

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE DUTRA MADALOZZO

SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS UTILIZANDO UMA LIPASE
RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

CURITIBA

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE DUTRA MADALOZZO

**SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS UTILIZANDO UMA LIPASE
RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dra. Nadia Krieger

CURITIBA

2011

TERMO DE APROVAÇÃO

ALINE DUTRA MADALOZZO

**SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍlicos UTILIZANDO UMA LIPASE RECOMBINANTE DE
*Rhizopus oryzae***

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Prof. Dr. Nadia Krieger (Orientador)
Departamento Química – UFPR


Prof. Dr. Gisella Maria Zanin
Departamento de Engenharia Química – UEM


Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 25 de Janeiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido esposo Rafael que apesar da distância sempre me deu todo o apoio e incentivo pelo orgulho em me ver realizar mais uma etapa tão importante na minha vida. Agradeço-o também por compartilhar comigo todos os momentos deste mestrado e principalmente pela paciência nesta etapa final.

Aos meus amados pais Adalberto e Ana Maria (*in memorian*) pelo amor, educação e formação, vocês foram o principal motivo para eu chegar até aqui.

Aos meus irmãos Adriana, Egberto e Gisele simplesmente por existirem em minha vida e que apesar da distância estão sempre presentes me dando apoio em tudo que eu faço.

À minha cunhada e amiga maravilhosa Anita que sempre lembrou de todos os momentos importantes do meu mestrado compartilhando comigo as aflições e comemorando as vitórias. Obrigada também pelas orações que em conjunto com a Ana Maria foram muito valiosas.

À professora Nadia Krieger pela orientação, por todo o conhecimento transmitido e por confiar em mim na realização deste mestrado.

Ao professor Jesús Cordova, professor convidado da Universidade de Guadalajara (México), pela atenção, paciência e valiosas colaborações neste trabalho.

Ao professor Francisco Valero da Universidade Autônoma de Barcelona (Espanha) por ceder a enzima utilizada neste trabalho, sendo sua colaboração de grande importância.

Ao professor Miguel Nosedá, coordenador do curso de pós-graduação em Bioquímica, e secretárias Dona Marilza e Dona Irene, que sempre foram atenciosos em todas as solicitações.

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio por permitir o uso dos equipamentos para a realização da eletroforese SDS-PAGE, em especial à Viviane que me ajudou nesta parte.

À Lilian Côcco do LCAUT pelas análises em Cromatógrafo Gasoso, mas principalmente pela atenção e carinho com que me recebeu.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica desta universidade pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À “patotinha” do mestrado Tati, Fran, Elaine e Sarah pelos ensinamentos no início do mestrado, pelas conversas, desabafos, saídas e momentos de descontração. Obrigada por dividirem comigo todos estes momentos e tornarem a vida de mestranda muito mais divertida.

Aos colegas e amigos do LTEB, Alessandra Baron, Lídia, Kátia, Alexandra, Bianca, Dayane, Doumit, Christiane, Viviane, Érika, Thais, Juliana, Rodriguinho, Edgar, Diniara, Alessandra Biz, Jéssica, Carol, Andrei e Fernanda. Em especial, agradeço à Alessandra Baron pela “co-orientação”, ensinamentos e paciência, e à Lídia, aluna iniciação científica nota 10, pela dedicação no trabalho e disponibilidade em todos os momentos solicitados.

Às minhas amigas mais que especiais Lilli, Dani e Pês que fizeram parte da minha infância e formação, devido esta convivência com vocês adquiri características essenciais para estar aqui: esforço, dedicação e ter objetivos na vida. Obrigada por tudo e por me compreenderem melhor do que ninguém.

À UFPR e ao departamento de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade em fazer parte de um dos melhores programas de pós-graduação do Brasil.

Aos membros da Banca Examinadora, Gisella Zanin e Marcelo Müller pelas valiosas contribuições para o aperfeiçoamento desta dissertação.

Ao CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro.

À todos que fizeram parte ou que de alguma forma me ajudaram na realização deste mestrado. Muito obrigada!

“A alegria que se tem em pensar e aprender
faz-nos pensar e aprender ainda mais”.

