratos empregados possuem baixa polaridade e tendem a não ser desnaturantes.

Com relação a estudos comparativos usando enzimas imobilizadas e livres, a literatura destaca que os melhores resultados são obtidos normalmente com a enzima imobilizada. Ghamgui et al. (2007) estudaram a esterificação do oleato de etila (somente com o etanol como solvente) usando a lipase *Rhizopus oryzae* livre e imobilizada em CaCO<sub>3</sub>. A conversão em éster foi de 6 e 83% respectivamente em 48 h e com 300 U de enzima. Já Sebrão et al. (2007) usaram sete tipos de lipases (livre e imobilizadas filme de caseinato de sódio/glicerol) como catalisadores na esterificação do oleato de *n*-pentila (24 h) e nem todas as enzimas imobilizadas foram mais eficientes que as livres. Das lipases empregadas, a lipase de *A. niger* não apresentou atividade em meio orgânico. As lipases de *T. lanuginosus* e *R. oryzae* foram mais ativas após a imobilização, apresentando conversões de 38 e 13%, respectivamente, antes da imobilização e 45 e 41%, respectivamente, após a imobilização. Com a lipase de *Pseudomonas* sp., não houve mudanças significativas na formação do éster usando a enzima livre ou imobilizada (63% antes e 66% de conversão após a imobilização). As lipases de *M. miehei* e *C. rugosa* perderam atividade após a imobilização, sendo a conversão em éster de 41 e 43% respectivamente antes da imobilização, e 13 e 11%, respectivamente, após a imobilização.

Comparando os resultados deste trabalho com os encontrados em literatura e considerando que a enzima não é comercial, as conversões, especialmente com a enzima imobilizada, podem ser consideradas altas,  $95 \pm 3,6\%$  de éster em 1 h para o sistema com *n*-heptano e 77% de éster em 48 h para o sistema contendo somente etanol como solvente.

Verifica-se ainda que a estabilidade da *B. cepacia* foi muito boa especialmente no sistema contendo etanol como solvente, cuja razão molar álcool:ácido foi extremamente alta (RM: 245). Maiores conversões no sistema sem co-solvente poderiam ser esperadas com a alteração das razões molares de álcool e ácido oléico.

Além disso, os resultados aqui apresentados são interessantes, pois mostram que a enzima imobilizada pelo processo SPIL é tanto ou mais eficiente do que a enzima imobilizada pelo processo convencional, dependendo da presença do co-solvente, neste caso, o *n*-heptano. Finalmente, as duas preparações enzimáticas imobilizadas se mostraram mais eficientes do que a enzima livre nas reações de esterificação do ácido oléico e etanol, indicando que a imobilização da *B. cepacia* em Accurel favorece na minimização dos fatores custo e estabilidade, que limitam a utilização destes biocatalisadores em geral.

#### **5.4.2.2. Determinação da Regiosseletividade e Tiposseletividade**

O objetivo desta etapa foi estudar a atividade biocatalítica da enzima imobilizada pelo processo SPIL com relação à sua seletividade de ação, regiosseletividade e tiposseletividade (ação em diferentes cadeias carbônicas), utilizando diferentes substratos em meio contendo *n*-heptano. A determinação destas características pode definir o tipo de aplicação das lipases: por exemplo, para a produção de lipídeos estruturados são requeridas lipases com especificidade 1,3. Sabe-se, com efeito, que as propriedades nutritivas e funcionais são determinadas, não somente pela composição dos ácidos graxos utilizados, mas igualmente pela distribuição espacial destes ácidos graxos sobre o esqueleto do triglicerídeo.

A literatura reporta que lipases de *B. cepacia* (Kaieda et al., 2001) não são, em geral, regioespecíficas, podendo hidrolisar a ligação éster nas três posições do triacilglicerol. Entretanto, como a cepa produtora da lipase utilizada no presente trabalho é uma cepa selvagem, sua regioesletividade poderia ser diferente da reportada em literatura. Além disso, a imobilização da enzima poderia levar a uma modificação na seletividade da enzima. Por isso, a regioesletividade da lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada foi determinada através da reação de hidrólise da trioleína em meio aquo-restrito (contendo *n*-heptano com 0,5% de água v/v).

Os resultados mostraram que o conteúdo relativo (em 15 min de reação) foi de aproximadamente 4% para os produtos de hidrólise 1,2-DAG, 2,3-DAG e de 3% para o 1,3-DAG (Tabela 18). Este resultado indica que a ligação éster foi hidrolisada nas três posições do triacilglicerol, confirmando a ausência de especificidade da lipase de *B. cepacia* LTEB11.

**Tabela 18.** Produtos da hidrólise da trioleína catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100.

Produtos de hidrólise	Conteúdo relativo (%)
AGL	2,5 ±0,16
DAG 1,2 e 2,3	4,0 ±0,44
DAG 1,3	3,0 ±0,05
MAG	0,9 ±0,06

Sendo: AGL; ácidos graxos livres; DAG: diacilgliceróis; MAG: monoacilgliceróis. Condições: 30 mg de enzima, 10 mL de *n*-heptano, 0,5% de água (v/v), 0,56 mmol de trioleína, 37 °C, 15 min.

Com relação à tiposseletividade, avaliou-se a especificidade da enzima quanto ao tamanho da cadeia carbônica, através de reações de interesterificação entre a tricaprilina (TC8:0) e TAGs contendo resíduos acílicos saturados de 4 a 18 carbonos, e quanto as insaturações da cadeia. Com relação à insaturação, a tiposseletividade foi avaliada através de

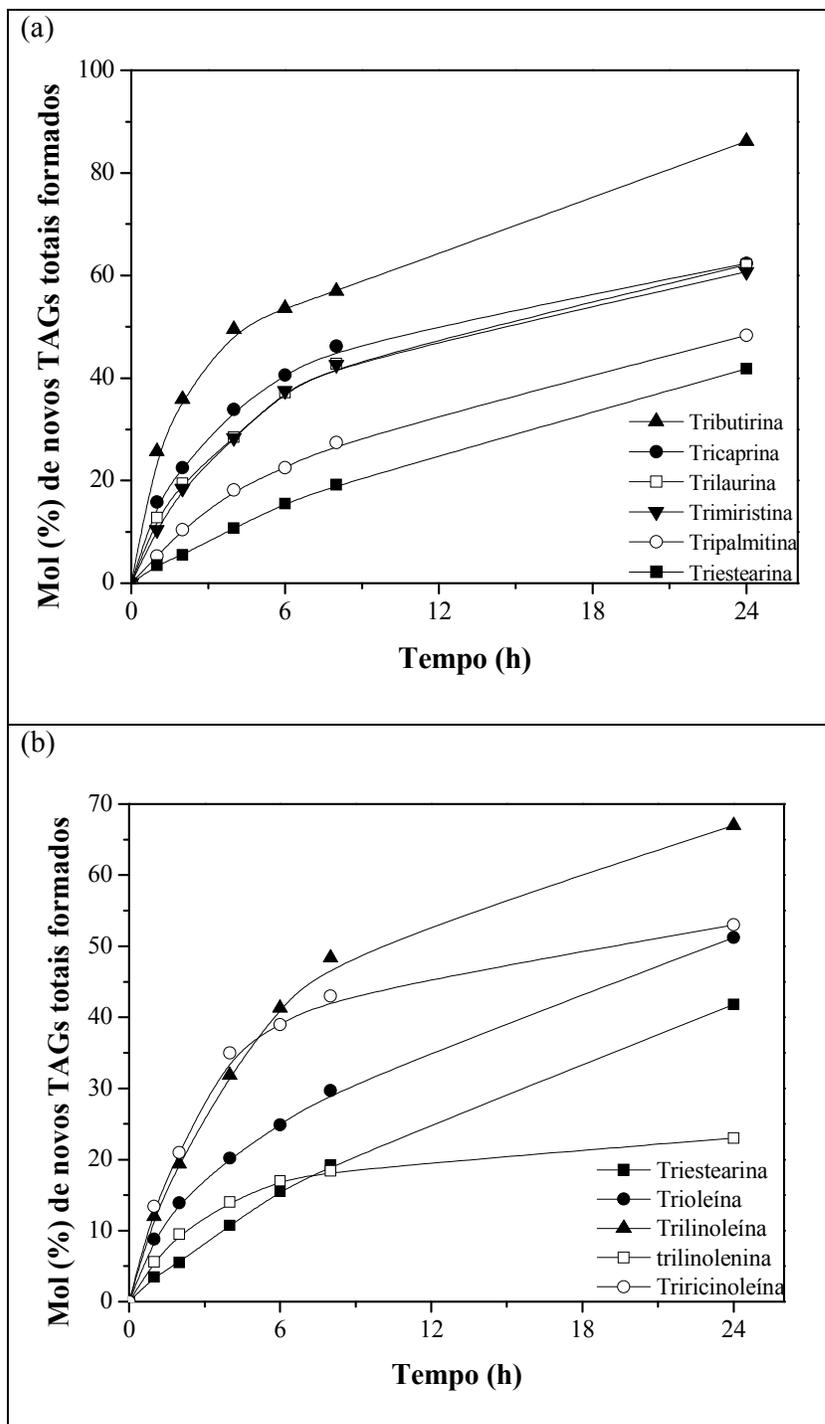
reações de interesterificação entre a tricaprilina (TC8:0) e TAGs C18 com 0 a 3 insaturações (item 4.10.3./b). Os resultados (Tabela 19 e Figura 36a) mostraram que a eficiência catalítica aumentou com a diminuição da cadeia carbônica, sendo a porcentagem de interesterificação e a atividade específica, calculadas a partir das velocidades iniciais da reação, maiores para a tributirina (TC4:0) (2880 U.mg<sup>-1</sup> e 86% respectivamente) e menores para a triestearina (TC18:0) (368 U.mg<sup>-1</sup> e 40%).