Aristóteles

RESUMO

Os ésteres de ácidos graxos possuem diversas aplicações como na produção de aromas; produção de sabões; fabricação de medicamentos, perfumes e cosméticos; na produção e modificações de componentes alimentares; e também na produção de biocombustíveis. O emprego de enzimas como biocatalisadores nas reações de síntese de ésteres possui vantagens em relação aos catalisadores químicos, sendo assim nos últimos anos aumentou significativamente o interesse pelo processo biocatalítico utilizando lipases. O principal objetivo desta pesquisa foi realizar a síntese do oleato de etila utilizando lipases de *Rhizopus oryzae* superexpressas na levedura *Pichia pastoris*. A imobilização em um suporte hidrofóbico (Accurel MP-1000) foi otimizada. A atividade máxima foi $220 \pm 42 \text{ U.g}^{-1}$ de suporte pelo método do *p*NPP (palmitato de *para*-nitrofenila) em meio orgânico, obtida com uma razão proteína/suporte de 15 mg.g^{-1} . Algumas investigações relacionadas à estabilidade da enzima imobilizada em diferentes temperaturas e solventes também foram realizadas para a possível comparação com a enzima livre. Observou-se maior estabilidade para a enzima imobilizada do que a forma livre em solução, sendo mais estável em *n*-heptano na temperatura de 40°C , onde houve retenção de 77% da atividade após incubação por 24 h. Em estudos da síntese do oleato de etila, alguns parâmetros foram investigados, tais como a quantidade de catalisador e a razão molar dos substratos. Houve conversão em éster de 93% em 1 h de reação com uma produtividade de $1815 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ utilizando-se 70U de atividade de hidrólise contra a trioleína em meio orgânico (100 mg de suporte) e uma razão molar (ácido:álcool) de 1:3. O aumento da quantidade de substratos em 5 vezes em relação aos ensaios preliminares dobrou a produção do oleato de etila ($3537 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$) com conversão de 96% obtida em 0,5 h. Com o aumento de 10 vezes a quantidade de substratos em relação aos estudos preliminares a produtividade do oleato de etila quadruplicou ($7200 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$) com uma conversão de 76% em 0,5 h. A redução da quantidade de catalisador combinada com a otimização da temperatura, aumentou a produtividade para $10163 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, com conversão de 79% em 0,5 h. Quando foi realizada a reação na ausência do cossolvente, a produtividade de $1435 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ foi obtida, com somente 34% de conversão em 1,5 h. As altas produtividades obtidas neste trabalho indicam que a lipase recombinante de *R. oryzae* possui um bom potencial para aplicação em processos biocatalíticos em meio orgânico.

Palavras-chave: lipases, imobilização, síntese de ésteres, oleato de etila, *Rhizopus oryzae*, lipases recombinantes.

ABSTRACT

Fatty acid esters are used in the production of aromas, soaps, medicines, perfumes, cosmetics, foods and biofuels. In recent years there has been a surge of interest in using lipases to catalyze their synthesis, as the biocatalytic route has several advantages over the chemical route. The principal objective of this research was to study the synthesis of ethyl oleate using a lipase of *Rhizopus oryzae* that had been expressed in *Pichia pastoris*. The immobilization of the enzyme on a hydrophobic support (Accurel MP-1000) was optimized. The maximum activity obtained was 220 ± 42 units of *p*NPP (*p*-nitrophenyl palmitate)-hydrolyzing activity per gram of support, for a reaction carried out in *n*-heptane, which was obtained with a protein:support ratio of 15 mg g^{-1} . The stability of the immobilized enzyme at various temperatures and in various solvents was compared with that of the free enzyme. The immobilized enzyme was more stable than the free enzyme, being most stable in *n*-heptane at 40°C , amongst the conditions that were tested, under which condition 77% of activity was retained after 24 h. In studies of the synthesis of ethyl oleate, the effects of the amount of enzyme and the molar ratio of the substrates were investigated. A conversion of 93% in 1 h, representing a productivity of $1815 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, was obtained with 70 U of triolein-hydrolyzing activity (100 mg of support) and an acid:alcohol molar ratio of 1:3. A 5-fold increase in the quantity of substrates in relation to the preliminary studies doubled the productivity of ethyl oleate ($3537 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$), with a conversion of 96% being obtained in 0.5 h. A 10-fold increase in the quantity of substrates in relation to the preliminary studies quadrupled the productivity of ethyl oleate ($7200 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$) with 76% conversion in 0.5 h. A reduction in the amount of catalyst added, combined with optimization of the temperature, increased the productivity to $10163 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, with 79% conversion in 0.5 h. When the reaction was undertaken in the absence of *n*-heptane, a productivity of $1435 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ was obtained, with only 34% conversion in 1.5 h. The high productivities obtained in this work indicate that the recombinant lipase of *R. oryzae* has a good potential for application in biocatalytic processes undertaken in organic media.