**Tabela 19.** Atividade de interesterificação da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Formação de TAGs na interesterificação entre tricaprilina (TC8:0) com (a) série homóloga de TAGs saturados e (b) insaturados para TC18 (0 a 3 insaturações)

	Reação	Atividade de Interesterificação	
		U.mg <sup>-1</sup> de suporte	U.mg <sup>-1</sup> de proteína
Cadeias Saturadas	TC 8:0 + TC 4:0	72	2880
	TC 8:0 + TC 10:0	24	952
	TC 8:0 + TC 12:0	21	840
	TC 8:0 + TC 14:0	21	840
	TC 8:0 + TC 16:0	14	544
Cadeias Insaturadas	TC 8:0 + TC 18:0	9,2	368
	TC 8:0 + TC 18:1 $\Delta^9$	13	504
	TC 8:0 + TC 18:1 $\Delta^9$ (OH)*	29	1144
	TC 8:0 + TC 18:2 $\Delta^{9,12}$	26	1056
	TC 8:0 + TC 18:3 $\Delta^{9,12,15}$	11	432

\*sendo: (OH) presente no carbono 12.

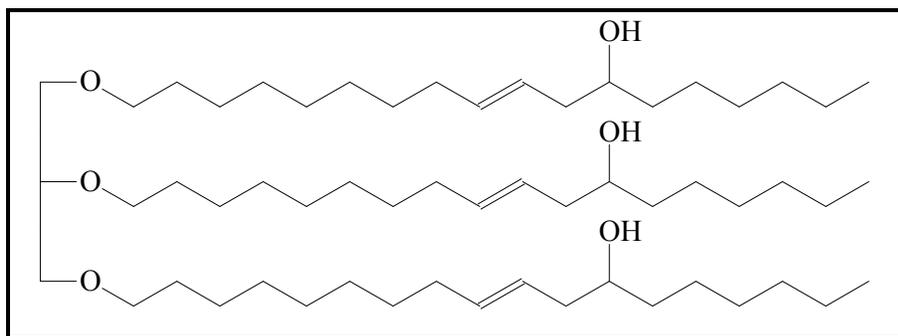
Quando se avaliou o efeito da insaturação da cadeia, a atividade específica da enzima (Figura 36b) diminuiu com o aumento do número de insaturações na cadeia: foi maior e praticamente igual para a tricilinoleína [TC18:1  $\Delta^9$  (OH)] (1144 U.mg<sup>-1</sup>) e trilinoleína (TC 18:2  $\Delta^{9,12}$ ) (1056 U.mg<sup>-1</sup>) e menor para a trilinolenina (TC 18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) (432 U.mg<sup>-1</sup>) (Tabela 19).



**Figura 36.** Cinética de transferência de grupos acila catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Formação de TAGs totais na interesterificação entre tricaprilina (TC8:0) com (a) série homóloga de TAGs saturados e (b) insaturados para TC18 (0 a 3 insaturações). Conversão determinada por cromatografia gasosa.

Quando se avaliou a porcentagem de interesterificação em 24 h, o maior rendimento foi obtido com a trilinoleína (TC 18:2  $\Delta^{9,12}$ ) (67%), observando-se uma diminuição da

eficiência catalítica para a reação contendo triricinoleína [C18:1  $\Delta^9$  (OH)] após 8 h de reação, com rendimento de 53% após 24 h. Este resultado pode ser explicado pela presença do grupo hidroxila no carbono 12 na estrutura da triricinoleína, que pode ter proporcionado desnaturação da enzima (Figura 37).



**Figura 37.** Representação estrutural da triricinoleína.

Outras lipases apresentaram comportamento semelhante ao da lipase deste trabalho. Caro et al. (2000), por exemplo, utilizaram o extrato lipolítico de *Carica papaya* em reações de transesterificação entre a tributirina e TAGs de uma série homóloga e os resultados mostraram que o rendimento para a formação de novos TAGs diminuiu com o aumento da cadeia carbônica do TAG. Cambon et al. (2008) realizaram reações de hidrólise, interesterificação de TAGs e de transesterificação (acidólise, ácido graxo com TAG), com um extrato lipolítico de *Carica pentagona*. Nas reações de hidrólise, houve preferência pela tributirina e nas reações de interesterificação e acidólise a eficiência catalítica diminuiu com o aumento da cadeia carbônica do TAG (para a série dos TAGs saturados) e aumentou com o aumento das insaturações (para a série dos TAGs insaturados). Para o último caso, a eficiência catalítica foi muito semelhante para as reações contendo a trilinoleína ou a trilinolenina.

Estes resultados mostraram que foi possível utilizar a lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada em reações de interesterificação. Entretanto, devido a não regiosseletividade da enzima, a aplicação para modificação de óleos e gorduras na área nutricional deixa de ser

interessante, pois não é possível predeterminar aonde ocorrerá a modificação. Por outro lado, conhecendo a tiposeletividade da enzima, é possível prever em qual tipo de reação ela será mais ativa. Após observar a alta eficiência catalítica da lipase de *B. cepacia* imobilizada em Accurel EP 100 na reação entre a tricaprilina e a triricinoleína, principal componente do óleo de mamona, decidiu-se testar a lipase na produção de ésteres componentes do biodiesel de óleo de mamona através de reações de transesterificação (alcóólise).

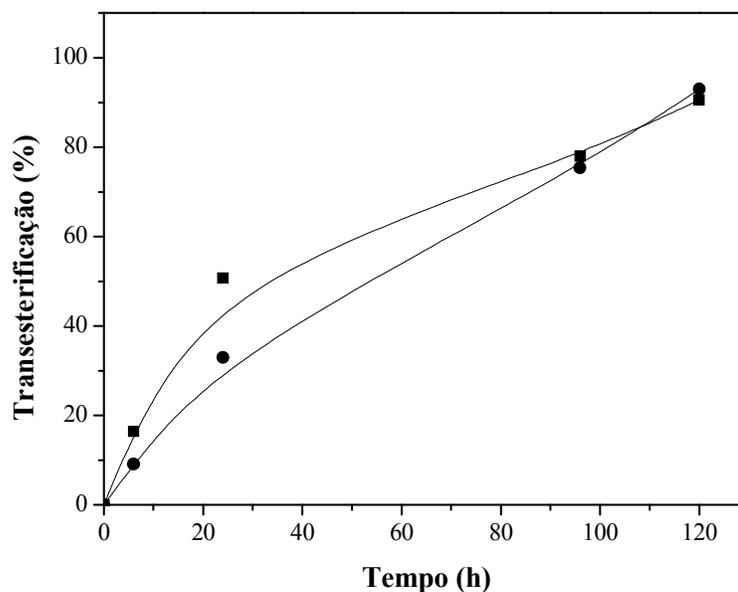
#### **5.4.2.3. Aplicação da Lipase Imobilizada em Reações de Transesterificação**

A finalidade desta etapa do trabalho foi de verificar a possibilidade de catálise da lipase de *B. cepacia* imobilizada em Accurel EP 100 na reação de transesterificação do óleo de mamona por meio de alcóólise (metanólise e etanólise, sem co-solvente). O óleo de mamona é interessante sob o ponto de vista econômico e em termos de possuir um triacilglicerol de cadeia longa (87 a 90% de triricinoleína), com características únicas como alta densidade (0,97 mg/mL), alta viscosidade e presença de hidroxila (no carbono 12) na cadeia carbônica que compõe o triacilglicerol. É o único triacilglicerol de cadeia longa totalmente solúvel em etanol em qualquer proporção. Por isso, a transesterificação deste óleo tem produzido ésteres com diferentes aplicações, incluindo surfactantes, germicidas, aditivos em cosméticos e componentes do biodiesel (Yang et al., 2005; Veit, 2004).

Os resultados mostraram (Figura 38) que, no início da reação (24 h), a conversão em éster foi maior para a reação de metanólise (51%) que para a etanólise (33%) do óleo de mamona. Entretanto, a partir de 92 h, o rendimento para ambas as reações foi praticamente o mesmo, com a percentagem máxima de conversão em éster de 93 e 90% em 120 h.

A partir dos resultados obtidos nestes experimentos, decidiu-se otimizar somente a etanólise do óleo de mamona, devido à toxicidade do metanol e além disso o etanol é produzido em maior escala no Brasil em comparação ao outro álcool. Alguns parâmetros

foram estudados, a saber: atividade de água do biocatalisador ( $a_w$ : 0,19; 0,22; 0,29; 0,44; 0,68), quantidade de enzima (100, 200, 300 e 400 U), razão molar (óleo:álcool 1:3; 1:6; 1:9; 1:12), temperatura (30, 45 °C) e adição do etanol em duas etapas.