Keywords: lipases, immobilization, synthesis of esters, ethyl oleate, *Rhizopus oryzae*, recombinant lipases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASES	21
FIGURA 2	- REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES	22
FIGURA 3	- VARIAÇÕES DO N-TERMINAL DO GENE QUE SINTETIZA A LIPASE DE <i>R. oryzae</i>	25
FIGURA 4	- ESTRUTURA DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> NA PRESENÇA DE TRICAPRILINA (TC8)	28
FIGURA 5	- PRINCIPAIS MÉTODOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	32
FIGURA 6	- ATIVAÇÃO INTERFACIAL DE LIPASES EM SUPORTES HIDROFÓBICOS	34
FIGURA 7	- EQUAÇÃO GERAL DE UMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	46
FIGURA 8	- MECANISMO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADO PELA LIPASE DE <i>Candida rugosa</i> (CRL).....	47
FIGURA 9	- EQUAÇÃO GERAL PARA UMA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO	48
FIGURA 10	- MECANISMO PROPOSTO PARA A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA	49
FIGURA 11	- EQUAÇÃO GERAL DE UMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	59
FIGURA 12	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE P-NITROFENILA CATALISADA POR LIPASES	63
FIGURA 13	- PRINCÍPIO DO MÉTODO DE TITULAÇÃO DO pH-STAT	66
FIGURA 14	- ESTRUTURA DO COMPLEXO FORMADO ENTRE O ÍON Cu^{2+} E OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM SOLUÇÃO	69
FIGURA 15	- ELETROFORESE SDS-PAGE DO EXTRATO LIPOLÍTICO DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	73
FIGURA 16	- EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS	76
FIGURA 17	- EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE de <i>Rhizopus oryzae</i> UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS	77
FIGURA 18	- EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	79
FIGURA 19	- EFEITO DO pH SOBRE A ESTABILIDADE LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	80

FIGURA 20	- CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> EM ACCUREL MP-1000 EM TERMOS DE ATIVIDADE RESIDUAL DO SOBRENADANTE.....	20
FIGURA 21	- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA E DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> NO TEOR DE PROTEÍNAS RESIDUAIS	83
FIGURA 22	- ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> IMOBILIZADA, EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA OFERECIDA PARA A IMOBILIZAÇÃO (MÉTODO pNPP MEIO ORGÂNICO)	85
FIGURA 23	- FOTOMICROGRAFIA DO SUPORTE ACCUREL MP 1000 ANTES (A,B,C) E APÓS (D,E,F) A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> . AUMENTO: (A,D) 500, (B,E) 1500, (C,F) 3000	86
FIGURA 24	- PERFIL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DURANTE A HIDRÓLISE DA TRIOLEÍNA CATALISADA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> IMOBILIZADA EM MEIO ORGÂNICO	87
FIGURA 25	- ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> IMOBILIZADA SOB ARMAZENAMENTO A 4°C	88
FIGURA 26	- ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> LIVRE E IMOBILIZADA A TEMPERATURA.....	91
FIGURA 27	- ATIVIDADE RESIDUAL DE HIDRÓLISE DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> IMOBILIZADA APÓS INCUBAÇÃO EM SOLVENTES ORGÂNICOS	93
FIGURA 28	- CINÉTICA DA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	95
FIGURA 29	- INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE CATALISADOR NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	97
FIGURA 30	- INFLUÊNCIA DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	99
FIGURA 31	- ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> NO COSSOLVENTE E SUBSTRATOS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DIFERENTES TEMPOS..	100
FIGURA 32	- CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA UTILIZANDO UMA CONCENTRAÇÃO 5x MAIOR DE SUBSTRATOS EM RELAÇÃO AOS ENSAIOS PRELIMINARES (FIGURAS 28, 29 E 30).....	103