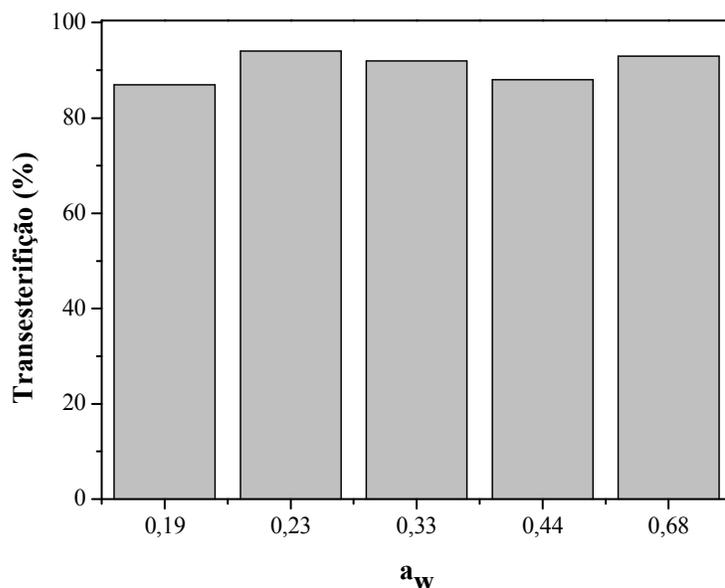
**Figura 38.** Transesterificação do óleo de mamona catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: etanolise (●) e metanolise (■). Condições: razão molar 1:3 óleo (3 mmol):álcool (9 mmol), 30 mg de enzima imobilizada, 45°C, 300 rpm. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.

#### 5.4.2.3.1. Efeito da Atividade de Água ( $a_w$ )

A quantidade de água, dosada muitas vezes pela atividade de água ( $a_w$ ) no sistema, é um dos parâmetros mais importantes para se conseguir uma reação com altos rendimentos dos produtos. A atividade de água é influenciada fortemente pelo nível de hidratação da enzima, que, conseqüentemente, afeta a sua eficiência catalítica (Rahman et al., 2008). A atividade de água pode ser controlada somente na enzima, ou em todo o sistema reacional. Decidiu-se controlar a atividade de água somente da enzima, pois para controlar o equilíbrio entre a

hidrólise e as reações da síntese, é mais importante monitorar o microambiente aquoso do biocatalisador (Cambon et al., 2006).

No estudo do controle de atividade de água inicial ( $a_w$ ) (Figura 39) nota-se que houve pouca diferença na porcentagem de conversão em éster com a alteração da  $a_w$ . Em todos os valores de  $a_w$  estudados obteve-se aproximadamente 90% de conversão em éster (24 h).



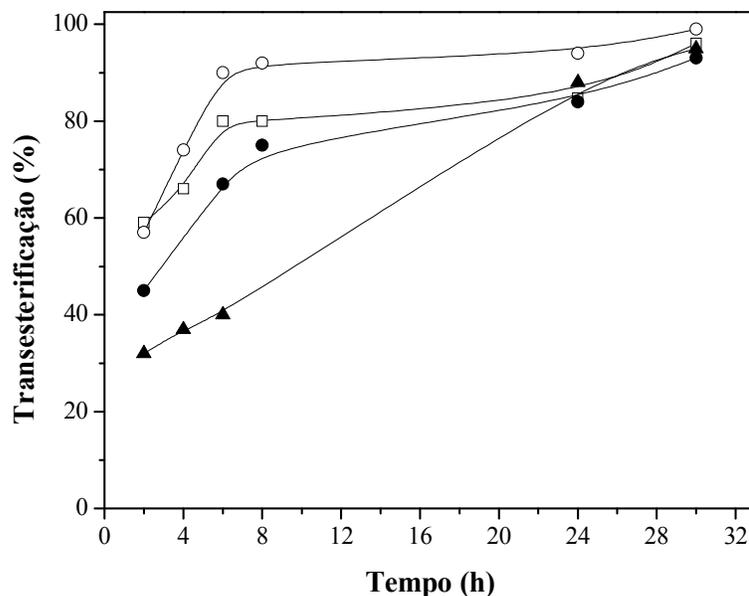
**Figura 39.** Estudo da influência da atividade de água ( $a_w$ ) da enzima na etanolise do óleo de mamona catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Condições: razão molar 1:3 óleo (3 mmol):álcool (9 mmol), 30 mg de enzima imobilizada, 45°C, 300 rpm, 24 h. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.

No caso deste trabalho, já era esperado que a  $a_w$  tivesse pouca influência no rendimento da reação de transesterificação, pois estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram que a produção do oleato de etila catalisada pela lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100 sofreu pouca influência com a variação da  $a_w$  (controlada tanto na enzima como no meio reacional). Este comportamento foi provavelmente devido a alta hidrofobicidade (ou seja, baixa absorção de água) do suporte empregado para a imobilização, constatada por análises termogravimétricas na enzima imobilizada: para os

valores de  $a_w$  de 0,12; 0,54 e 0,96, a quantidade de água absorvida pela enzima imobilizada foi de 1,8; 2,4 e 5,4 % respectivamente (Salum et al., 2008).

#### 5.4.2.3.2. Efeito da Concentração da Enzima

Os resultados mostraram que, em até 8 h de reação, a porcentagem de transesterificação aumentou com o aumento da concentração da enzima, obtendo-se 90% de conversão em éster com a maior quantidade da enzima (150 mg, 400 U). Em 28 h, as diferenças entre os ensaios foram menores, com porcentagens de transesterificação variando entre 94 a 98% para as concentrações de enzima estudadas (Figura 40).



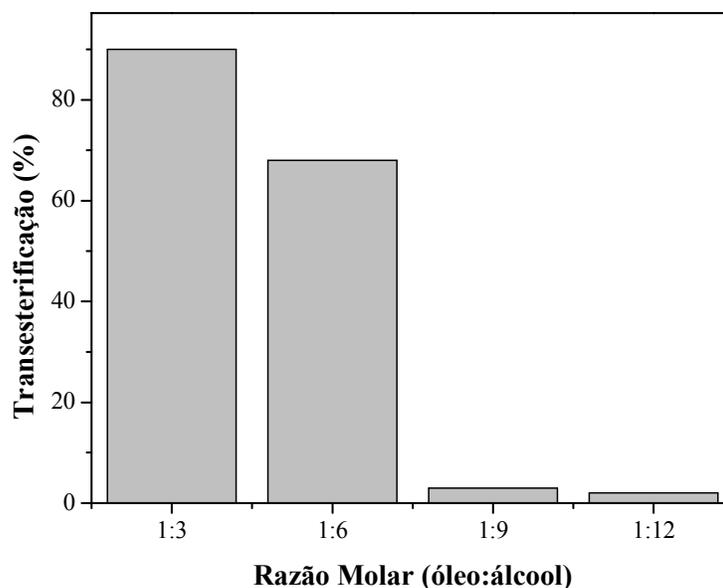
**Figura 40.** Efeito da concentração enzimática na reação de etanolise do óleo de mamona catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: (▲) 100, (●) 200, (□) 300, (○) 400 U totais. Condições: razão molar 1:3 óleo(3 mmol):álcool (9 mmol), 45°C, 300 rpm. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.

Devido a dificuldades de homogeneização do meio quando se utilizava a quantidade máxima de enzima (150 mg), não foi possível aumentar ainda mais a quantidade de enzima no

meio reacional. Para as reações posteriores manteve-se a quantidade da enzima em 150 mg de enzima (400 U).

#### 5.4.2.3.3. Efeito da Razão Molar (óleo:álcool)

O estudo do efeito da razão molar na etanólise do óleo de mamona catalisada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada em Accurel EP 100 mostrou que a porcentagem de transesterificação diminuiu com o aumento da razão molar. Em 8 h de reação (Figura 41), o rendimento de transesterificação diminuiu de 90 a 2% quando a razão molar aumentou de 1:3 a 1:12.



**Figura 41.** Efeito da razão molar na reação de etanólise do óleo de mamona catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: 400 U totais de enzima, 45°C, 300 rpm, 8 h. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.

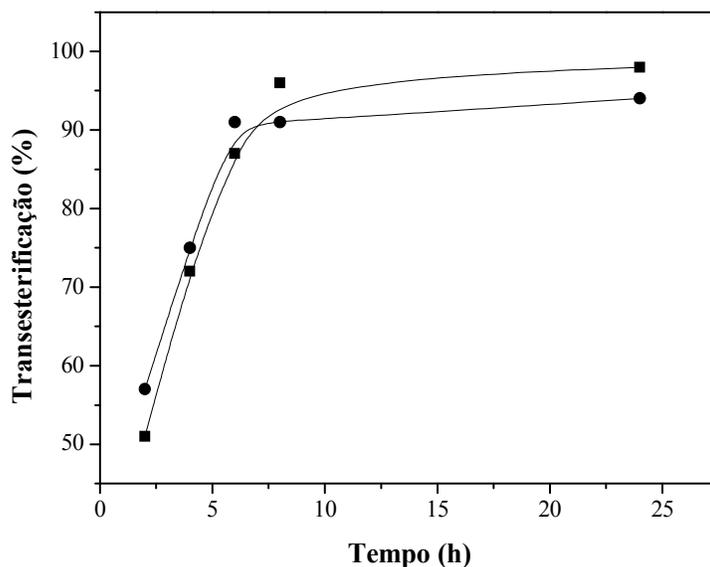
Este resultado pode ser facilmente explicado pelo efeito desnaturante do aumento da concentração do álcool no sistema. Além disso, a baixa razão molar pode ser considerada como uma vantagem na utilização de enzimas como catalisadores, sob o ponto de vista

econômico, pois não há desperdício de reagentes. As reações seguintes foram continuadas com razão molar óleo:álcool 1:3.

#### 5.4.2.3.4. Efeito da Temperatura

A temperatura é um parâmetro importante na catálise enzimática. Altas temperaturas podem aumentar a velocidade das reações, mas também podem favorecer a desnaturação da enzima (Nie et al., 2006).

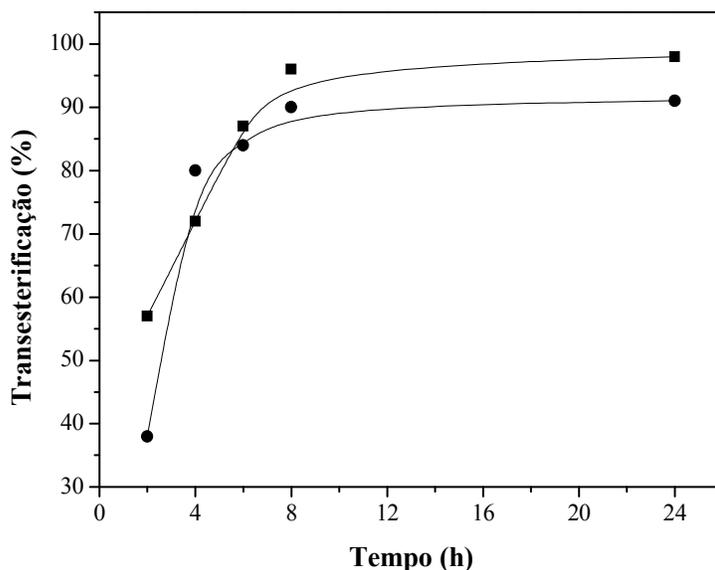
O efeito da temperatura (30 e 45 °C) na etanólise do óleo de mamona está mostrado na Figura 42. A 30 °C, o rendimento da reação foi ligeiramente superior (conversão em éster de 96%) quando comparado à reação realizada a 45 °C (conversão em éster de 90%). O resultado desta etapa do trabalho pode ser considerado interessante sob o ponto de vista econômico, pois permite que a reação seja realizada em regiões cuja temperatura ambiente se mantenha próxima a 30 °C, sem a necessidade de aquecimento do sistema reacional durante o dia.



**Figura 42.** Efeito da temperatura na reação de etanólise do óleo de mamona catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: razão molar 1:3 óleo(3 mmol):álcool (9 mmol), 400 U totais de enzima, 300 rpm, (■) 30 °C, (●) 45 °C. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.

#### 5.4.2.3.5. Adição do Etanol em duas Etapas

Considerando a temperatura de 30 °C, estudou-se o efeito da adição do álcool em etapas, procedimento comumente relatado na literatura como uma forma de minimizar os efeitos de desnaturação da enzima pelo álcool (Lu et al., 2007). Neste trabalho, comparou-se a adição em uma e em duas etapas. No segundo caso, adicionou-se metade da quantidade (1,5 mmol ou 262,5 µL) no início da reação e a outra metade após 4 h de reação. Os resultados mostraram que a adição em duas etapas levou a um menor rendimento (90% em 8 h e 91% em 24 h) na transesterificação, quando comparada à reação realizada com a adição do etanol em apenas uma etapa (96% em 8 h e 98% em 24 h) (Figura 43). Este resultado é importante, pois torna-se atrativo do ponto de vista econômico, visto que a adição do álcool em somente uma etapa é mais simples.



**Figura 43.** Efeito da adição do etanol em (■) uma e (●) duas etapas na reação de etanolise do óleo de mamona catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP 100. Sendo: razão molar 1:3 óleo (3 mmol):álcool (9 mmol), 400 U totais de enzima, 300 rpm, 30 °C. Reações em duplicata determinadas por cromatografia gasosa.

A partir destes resultados, levando-se em consideração aos parâmetros estudados, as condições otimizadas (rendimento de 96% de transesterificação em 8 h de reação) para a etanolise do óleo de mamona foram: sistema sem controle da  $a_w$ , 150 mg de enzima (400 U),

razão molar óleo:álcool 1:3 (3 mmol de óleo e 9 mmol de álcool), temperatura de 30 °C e adição do etanol em uma etapa.

#### 5.4.2.3.6. Discussão dos Resultados Referentes ao Estudo de Transesterificação

Considerando os resultados de transesterificação deste trabalho e os encontrados na literatura consultada, a comparação entre trabalhos deve ser feita com cautela, pois as condições, bem como as enzimas imobilizadas não são as mesmas. Entretanto, algumas comparações podem ser feitas.

A metanólise do óleo de mamona foi realizada por Yang et al. (2005) que empregaram a lipase de *C. antartica* (Novozym 435) sem adição de co-solvente. A maior conversão em éster foi de 97% (24 h), a 50 °C e utilizando razão molar álcool:óleo (RM) 6. Já Oliveira et al. (2004) empregaram a Novozym 435 e a Lipozyme IM para catalisar a etanólise do óleo de mamona, também sem co-solvente, e as maiores conversões foram obtidas para a Lipozyme IM (98%) a 65 °C, RM 3 e 20% de enzima (m/m, com relação ao óleo). Quando se utilizou a Novozym, obteve-se 81,4% de ésteres, a 65 °C, RM 10 e 20% de enzima.

Com relação ao tipo de álcool usado na transesterificação, Tamalampudi et al. (2008) estudaram diferentes álcoois (metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol) para a produção de ésteres do biodiesel a partir do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*), catalisada pelas lipases de *Candida antartica* B imobilizada (Novozym 435) e *Rhizopus oryzae* (células imobilizadas em poliuretano durante o cultivo). Os resultados mostraram que, para ambas as enzimas, a produção do biodiesel foi maior com a diminuição da cadeia do álcool. A atividade de transesterificação ( $U = \text{massa de biodiesel (g)/h/g de lipase}$ ) quando se usou metanol foi de aproximadamente 1,5 U/g para a Novozym e 2,5 U/g para as células de *R. oryzae*. Quando se usou *n*-butanol, a atividade diminuiu para 0,25 U/g para a Novozym e 1,2 U/g para *R. oryzae*. Os autores alegaram que a baixa massa molar do metanol e a sua alta polaridade facilitaram a

difusão e o acesso ao sítio catalítico da enzima, resultando em maiores atividades. Vale ressaltar que o tempo de reação empregado pelos autores (1 h de reação) pode não ter sido suficiente para a análise da estabilidade das enzimas em álcoois de diferentes cadeias, que tende a ser menor com o aumento da polaridade do álcool. Esta observação foi fundamentada no estudo de outros parâmetros como a razão molar álcool:ácido (RM) e a maior atividade foi obtida quando a RM foi 1. Além disso, a máxima conversão em ésteres metílicos foi de 80% para *R. oryzae* (60 h) e 76% para a Novozym (90 h).

Em se tratando da atividade de água ( $a_w$ ), cada enzima possui um  $a_w$  ótimo e isto depende do quanto de água a enzima, caso ela esteja na forma livre, ou o conjunto enzima/suporte é capaz de absorver. A capacidade de absorção por sua vez, depende da composição em aminoácidos da enzima e da composição do suporte (hidrofóbico ou hidrofílico) onde o biocatalisador foi imobilizado. Em geral, o perfil dos resultados, quando se estuda a influência da  $a_w$ , segue o modelo de curvas em forma de sino, isto é, para baixas atividades de água, a enzima contém poucas moléculas de água ligadas ou possui baixa solvatação e a eficiência catalítica diminui devido à inibição ou desnaturação da enzima pelos solventes orgânicos do meio reacional. Para altos valores de  $a_w$ , as conversões em porcentagem do produto diminuem, o que pode ser atribuído ao favorecimento da reação de hidrólise em reações onde ocorre transferência de grupos acila (Rahman et al., 2008; Villeneuve, 2007).

Quando se estuda a influência da concentração da enzima no meio reacional, a comparação deve ser feita em termos da atividade da enzima. Entretanto, a maioria dos resultados reportados na literatura, quando se emprega lipases imobilizadas ou livres, indica somente a massa de enzima adicionada no meio reacional, o que dificulta a comparação dos resultados. Ainda assim, se levarmos em consideração quantidades de enzima, a maioria dos trabalhos reporta a utilização de 5 a 20% (m/m) (Lu et al., 2007; Shah e Gupta, 2007;

Noureddini et al., 2005). Neste presente trabalho empregou-se somente 4,5% (m/m) de enzima (3 g de óleo e 150 mg de enzima). Entretanto, se a comparação for feita em termos de tempo e percentagem de produção de éster, a produção de 96% de ésteres etílicos em 8 h pode ser considerada muito boa, levando-se em conta que a lipase utilizada no presente trabalho não é uma enzima comercial e que sua atividade não foi otimizada ou aumentada por técnicas de biologia molecular, como é o caso da maioria das enzimas comerciais.