FIGURA 33	- INFLUÊNCIA DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS EM 10x EM RELAÇÃO AOS ENSAIOS PRELIMINARES (FIGURAS 28, 29 E 30) E DA ADIÇÃO DE ETANOL EM ETAPAS NA CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA	105
FIGURA 34	- ATIVIDADE DE HIDRÓLISE RESIDUAL DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> APÓS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO MOSTRADAS NA FIGURA 30, COM DIFERENTES ETAPAS DE ADIÇÃO DE ETANOL	106
FIGURA 35	- INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE PENEIRA MOLECULAR NA CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA	108
FIGURA 36	- REAVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE CATALISADOR (ROL RECOMBINATE) NA CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA	110
FIGURA 37	- EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	111
FIGURA 38	- COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÉSTERES PARA UMA MESMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM N-HEPTANO, CATALISADA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	115
FIGURA 39	- INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE COSSOLVENTE NA CINÉTICA DE ESTERIFICAÇÃO DO OLEATO DE ETILA EM N-HEPTANO PELA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	117
FIGURA 40	- INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE COSSOLVENTE NA PRODUTIVIDADE DO OLEATO DE ETILA EM N-HEPTANO PELA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE EXTRACELULAR DE <i>Rhizopus oryzae</i>	26
TABELA 2	- PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> EXPRESSA EM <i>Pichia pastoris</i>	30
TABELA 3	- DIFERENTES TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÕES DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	35
TABELA 4	- CARACTERÍSTICAS DO SUPORTE HIDROFÓBICO DE IMOBILIZAÇÃO UTILIZADO NESTE TRABALHO.....	54
TABELA 5	- FATORES DE CORREÇÃO PARA OS SUBSTRATOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO	67
TABELA 6	- ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> RECOMBINANTE COM DIFERENTES SUBSTRATOS EM MEIO AQUOSO	74
TABELA 7	- EFICIÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA POR GRAMA DE SUPORTE	84
TABELA 8	- ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES POR REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES	114
TABELA 9	- ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES LIVRE DE SOLVENTE CATALISADA POR LIPASES	120



LISTA DE SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
BSP	- Biomass Support Particles
DAGs	- Diacilgliceróis
GRAS	- Generally Regarded as Safe
LTEB	- Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
MAGs	- Monoacilgliceróis
MSF	- Mesocellular Foam
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
PAOX	- Promotor do gene AOX que codifica uma álcool oxidase
ROL	- Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
SDS-PAGE	- Gel de eletroforese composto por poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
TAGs	- Triacilgliceróis
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A_{ti}	- Atividade enzimática inicial
A_{tf}	- Atividade enzimática final
a_w	- Atividade de água
C_{ang}	- Coeficiente angular
E	- Eficiência de imobilização
FC	- Fator de correção
g_{cat}	- grama de catalisador
m	- massa
m_{enz}	- massa da enzima (mg)
mg_{ptn}	- miligrama de proteína
ND	- número de diluições
$\log P$	- Logarítmo do coeficiente de partição
pI	- Ponto Isoelétrico
pNP	- <i>para</i> -nitrofenol
$pNPP$	- palmitato de <i>para</i> -nitrofenila
PVC	- policloreto de vinila
RM	- Razão molar
T	- Tempo
T	- Temperatura
U	- Unidades de atividade enzimática
V	- Volume
ϵ	- Coeficiente de extinção molar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 LIPASES	20
2.1.1 Definição e Características	20
2.1.2 Fonte de Lipases	23
2.1.3 Lipases Produzidas pelo Fungo <i>Rhizopus oryzae</i>	24
2.1.3.1 Lipase Recombinante de <i>Rhizopus oryzae</i>	28
2.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES	30
2.2.1 Principais Métodos de Imobilização.....	31
2.2.2 Lipases de <i>R. oryzae</i> Imobilizadas	34
2.3 BIOCATÁLISE EM MEIO ORGÂNICO.....	37
2.3.1 Meios Aquo-Restritos	37
2.3.2 Fatores que Podem Influenciar o Processo Biocatalisado	39
2.3.2.1 Água	39
2.3.2.2 Solventes	40
2.3.2.3 Temperatura.....	42
2.4 LIPASES NA SÍNTESE DE ÉSTERES - PRINCIPAIS APLICAÇÕES	43
2.4.1 Mecanismos de Reações Enzimáticas Para a Síntese de Ésteres	46
2.4.1.1 Reação de Esterificação	46
2.4.1.2 Reação de Transesterificação	48
3. OBJETIVOS	50
3.1 OBJETIVO GERAL	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 LIPASE	51
4.1.1 Eletroforese SDS – PAGE	52
4.1.2 Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade.....	53
4.1.3 Efeito do pH na Atividade e na Estabilidade.....	53
4.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM ACCUREL MP-1000	54
4.2.1 Descrição do Suporte para a Imobilização	54
4.2.2 Procedimento de Imobilização	54
4.2.3 Determinação da Quantidade de Proteína a ser Oferecida para Imobilização	55
4.2.4 Cinética da Imobilização	55
4.2.5 Estabilidade da Enzima Imobilizada ao Armazenamento	56