Com relação ao estudo do efeito da razão molar álcool:ácido, a literatura relata que, mesmo na proporção 1:3, metade da quantidade do metanol, por exemplo, é imiscível em óleos vegetais e que esta parte insolúvel na mistura reacional inativa lipases, provavelmente pela existência de interface. Além disso, materiais porosos usados para a imobilização de enzimas, como por exemplo, resinas ou polímeros como polipropileno, que é o caso do Accurel utilizado neste trabalho, podem absorver compostos polares como o etanol. Com o aumento da razão molar, a concentração do álcool insolúvel no meio reacional também irá aumentar possibilitando que o suporte absorva maior quantidade de álcool, assim a difusão do óleo vegetal acaba sendo reduzida ou bloqueada e conseqüentemente a catálise enzimática diminui (Tamalampudi et al, 2008).

Para as reações que utilizam catalisadores químicos, o aumento da concentração de um dos reagentes tende a deslocar o equilíbrio químico no sentido da produção de ésteres, aumentando o rendimento do produto. Quando se utiliza enzimas como catalisadores, o resultado normalmente é o inverso, isto é, o aumento da concentração de um reagente polar como o álcool, no meio reacional, pode contribuir para a desnaturação ou inibição da enzima e, conseqüentemente, diminuir o rendimento do produto (Ranganathan et al., 2008).

Muitos pesquisadores reportam o efeito da temperatura nas reações de transesterificação ou esterificação. Noureddini et al. (2005), por exemplo, estudaram o efeito da temperatura (25 a 60°C) na produção do biodiesel do óleo de soja empregando a lipase de

*B. cepacia* (Amano, Nagoya-Japão) e a melhor temperatura, tanto para a metanólise como para a etanólise, foi de 35 °C. Acima desta temperatura observou-se uma diminuição da produção do éster e um aumento da produção de ácido carboxílico, ou seja, altas temperaturas tendem a favorecer as reações de hidrólise. Salis et al. (2005) empregaram a lipase de *P. cepacia* (Amano, imobilizada) na transesterificação da trioleína com *n*-butanol em temperaturas de 20 a 70 °C. As maiores conversões (próximas a 100%, 6h) foram obtidas entre 30 e 40 °C.

Para a produção de ésteres via esterificação, estudos do efeito da temperatura também são reportados. Serri e Kamaruddin (2006) variaram a temperatura de 30 a 55°C na produção do laurato de citronelila em isoctano catalisada pela lipase de *C. rugosa* (Sigma) imobilizada em Amberlite MB-1 (suporte hidrofóbico). Os resultados apresentaram o perfil em forma de sino, sendo a maior conversão (90%, 24 h) obtida a 37 °C. Sebrão et al. (2007) verificaram que as maiores conversões na síntese do oleato de *n*-pentila catalisada pelas lipases de *Pseudomonas* sp., *T. lanuginosus* e *R. oryzae* imobilizadas em filme de caseinato de sódio/glicerol foram entre 30 e 35 °C (66, 45 e 41%, respectivamente em 24 h).

Pelos resultados encontrados em literatura e considerando reações de transferência de grupos acila em meios não-aquosos, os estudos dos parâmetros que influenciam nas reações catalisadas por lipases, dependem especialmente da origem da enzima, do tipo de imobilização e do tipo do suporte empregado bem como da quantidade de água e natureza dos substratos.

## 6. CONCLUSÕES

As conclusões deste trabalho, que estudou a imobilização e o desenvolvimento de aplicações da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11, foram as seguintes:

### **1ª Parte: Produção e Purificação da Enzima**

- Análises de microscopia de força atômica (MFA) sugerem que extrato lipolítico é ativado em presença de isopropanol, provavelmente devido ao rompimento dos agregados de alta massa molar formado pela lipase de *B. cepacia* LTEB11.
- O extrato delipidado e adicionado de 30% de isopropanol foi purificado por cromatografia de interação hidrofóbica e apresentou três bandas de proteína, confirmando resultados anteriores para esta lipase.

### **2ª Parte: Estudos de Imobilização**

- A retenção da atividade do preparado enzimático imobilizado foi maior quando não se adicionou isopropanol durante o processo de imobilização; por isso, o procedimento selecionado para imobilizar a lipase em Accurel EP 100 ou em qualquer outro suporte foi com a solução enzimática sem a adição de isopropanol.
- O melhor suporte, considerando a eficiência de imobilização (saturação do suporte) e a retenção da atividade (atividade após imobilização), foi o polipropileno Accurel EP 100.
- A lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP100 apresentou retenção da atividade de 193% em meio orgânico.

- Desenvolveu-se um novo método de imobilização para lipases. Trata-se do método aqui denominado “Simultânea Produção e Imobilização de Lipases, SPIL”. O método consiste em adicionar o suporte diretamente ao meio de cultura durante o cultivo para produção de lipases. O método se mostrou muito eficiente, pois a enzima imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL apresentou eficiência catalítica superior à imobilização por adsorção convencional. O método SPIL reduz o custo para a produção da enzima imobilizada, pois há redução no número de etapas de preparação do extrato bruto, necessárias quando se utiliza a metodologia convencional de imobilização.

### **3ª Parte: Estudos de Utilização da Enzima em Biocatálise em Solventes Orgânicos**

- A enzima livre foi sempre mais estável em solventes orgânicos que a imobilizada, apresentando ativação de aproximadamente 40% em *n*-heptano (37 e 50 °C), quando incubada por 3 h. Para a enzima imobilizada, a maior estabilidade foi observada em *n*-heptano, com manutenção da atividade total após 3 h de incubação.
- Nas reações de produção do oleato de etila, a catálise foi mais eficiente (em rendimento e tempo) para o sistema contendo *n*-heptano e enzima imobilizada em Accurel EP 100 por SPIL quando comparado ao sistema sem este co-solvente.
- Os ensaios de regioesletividade mostraram que a lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel não é regioespecífica.
- Nos estudos de tiposseletividade da enzima imobilizada, onde a variável nas reações de interesterificação, foi o tamanho das cadeias (triacilgliceróis contendo 4 a 18 carbonos), concluiu-se que a lipase de *B. cepacia* LTEB11 tem preferência pela reação contendo tributirina (cadeias menores). Em se tratando das cadeias com diferenças nas insaturações

(triacilgliceróis contendo 18 carbonos e 0 a 3 insaturações), foi observado um perfil em forma de sino, isto é, aumento da atividade específica para cadeias com até duas insaturações e diminuição da atividade específica para a cadeia com três insaturações.

- Para as reações de transesterificação do óleo de mamona, dois álcoois foram usados: metanol e etanol, sendo as porcentagens em conversões de ésteres muito semelhantes para os dois casos. Após os estudos de otimização da etanólise do óleo de mamona obteve-se 96% de produção de ésteres etílicos em 8 h de reação para um sistema sem controle da  $a_w$ , com 150 mg de enzima (400 U), razão molar óleo:álcool 1:3 (3 mmol de óleo e 9 mmol de álcool), temperatura de 30 °C e adição do etanol em uma etapa.

Os resultados apresentados neste trabalho são originais em dois aspectos fundamentais: primeiramente, na proposta de uma nova metodologia de imobilização para lipases - Simultânea Produção e Imobilização de Lipases, SPIL, que trouxe vantagens relativas à maior atividade enzimática e ao custo (pela redução de etapas), quando comparada à enzima imobilizada pelo processo convencional, que envolve a produção, preparação do extrato lipolítico e posterior imobilização. Em segundo lugar, a lipase da cepa nativa de *B. cepacia* mostrou-se ativa e estável em solventes orgânicos, catalisando reações de interesterificação, esterificação e transesterificação, abrindo novas perspectivas para a utilização desta lipase em outras reações de interesse da biocatálise. Dentre estas perspectivas estão a síntese de ésteres metílicos e etílicos do biodiesel, uma aplicação tecnológica de interesse estratégico ao País.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é um trabalho inovador, que produziu resultados relativos à imobilização e às aplicações da lipase de *B. cepacia* LTEB11 em biocatálise, abrindo novas perspectivas de utilização desta enzima em processos biocatalíticos. Sugere-se, como perspectivas futuras os seguintes tópicos:

- Estudos de reutilização da lipase de *B. cepacia* LTEB 11 imobilizada em Accurel em reações de transesterificação para a produção de ésteres oriundos do óleo de mamona.
- Utilização da lipase imobilizada em reator de leito fixo e para tal o estudo dos seguintes parâmetros são importantes: a) custo do catalisador frente ao custo total do processo; b) estabilidade da enzima ao longo do processo; c) controle da temperatura e d) estudo da concentração dos substratos a fim de permitir operar em concentrações não inibitórias.
- Estudo de métodos alternativos de análise instrumental, tais como Infravermelho, CLAE, RMN-<sup>1</sup>H e TLC-FID para a elucidação estrutural dos ésteres produzidos (ésteres do biodiesel).
- Produção de outros ésteres de interesse comercial como por exemplo emulsificantes (ésteres de açúcares) e antioxidantes oriundos da modificação do ácido ascórbico (vitamina C) ou de flavonóides diversos, ésteres de aromas, entre outros.
- Aplicação da técnica SPIL usando outros suportes ou outros microrganismos produtores de enzimas extracelulares com potencial catalítico.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U.T.; BEDNARSKI, W. Synthesis of ascorbyloleate by immobilized *Candida antartica* lipases. **Process Biochem.**, v. 40, n. 10, p. 3177-3180, 2005.

ADACHI, S.; KOBAYASHI, T. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 99, n. 2, p. 87-94, 2005.

AFACH, G.; KAWANAMI, Y.; IZUMORI, K. Synthesis of D-allose fatty acid esters via lipase-catalyzed regioselective transesterification. **Bioscience Biotechnol. Biochem.**, v. 69, n. 4, p. 833-835, 2005.