4.2.6 Estabilidade da Enzima Imobilizada à Temperatura e em Solventes Orgânicos	56
4.2.7 Determinação da Atividade de Hidrólise da Enzima Imobilizada em Meio Orgânico.....	57
4.2.7.1 Método do pNPP	57
4.2.7.2 Hidrólise da Trioleína	58
4.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS UTILIZANDO A LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> IMOBILIZADA	58
4.3.1 Procedimento Padrão para a Reação de Esterificação em <i>n</i> -Heptano	58
4.3.1.1 Influência da Concentração de Lipase Imobilizada	59
4.3.1.2 Influência da Razão Molar dos Substratos	59
4.3.2 Estabilidade da Enzima Imobilizada Frente a Elevadas de Substratos	60
4.3.3 Efeito do Aumento da Concentração dos Substratos e da Adição do Etanol em Etapas	60
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	62
4.4.1 Determinação da Atividade Lipolítica	62
4.4.1.1 Método de Hidrólise do pNPP em Meio Aquoso	62
4.4.1.2 Método de Hidrólise do pNPP em Solvente Orgânico	64
4.4.1.3 Método Titulométrico (pH-Stat)	65
4.4.2 Determinação de Proteínas	67
4.4.3 Método de Análise das Amostras Proveniente das Reações de Esterificação e Hidrólise em Meio Orgânico	67
4.4.3.1 Método de Lowry-Tinsley	67
4.4.4 Método de Análise das Amostras Provenientes das Reações de Esterificação por Cromatografia Gasosa	69
4.4.4.1 Quantificação do Teor de Éster nas Amostras por Padronização Interna	69
4.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	71
4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS.....	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA	72
5.1.1 Eletroforese SDS-Page	72
5.2 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA ENZIMA LIVRE	73
5.2.1 Atividade de Hidrólise	73
5.2.2 Efeito do pH e Temperatura Sobre a Atividade da Enzima	75
5.2.2.1 Temperatura	75
5.2.2.2 pH	76
5.2.3 Estudos de Estabilidade da Enzima	77
5.2.3.1 Efeito da Temperatura	77
5.2.3.2 Efeito do pH	79

5.3 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO	81
5.3.1 <i>Determinação da Quantidade de Proteína a ser Oferecida para Imobilização</i>	81
5.3.2 <i>Eficiência da Imobilização</i>	83
5.3.3 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	85
5.3.4 <i>Atividade de Hidrólise Contra Trioleína em Meio Orgânico</i>	86
5.3.5 <i>Estabilidade ao Armazenamento</i>	88
5.3.6 <i>Estabilidade à Temperatura - Enzima Imobilizada x Enzima Livre</i>	89
5.3.7 <i>Estabilidade em Solventes Orgânicos</i>	91
5.4 BIOCATALÍSE UTILIZANDO A LIPASE RECOMBINANTE DE <i>Rhizopus oryzae</i>	94
5.4.1 <i>Síntese do Oleato de Etila</i>	94
5.4.1.1 Efeito da Quantidade de Lipase Imobilizada na Velocidade da Reação de Esterificação	96
5.4.1.2 Efeito da Razão Molar dos Substratos na Reação de Esterificação ...	98
5.4.1.3 Estabilidade da Enzima Imobilizada Frente a Elevadas Concentrações de Substratos	99
5.4.1.4 Efeito do Aumento da Concentração de Substratos (5x) na Velocidade da Reação de Esterificação	101
5.4.1.5 Efeito do Aumento da Concentração de Substratos (10x) na Velocidade da Reação de Esterificação	103
5.4.1.6 Estudos de Inibição da Enzima pelo Etanol	106
5.4.1.7 Efeito da Adição de Peneira Molecular	107
5.4.1.8 Reavaliação do Efeito da Quantidade de Catalisador no Meio Reacional	109
5.4.1.9 Efeito da Temperatura	110
5.4.1.10 Validação dos Resultados de Síntese do Oleato de Etila por GC....	115
5.4.1.11 Efeito da Presença do Cossolvente no Rendimento da Reação	116
6. CONCLUSÕES	121
7. PERSPECTIVAS	123
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

1. INTRODUÇÃO

Os ésteres são compostos orgânicos de grande importância industrial que podem ser obtidos por síntese química ou enzimática (esterificação, transesterificação ou interesterificação), ou por extração de matérias-primas vegetais utilizando-se o solvente adequado. As reações que envolvem a síntese de ésteres por via química requerem emprego de um catalisador, geralmente ácidos ou bases. No entanto, com este tipo de catalisador, os processos de purificação dos produtos da reação podem ser onerosos, além disso, os produtos gerados não possuem um grau de pureza elevado (ABBAS e COMEAU, 2003).

Os processos de síntese de ésteres que utilizam lipases como catalisadores podem ser conduzidos em condições brandas quando comparados aos processos que empregam catalisadores inorgânicos, o que permite um menor consumo energético e evita a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Além disso, o emprego de lipases e enzimas de modo geral possui como vantagens a sua elevada especificidade, a diminuição de riscos para a saúde e os baixos níveis de ocorrência de reações laterais. Entretanto, as enzimas estão sempre sujeitas à inativação (por inibição ou desnaturação) por fatores físicos como temperatura, pressão, choque mecânico entre outros, ou por fatores químicos resultantes da interação de certos compostos com a enzima. Estes fatores, juntamente com o fato de muitas lipases apresentarem baixa atividade e estabilidade nos meios reacionais orgânicos, podem tornar o processo enzimático de síntese de ésteres mais caro se comparado ao processo químico.

Para resolver os problemas associados à síntese de ésteres por lipases, é importante isolar e caracterizar enzimas com a finalidade de aplicação em meios aquo-restritos, pois é a partir da prospecção de novas enzimas com atividade e estabilidade nestes meios que o processo enzimático de síntese torna-se viável industrialmente. Porém, muitas lipases, que são ativas e estáveis em meios aquosos, podem ser inibidas ou desnaturadas pelos solventes orgânicos e substratos do meio reacional, sendo este o caso da síntese enzimática de ésteres alquílicos (metílicos ou etílicos). Além do isolamento de novas lipases com atividade

e estabilidade, é importante que a enzima seja imobilizada sobre um suporte sólido, pois a imobilização, além de tornar as enzimas mais estáveis e ativas em muitos casos, permite que estas possam ser reutilizadas várias vezes e facilita sua separação do meio reacional.

Dentro deste contexto, a proposta geral desse projeto de mestrado é o estudo do processo de síntese enzimática de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* imobilizada em suporte hidrofóbico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPASES

2.1.1 Definição e Características

Carboxilesterases incluem duas classes de enzimas presentes em todos os organismos vivos, designadas de esterases e lipases. Esterases e lipases foram primeiramente diferenciadas em função da especificidade ao substrato. Era estabelecido que a atividade de esterases limitava-se às soluções aquosas de ésteres de cadeia curta, e lipases hidrolisavam especificamente emulsões de triacilgliceróis insolúveis em água (TSUJITA et al., 1990). Mais tarde, uma classificação alternativa de carboxilesterases com base em sua homologia de aminoácidos foi proposta. De acordo com HEMILA, KOIVULA e PALVA (1994) as enzimas da super família de lipases e esterases foram divididas em três famílias, ou seja, a família LPL, que inclui a lipase lipoprotéica e as lipases hepáticas e pancreáticas, a família EST (colinesterase e lipases de *Geotrichum* e *Candida rugosa*) e a família da lipase sensível a hormônio (HSL).

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases, classificadas como serina hidrolases e são constituídas pela tríade catalítica G-X₁-S-X₂-G, onde G= glicina e S= Serina (SAXENA et al., 2003). Geralmente apresentam massa molecular de 20 a 40 kDa, mas lipases com massas moleculares menores ou maiores também são relatadas, como por exemplo 12 kDa (BANDMANN et al., 2000) e 69 kDa (DHARMSTHITI e LUCHAI, 1999). As lipases atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces de lipídio/água, hidrolisando, preferencialmente, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), seus substratos naturais, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; JAEGER et al., 1994), (Figura 1).