AKOH, C.C.; CHANG, S.W.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 22, 8995–9005, 2007.

AL-DURI, B.; YONG, Y.P. Lipase immobilisation: an equilibrium study on lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/ hydrophobic supports. **Biochem. Eng. J.**, v. 4, p. 207-215, 1999.

ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.**, v. 10, p. 377- 383, 2000.

ALI, Y.BEN.; CHAHINIAN, H.; PETRY, S.; MULLER, G.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R.; ABDELKARIM, A. Might the Kinetic Behavior of Hormone-Sensitive Lipase Reflect the Absence of the Lid Domain? **Biochem.**, v. 43, n. 29, p. 9298-9306, 2004.

ANDO, S.; ISHIDA, H.; KOSUGI, Y.; ISHIKAWA, K. Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshi*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 430–433, 2002.

ANTCZAK T.; PATURA, J.; SZCZSNA-ANTCZAK, M.; HILER, D. BIELECKI, S. Sugar ester synthesis by a mycelium-bound *Mucor circinelloides* lipase in a micro-reactor equipped with water activity sensor. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.**, v. 29, n. 1-6, p. 155-161, 2004.

BANDMANN, N.; COLLET, E.; LEIJEN, J.; UHLÉN, M.; VEIDE, A.; NYGREN, P.A. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **J. Biotechnol.**, v. 79, n. 2, p. 161-172, 2000.

BAÑÓ, M.C.; GONZALÉZ-NAVARRO, H.; ABAD, C. Long-chain fatty acyl-CoA esters induce lipase activation in the absence of a water–lipid interface. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1632, n. 1-2, p. 55-61, 2003.

BARON, A.M.; SARQUIS, M.I.M.; BAIGORÍ, M.; MITCHELL, D.A.; Krieger, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 34, n. 1-6, p.25-32, 2005.

BERGEY, D.H.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9<sup>th</sup> edition, 1994.

BHUSHAN, I.; PARSHAD, R.; QAZI, G.N.; INGAVLE, G.; RAJAN, C.R.; PONRATHNAM, S.; GUPTA, V.K. Lipase enzyme immobilization on synthetic beaded macroporous copolymers for kinetic resolution of chiral drugs intermediates. **Process Biochem.**, v. 43, n. 4, p. 321-330, 2008.

BIER, M. Lipases. **Methods Enzymol.**, v. 1, p. 627-642, 1955.

BLUM, H.; BEIER, H.E.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

BON, E.P.S.; FREIRE, D.M.G.; MENDES, M.F.; SOARES, V.F. Immobilization of *Aspergillus niger* beta-D-glucosidase on Aminates Chitin and Aluminate. *World J. Microb. Biotechnol.*, v. 11, p. 291-299, 1986.

BORNSCHEUER, T.U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H.S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends Biotechnol.**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BOUAID, A.; APARICIO, J.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, JOSÉ. Synthesis of a green biosolvent: Isopropyl esters. A statistical approach. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, n. 4, p. 533-538, 2007.

BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, p. 455-475, 1960.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, L., BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z.S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J.P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L. E MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

BROCKMAN, H.L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Lipases, pp. 1-46. Borgstrom, B. e Brockman, H.L. (Eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

BRYJAK, J.; LIESIENE, J.; KOLARZ, B.N. Application and properties of butyl acrylate/pentaerythrite triacrylate copolymers and cellulose-based Granocel as carriers for trypsin immobilization. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, v. 61, n. 1, p. 66-74, 2008.

CAMBON, E.; GOUZOU, F.; PINA, M.; BAREA, B.; BAROUH, N.; LAGO, R.; RUALES, J.; TSAI, S.W.; VILLENEUVE, P. Comparison of the Lipase Activity in Hydrolysis and Acyl Transfer Reactions of Two Latex Plant Extracts from Babaco (*Vasconcellea × Heilbornii* Cv.) and *Plumeria rubra*: Effect of the Aqueous Microenvironment. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 7, p. 2726-2731, 2006.

- CARO, Y.; VILLENEUVE, P.; PINA, M.; REYNES, M.; GRAILLE, J. Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 77, n. 4, p. 349-354, 2000.
- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CHAKRABORTY, K.; RAJ, P.R. An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. **Food Chem.**, v. 109, n. 4, p. 727-736, 2008.
- CHEBIL, L.; ANTHONI, J.; HUMEAU, C.; GERARDIN, C.; ENGASSER, J.M.; GHOUL, M. Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 23, p. 9496-9502, 2007.
- CHEN, X.; DU, W.; LIU, D.; DING, F. Lipase-mediated methanolysis of soybean oils for biodiesel production. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 83, p. 71-76, 2008.
- CHOPINEAU, J.M.C.; CAFFERY, F.D.; THERISOD, M.; KLIBANOV, A.M. Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in a non aqueous medium. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 31, p. :208-214, 1998.
- CHOWDARY, G.V.; PRAPULLA S.G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. **Process Biochem.**, v. 38 (3), p. 393-397, 2002.
- CHUA, L.S.; SARMIDI, M.R. Effect of solvent and initial water content on (R, S)-1-phenylethanol resolution. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 38, n. 3-4, p. 551-556, 2006.
- COSTA NETO, P.R. **Obtenção de ésteres (Biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. Santa Catarina, 2002. 133 p. Tese (Doutorado em Química)- Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal de Santa Catarina.
- COSTA, M.A.; PERALTA, R.M. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). **J. Basic Microbiol.**, v. 39, n. 5, p. 11-15, 1999.
- CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Enzyme Microb. Technol.**, v. 42, n. 5, 4, p. 381-388, 2008.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DANNAVATE, V.; MADAMWAR, D. Novel approach for the synthesis of ethyl isovalerate using surfactant coated *Candida rugosa* lipase immobilized in microemulsion based organogels. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, n. 3, p. 265-270, 2007.
- DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, n. 2, p. 241-246, 1999.

ERICSSON, D.J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTRÖM, A.G.; BÄCKVALL, J.E.; MOWBRAY, S.L. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. **J. Mol. Biology**, v. 376, n. 1, p. 109-119, 2008.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A. KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 44, n. 1-2, p. 8-13, 2007.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. A Textbook, 5<sup>th</sup> ed. Springer, New York, 2004, 454 p.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chem. Physics Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 185-197, 1998.

FERRER, M.; SOLIVERI, J.; PLOU, F.J.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; REYES-DUARTE, D.; CHRISTENSEN, M.; COPA-PATIÑO, J.L.; BALLESTEROS, A. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 36, n. 4, p. 391-398, 2005.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Analysis of the interaction of lipases with polypropylene of different structure and polypropylene-modified glass surface **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 294, n. 1-3, p. 147-155, 2007.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 40, n. 4, p. 769-777, 2007.

FORESTI, M.L.; PEDERNEIRA, M.; BUCAL, V.A.; FERREIRA, M.L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, p. 62-70, 2007.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder **Catal. Today**, v. 107-08 p. 23-30, 2005.

FUREBY, A.M.; LI, T.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 20, n. 3, p. 198-206, 1997.

GANDHI, N.N.; PATIL, N.S.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B.; WANGIKAR, P.P.; MUKESH D. Lipase-Catalyzed Esterification. **Catal. Rev.**, v. 42, n. 4, p. 439-480, 2000.

GANSKE, F.; BORNSCHEUER, U.T. Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 36, n. 1-6, p. 40-42, 2005.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAËBOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO<sub>3</sub>: A comparative study. **Biochem. Eng. J.**, v. 37, n. 1, p. 34-41, 2007.

- GHAMGUI, H; KARRA-CHAABOUNI, M; GARGOURI, Y. 1-butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enz. Microb. Technol.** v. 35, n. 4, p. 355-363, 2004.
- GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **J.Chromatography B**, v. 819, n. 1, p. 3-16, 2005.
- GONÇALVES, A.P.V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade.** Lisboa, 1999, 246 f. Tese (Doutorado em biotecnologia). Universidade Técnica de Lisboa.
- GOTOR, V. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. **J. Biotechnol.**, v. 96, n. 1, p. 35-42, 2002.
- GUMÍ, T.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M.; RIOS, G.M. Enzymatic membrane reactor involving a hybrid membrane in supercritical carbon dioxide. **J. Membrane Science**, v. 297, n. 1-2, p. 98-103, 2007.
- GUPTA M.N, ROY I. Enzymes in organic media - Forms, functions and applications. **European J. Biochem.**, v. 271, n. 13, p. 2575-2583, 2004.
- GÜVENÇA, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, U. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochem.**, v. 38, p. 379-386, 2002.
- HAMA, S.; YAMAJI,H; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochem. Eng. J.**, v. 34, n. 3, p. 273-278, 2007.
- HARA, P.; HANEFELD,U.; KANERVA, LT. Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. . **J. Mol. Catal. B-Enzymatic**, v. 50, p. 80-86, 2008.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N.N.; HAZARIKA, A.K. Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents. **Chem. Eng. J.**, v. 85, n. 1, p. 61-68, 2002.
- HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 277-286, 2008.
- IBRIK, A. Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*. **Lipids**, v. 33, n. 4, p. 377-384, 1998.
- ICHINOSE, H.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Enzymatic redox cofactor regeneration in organic media: Functionalization and application of glycerol dehydrogenase and soluble transhydrogenase in reverse micelles. **Biotechnol. Progress**, v. 21, n. 4, p. 1192-1197, 2005.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; RANSAK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JINWAL, U.K.; ROY, U.; CHOWDHURY, A.R.; BHADURI, A.P.; ROY, P.K. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from a Newly Isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and Chemoselective Hydrolysis of Fatty Acid Ester. **Bioorganic Medicinal Chem.**, v. 11, n. 6, p. 1041-1046, 2003.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 91, n. 12-15, 2001.