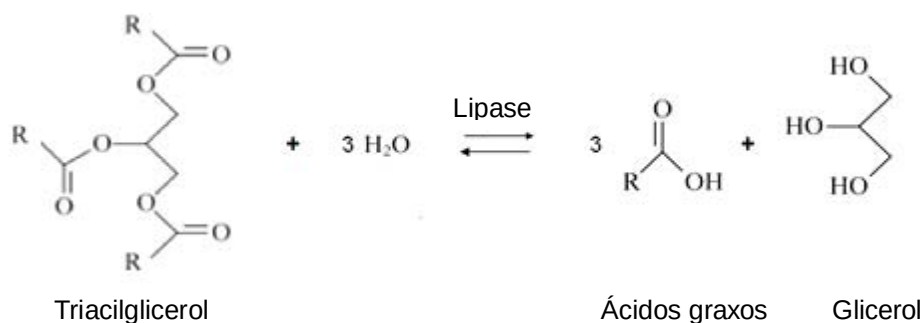


FIGURA 1 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASES

Com relação à sua estrutura, as lipases possuem um dobramento característico na conformação α/β hidrolase, que também é encontrado em esterases e proteases. Esterases, no entanto, atuam sobre triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia curta, liberando ácidos graxos de baixa massa, enquanto que lipases hidrolisam triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplices (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). É importante salientar que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). Além disso, algumas lipases possuem uma tampa hidrofóbica (*lid*), que controla o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. A tampa hidrofóbica se move somente na interface lipídio-água, sendo esta uma das explicações para o chamado fenômeno de ativação interfacial (BRADY et al., 1990). Este fenômeno caracteriza-se pela ativação de uma lipase na presença de uma interface óleo-água, causada pela mudança conformacional e exposição do sítio ativo da enzima, permitindo a catálise da reação (BRADY et al., 1990). Entretanto, para algumas lipases observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial (THOMAS et al., 2005), como, por exemplo, no caso das lipases 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 possuem uma *lid* incompleta ou não possuem *lid* e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica como é o caso da lipase de *Bacillus subtilis* (ALI et al., 2004; NINI et al., 2001; CYGLER e SCHRAG, 1997).

Em meios aquo-restritos, onde o solvente não é a água, as lipases também têm se mostrado ativas, o que tem propiciado sua utilização em reações de esterificação, interesterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise) e aminólise, apresentando alta especificidade e estabilidade em condições brandas (BORNSCHEUER et al., 2002) (Figura 2).

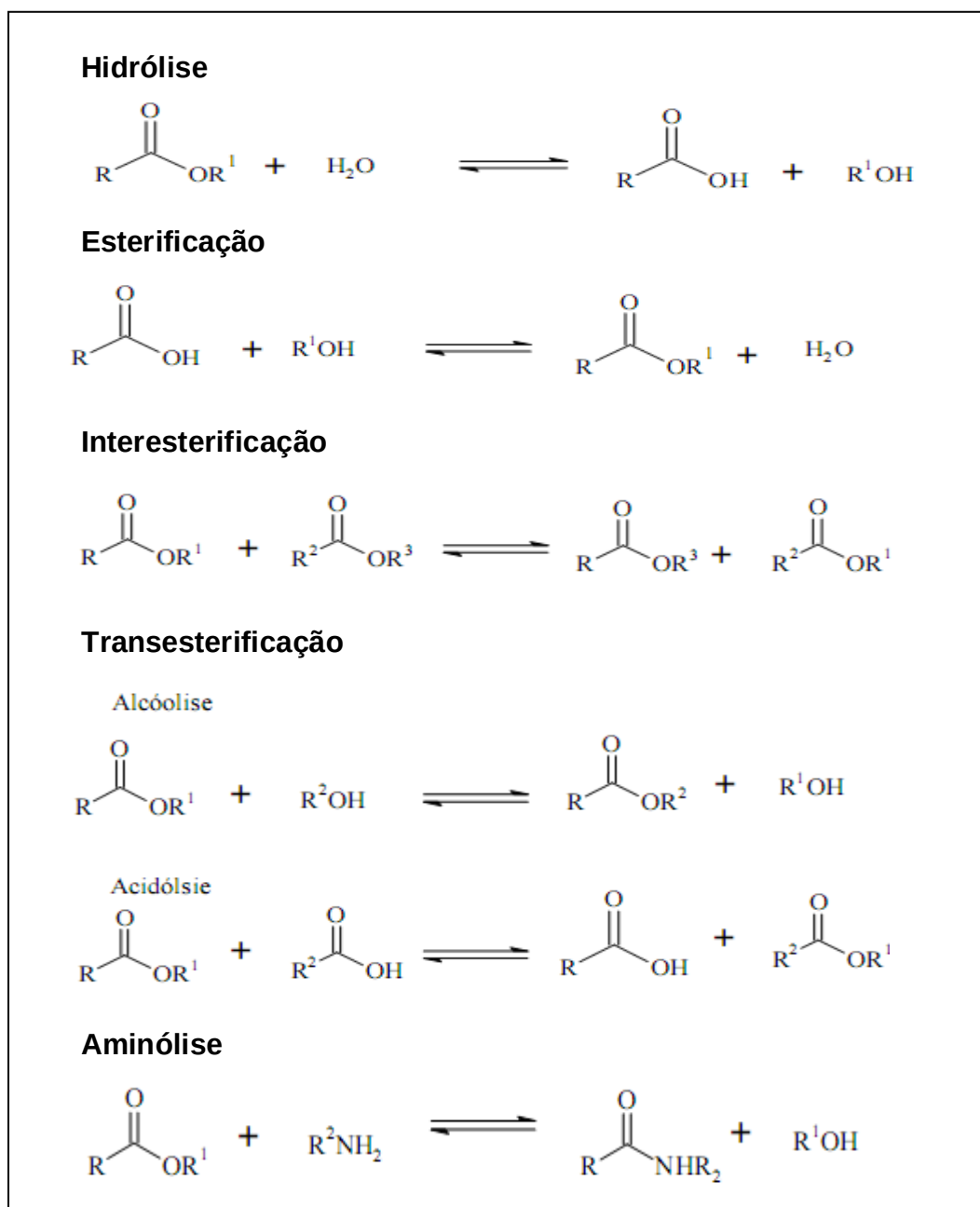


FIGURA 2 - REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Fonte: VILLENEUVE et al. (2000)