KAMINI, N.R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochem.**, v. 36, n. 4, p. 317-324, 2000.

KAMORI, M.; HORI, T.; YAMASHITA, Y.; HIROSE, Y.; NAOSHIMA, Y. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase. **J. Mol. Catal. B-Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 269-274, 2000.

KARADZIC, I.; MASUI, A.; ZIVKOVIC, L.I.; FUJIWARA, N. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Putrid Mineral Cutting Oil as Component of Metalworking Fluid. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 102, n. 2, p. 82-89, 2006.

KARRA-CHÂABOUNI, M.K.; GHAMGUI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system **Process Biochem.**, v. 41, n. 7, p. 1692-1698, 2006.

KEMPKA, A.P.; LIPKE, N.L.; PINHEIRO, T.L.F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D.M.G.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.

KIM, H.J.; YOUN, S.H.; SHIN, C.S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol-fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **J. Biotechnol.**, v. 123, n. 2, p. 174-184, 2006a.

KIM, M.I.; HAM, H.O.; OH, S.D.; PARK, H.G.; CHANG, H.N.; CHOI, S.H. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 39, n. 1-4, p. 62-68, 2006b.

KIM, J.; HAAM, S.; PARK, D.W.; AHN, I.S.; LEE, T.G.; KIM, H.S.; KIM, W.S. Biocatalytic esterification of  $\beta$ -methylglucoside for synthesis of biocompatible sugar-containing vinyl esters. **Chem. Eng. J.**, v. 99, n. 1, p. 15-22, 2004.

KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, p. 241-246, 2001.

KNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BUGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochem.**, v. 38, n. 3, p. 313-318, 2002.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D.A. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 42, n. 4, p. 279-286, 2004.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; FONTANA, J.D.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; CABRAL, J.M.S. Kinetics characteristics of *Penicillium citrinum* lipase in AOT/isooctane reversed micelles. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 67, n. 1-2, p. 85-87, 1997.

KRIEGER, N. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum***. Curitiba, 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAUDANI, C.G.; HABULIN, M.; PRIMOZ, M.; KNEZ, E.; PORTA, G.D.; REVERCHON, E. Optimisation of n-octyl oleate enzymatic synthesis over *Rhizomucor miehei* lipase. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 29, p. 119–127, 2006.

LEE, G.A.; KIMB, J.; LEE, J. H. Development of magnetically separable polyaniline nanofibers for enzyme immobilization and recovery. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 42, p. 466–472, 2008.

LI, XG; KANERVA, L.T. Chemoenzymatic preparation of fluorine-substituted beta-lactam enantiomers exploiting *Burkholderia cepacia* lipase. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 18, p. 2468-2472, 2007.

LI, N.; ZONG, M.H.; LIU, X.M.; MA, DING. Regioselective synthesis of 3'-O-caproyl-floxuridine catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase. **J. Mol. Catal. B-Enzymatic**, v. 47, n. 1-2, p. 6-12, 2007.

LIMA, A.W.O.; ANGNES, L. Biocatálise em Meios Aquo-Restritos: Fundamentos a Aplicações em Química Analítica. **Quím. Nova**, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochem. Eng. J.**, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004.

LIMA, V.M.G. **Produção e Purificação de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua Aplicação em Biocatálise em Solventes Orgânicos**. Curitiba, 2004. 151 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LIU, C.H.; CHANGAND, J.S. Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous *Burkholderia* sp. C20.. **Bioresource Technol.**, v. 99, n. 6, p. 1616-1622, 2008.

- LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochem. Eng. J.**, *In Press*, 2008.
- LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the foli-phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LU, X.; ZHOU, J.; LU, W.; LIU, Q.; LI, J. Carbon nanofiber-based composites for the construction of mediator-free biosensors. **Biosensors Bioelectronics**, v. 23, n. 8, p. 1236-1243, 2008.
- LU, J.; NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. **Process Biochem.**, v. 42, p. 1367-1370, 2007.
- LUO, Y.; ZHENG, Y.; JIANG, Z.; MA Y., WEI, D. A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v 73, p. 349-355, 2006.
- MANNHOLD, R; REKKER, R.F. The hydrophobic fragmental constant approach for calculating log P in octanol/water and aliphatic hydrocarbon/water systems. **Perspectives in Drug Discovery Design**, v. 18, p. 1-18, 2000.
- MELLOU, F.; LOUTRARI, H.; STAMATIS, H.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F. N. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. **Process Biochem.**, v 41, n. 9, p. 2029-2034, 2006.
- MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; JÚNIOR, A.F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MENNICKE, U.; SALDITT, T. Preparation of Solid Supported Lipid bilayers by Spin-Coating. **Langmuir**, v. 18, p. 8172-8177, 2002.
- MODI, M.K.; REDDY, J.R.C.; RAO, B.V.S.K.; Prasad, R.B.N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. **Bioresource Technol.**, v. 98, p. 1260-1264, 2007.
- MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G.L.; SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chem. Physics Lipids**, v. 147, n. 1, p. 1-13, 2007.
- MUCK, A.; SVATOS, A. Chemical modification of polymeric microchip devices. **Talanta**, v. 74, n. 3, p. 333-341, 2007.
- MUTUA, L.N.; AKOH, C.C. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non aqueous media by *Candida* sp. lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 70, p. 43-46, 1993.

- NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Expression of Lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: High-Level Production and Purification. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 81, n. 6, p. 488-492, 1996.
- NAWANI, N. E KAUR, J. Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 40, n. 4, 5; p. 881-887, 2007.
- NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **J. Mol. Catal. B:Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 142-147, 2006.
- NIGHOJKAR, S.; PHANSE, Y.; SINHA, D.; NIGHOJKAR, KUMAR, A. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. **Process Biochem.**, v. 41, p. 1136–1140, 2006.
- NINI, L.; SARDA, L.; COMEAU, L.C.; BOITARD, E.; DUBÈS, J.P.; CHAHINIAN, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1534, n. 1, p. 34-44, 2001.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technol.**, v. 96, p. 769-777, 2005.
- OH, B.C.; KIM, H.K.; LEE, J.K.; KANG, S.C.; OH, T.K. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 385-392, 1999.
- OISHI, H.; MORIMOTO, T.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Purification and Characterization of Phospholipase B from *Kluyveromyces lactis*, and Cloning of Phospholipase B gene. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, n. 1, p. 83-90, 1999.
- OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C.D.; BENDER, J.P.; LIPKE, N.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C.; OLIVEIRA, J.V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 771, p. 113-116, 2004.
- ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A.C. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. **J. Mol. Catal. B:Enzymatic**, v. 42, p. 106–113, 2006.
- PAHUJANI, S.; KANWAR, S.S.; CHAUHAN, G.; GUPTA, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. **Bioresource Technol.**, v. 99, 2566–2570, 2008.
- PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, n. 3-5, p. 187-204, 2000.
- PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Quim. Nova**, vol., 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

- PARK, E.Y.; SATO, M.; KOJIMA, S. Lipase-catalyzed biodiesel production from waste activated bleaching earth as raw material in a pilot plant. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 3130–3135, 2008.
- PATEL, M.T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. Lipase-catalyzed biochemical reactions in novel media: a review. **Chem. Eng. Commun.**, v. 153, p. 365-404, 1996.
- PEDERSEN, N.R.; KRISTENSEN, J.B.; BAUW, G.; RAVOO, B.J.; DARCY, R.; LARSEN, K.L. PEDERSEN, L.H. Thermolysin catalyses the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO. **Tetrahedron- Asymmetry**, v. 16, n. 3, p. 615-622, 2005.
- PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme Microb. Technol.**, v.18, p. 417-422, 1996.
- PERSSON, M.; COSTES, D.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 30, n. 7, p. 916-923, 2002a.
- PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002b.
- PETERSSON, A.E.V.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 97, n. 2, p. 235-241, 2007.
- PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 39, n. 1-4, p. 83-90, 2006.
- PILISSÃO, C.; NASCIMENTO, M.G. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 17, n. 3, p. 428-433, 2006.
- PUECH-GUENOT, S.; LAFQUIERE, V.; GUIEYSSE, D.; LANDRIC-BURTIN, L.; MONSAN, P.; REMAUD-SIMEON, M. Small-scale production of *Burkholderia cepacia* ATCC21808 lipase adapted to high-throughput screening. **J. Biomol. Screening**, v. 13, n. 1, p. 72-79, 2008.
- RAHMAN, M.B.A.; ZAIDAN, U.H.; MOHD, M.B.; ZOBIR, H.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; SALLEH, A.B. Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from *Candida rugosa* immobilised on Mg, Zn and Ni of layered double hydroxides (LDHs). **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 50, p. 33-39, 2008.
- RAHMAN, M.B.A.; TAJUDIN, S.M.; HUSSEIN, M.Z.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; SALLEH, A.B.M.B. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. **Appl. Clay Sci.**, v. 29, n. 2, p. 111-116, 2005.
- RASSY, E.; PERRARD, A.; PIERRE, C. Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: Bi-Bi Ping-Pong kinetics. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 30, n. 3-4, p. 137-150, 2004.

- RHEE, J.K.; AHN, D.G.; KIM, Y.G.; OH, J.W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 2, p. 817-825, 2005.
- REETZ, M.T.; ZONTA, A.; VIJAYAKRISHNAN, V.; SCHIMOSSEK, K. Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. **J. Mol. Catal. A-Enzymatic**, v. 134, n. 1-3, p. 251-258, 1998.
- REYES-DUARTE, D.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; FERRER, M; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A. Parameters affecting productivity in the lipase-catalysed synthesis of sucrose palmitate. **Biocatal. Biotransformation**, v. 23, n. 1, p. 19-27, 2005.
- ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. **Bioresource Technol.** v. 98, n. 3, p. 648-653, 2007.
- RÚA, M.L.; SCHMIDT-DANNERT, C.; WAHL, S.; SPRAUER, A.; SCHMID, R.D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale, purification and properties: aggregation behavior and its effect on activity. **J. Biotechnol.**, v. 56, p. 89-102, 1997.
- SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 42, n. 1-2, p. 1-9, 2006.
- SABEDER, S.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. Lipase-catalyzed of fatty acid fructose esters. **J. Food Eng.**, v. 77, n. 4, p. 880-886, 2006.
- SALAMEH, M.; WIEGEL, J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 61, p. 253-283, 2007.
- SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **J. Biotechnol.**, v. 119, n. 3, p. 291-299, 2005.
- SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilised lipases. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 21, n. 4-6, p. 167-174, 2003.
- SALUM, T.F.C; BARON, A.M; ZAGO, E.; TURRA, V; BARATTI, J; MITCHELL, D.A.; Krieger, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatal. Biotransformations**, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2008.
- SAGIROGLU, A. Conversion of sunflower oil to biodiesel by alcoholysis using immobilized lipase. **Artificial Cells Blood Subst. Biotechnol.**, v. 36, n. 2, p. 138-149, 2008.
- SANTOS, J.C.; MIJONE, P.D.; NUNES, G.F.M.; PEREZ, V.H.; CASTRO, H.F. DE. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol with different activating compounds. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 229-236, 2008.

- SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; SHEBA, W.D. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Meth.**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.
- SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods Enzymol.**, v. 284, p. 85 – 107, 1997. **Enzymol.**, v. 284, p. 85 – 107, 1997.
- SEBRÃO, D.; SILVA, V.D.; NASCIMENTO, M.G.; MOREIRA, M.A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.
- SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDELÉ, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E.E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microp. Mesop. Mat.**, v. 109, n. 1-3, p. 350-361, 2008.
- SECUNDO, F.; CARREA, G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 19-20, p. 93-102, 2002.
- SELLEK, G.A.; CHAUDHURI, J.B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, n. 6, p. 471-482, 1999.
- SERDAKOWSKI, A.L.; DORDICK, J.S. Enzyme activation for organic solvents made easy. **Trends Biotechnol.**, v. 26, n. 1, p. 48-54, 2008.
- SERRI N. AZIAH; A. H. KAMARUDDIN. Studies of reaction parameters on synthesis of citronellyl laurate ester via immobilized *Candida rugosa* lipase in organic media. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 29, p. 253–260, 2006.
- SHAH, S.; GUPTA, M.N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochem.**, 42, 3, p. 409-414, 2007.
- SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 17, p. 133–142, 2002.
- SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.T.; TSUMASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **J. Fermentation Bioeng.**, v. 75, p. 349-352, 1993.
- SHU, C.H.; XU, C.J.; LIN, G.C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochem.**, v. 41, n. 3, p. 734-738, 2006.
- SIMON, L.M.; LÁSZLÓ, K.; VÉRTESI, A.; BAGI, K.; SZAJÁNI, B. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 4, n. 1-2, p. 41-45, 1998.
- SIN, Y.M.; CHO, K.W.; LEE, T.H. Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine. **Biotechnol Lett.**, v. 20, p. 91–94, 1998.
- SINGH, M.; SINGH, S.; SINGH, R.S.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 2116–2120, 2008.

- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARDNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, C.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v.150, p. 76-85, 1985.
- SOO, E.L.; SALLEH, A.B.; BASRI, M.; RAHMAN, R.N.Z.A.; KAMARUDDIN, K. Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. **Process Biochem.**, v. 39, n. 11, p. 1511-1518, 2004.
- SOUMANOU, M.M.; BORNSCHEUER, U.T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 168, p. 1070 - 1074, 1986.
- SULONG, M.R.; RAHMAN, R.N.Z.R.ABD.; SALLEH, A.B.B.M. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. **Protein Expression Purification**, v. 49, n. 2, p. 190-195, 2006.
- TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M.R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; AKIHIKO, K.; FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochem. Eng. J.**, v. 39, n. 1, p. 185-189, 2008.
- THERISOD, M.; KLIBANOV, A.M. Facile enzymatic preparations of monoacylated sugars in pyridine. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 108, p. 5638-5640, 1986.
- THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the Lid Hydrophobicity Pattern in Pancreatic Lipase Activity. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 48, p. 40074-40083, 2005.
- TORRES, R.; ORTIZ, C.; PESSELA, B.C.C.; PALOMO, J.M. MATEO, C.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, n. 2, p. 167-171, 2006.
- VAIDYA, B.C.; SINGHAL, K. REKHA, S. Use of insoluble yeast  $\beta$ -glucan as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, v. 61, n. 1, p. 101-105, 2008.
- VASUDEVAN, P.T.; BRIGGS, M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, n. 5, p. 421-430, 2008.
- VEIT, T. Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients. **Eng. Life Sci.**, v. 4, n. 6, p. 508-511, 2004.
- VERMUE, M.H.; TRAMPER, J. Interrelations of chemistry and biotechnology. 5. Biocatalysis in nonconventional media-medium engineering aspects. **Pure App. Chem.**, v. 67, n. 2, p. 345-373, 1995.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for

biocatalysis: a survey of chemical, physical molecular biological approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 9, p. 113-148, 2000.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnol. Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **J. Physical Chem. B**, v. 109, n. 13, p. 6436-6441, 2005.

VITOLO, M. Imobilização de Enzimas. In: Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. **Biotecnologia Industrial**, v.3 Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo-SP: Edgard Blücher LTDA, 2001, p. 391-403.

WACKETT, L.P.; HERSHBERGER, C.D. General concepts in biodegradation and biocatalysis. In: WACKETT, L.P.; HERSHBERGER, C.D. **Biocatalysis and Biodegradation: Microbial Transformation of Organic Compounds**. Washington, D.C.: ASM Press, 2001. p. 1-5.

WANG, Y.; HSIEH, Y.L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. **J. Membrane Science**, v. 309, p. 73-81, 2008.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 17, p. 151-155, 2002.

WATANABE, Y.; MIYAWAKI, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Equilibrium constant for lipase-catalyzed condensation of mannose and lauric acid in water-miscible organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 29, n. 8-9, p. 494-498, 2001.

WINKLER, F.K., D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WU, J.C.; WONG, Y.K.; CHANG, K.W.; TAY, C.Y.; CHOW, Y.; TALUKDER, M.M.R.; CHOI, W.J. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase by entrapping in alginate-silica hybrid gel beads with simultaneous cross-linking with glutaraldehyde. **Biocatal. Biotransformation**, v. 25, p. 459-463, 2007.

XU, J.H.; ZHOU, R.; BORNSCHEUER, U.T. Comparison of differently modified *Pseudomonas cepacia* lipases in enantioselective preparation of a chiral alcohol for agrochemical use. **Biocatal. Biotransformation**, v. 23, n. 6, p. 415-422, 2005.

YADAV G.D.; JADHAV, S.R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous Mesoporous Mat.** v. 86, n. 1-3, p. 215-222, 2005.

YANG, J.K.; GUO, D.Y.; YAN, Y.J. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. Source: **J. Mol. Catal. B:Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p. 91-96, 2007.

YANG, J.S.; JEON, G.J.; HUR, B.K.; YANG, J.W. Enzymatic methanolysis of castor oil for the synthesis of methyl ricinoleate in a solvent-free medium. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 15, n. 6, p. 1183-1188, 2005.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chem. Eng. J.**, v. 134, p 262–267, 2007.

YIN, C.; LIU, T.; TAN, T. Synthesis of vitamin A esters by immobilized *Candida* sp. lipase in organic media. **Chinese J. Chem. Eng.**, v. 14, n. 1, p. 81-86, 2006.

YU, L.; XU, Y.; WANG, X.; YU, X. Highly enantioselective hydrolysis of DL-menthyl acetate to L-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. **J. Mol. Catal. B:Enzymatic**, v. 47, n. 3-4, p. 149-154, 2007.

YE, P.; XU, Z.K.; WU, J. INNOCENT, C.; SETA, P. Entrusting poly(acrylonitrile-*co*-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membranes with biomimetic surfaces for lipase immobilization. **J. Mol. Catal. B:Enzymatic**, v. 40, n. 1-2, p. 30-37, 2006.

ZHANG, X.; KOBAYASHI, T.; ADACHI, S.; MATSUNO, R. Lipase-catalyzed synthesis of 6-*O*-vinylacetyl glucose in acetonitrile. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 1097–1100, 2002.