Mesmo existindo vários substratos conhecidos para lipases, suas aplicações são limitadas devido à insolubilidade dos substratos e equilíbrio termodinâmico não-favorável das reações catalisadas na presença de água (BORNSCHEUER et al., 2002). Estes problemas podem ser superados pela troca de água por solventes orgânicos como meio de reação. No entanto, a atividade exibida pelas enzimas em solventes orgânicos é significativamente menor do que em água, principalmente devido à agregação da enzima em solventes orgânicos (KLIBANOV, 1997). Sendo assim, métodos para melhorar o desempenho das enzimas em biocatálise, como a imobilização sobre suportes sólidos, vêm sendo descritos na literatura e utilizados.

2.1.2 Fontes de Lipases

Lipases existem em animais, plantas e microrganismos (GANGADHARA, KUMAR e PRAKASH, 2009; PAQUES et al., 2008; MELO, PASTORE e MACEDO, 2005). Lipases microbianas são as mais utilizadas industrialmente devido à maior estabilidade, especificidade do substrato e os custos de produção são mais baixos quando comparados com outras fontes. Além disso, a grande biodiversidade de microrganismos aumenta a sua importância biotecnológica e justifica a busca de novas lipases (CONTESINI et al., 2010). Os fungos filamentosos são considerados como os melhores produtores de lipases e atualmente são as fontes preferenciais, uma vez que produzem lipases extracelulares, facilitando a extração dos meios de fermentação (CONTESINI et al., 2010) e também porque muitos fungos não são nocivos à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe, JAEGER et al., 1994). As espécies mais utilizadas pertencem aos gêneros *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (HITA et al., 2009). O uso da evolução dirigida pode ser muito útil para otimizar lipases existentes com relação as propriedades desejadas (CONTESINI et al. 2010). A evolução dirigida é composta por duas etapas que são: 1) geração aleatória de bibliotecas de mutantes; 2) identificação de variantes desejadas dentro destas bibliotecas usando um sistema de seleção. Duas estratégias diferentes para a geração de bibliotecas de mutantes têm sido descritas. Uma delas é a evolução assexuada (não-recombinante) em que um gene está sujeito à mutagenese aleatória

para a produção de variantes com mutações pontuais. E a outra é a evolução sexuada (recombinação) em que vários genes são aleatoriamente fragmentados, embaralhados e reconstruídos para criar um “pool” de genes recombinantes. Das bibliotecas resultantes, variantes desejadas devem ser identificadas pela triagem de alto rendimento ou por métodos de seleção (BORNSCHEUER, 2008).

Outro método que tem sido explorado nos últimos anos para a descoberta de novas enzimas de interesse biotecnológico, incluindo lipases e esterases, quitinases, celulasas e amilases, é a metagenômica, que baseia-se na clonagem do DNA diretamente sem cultura microbiana (TIRAWONGSAROJ et al., 2008; REES et al., 2003; COURTOIS et al., 2003; HENNE et al., 2000; COTTRELL, MOORE e KIRCHMAN, 1999). O solo é um exemplo de ambiente utilizado para o isolamento de novas lipases e por ser um ambiente muito diverso pode ser um desafio para o estudo da microbiologia. Na maioria das vezes, métodos padrões de cultura são limitados pelo fato de que somente aproximadamente 1% dos microrganismos de ambiente natural podem ser cultivados em laboratório. Sendo assim, mais que 99% de microrganismos atualmente não identificados e não explorados podem ser fontes de novas enzimas (BUNTERNGSOOK et al., 2010). Espera-se que enzimas caracterizadas de microrganismos não cultivados em laboratório, especialmente aqueles que existem em ambientes extremos, exibam propriedades especiais, como a alta especificidade e a alta atividade em condições extremas de pH e temperatura, o que pode ser uma vantagem para a utilização em processos industriais rigorosos (BUNTERNGSOOK et al., 2010).

2.1.3 Lipases Produzidas pelo Fungo *Rhizopus oryzae*

A produção de lipases extracelulares por espécies de *Rhizopus* tem sido relatada durante muitos anos (SALAH et al, 2001, 2006; SAYARI et al., 2005; BEER et al., 1998; KOHNO et al., 1994). A maioria dos estudos utiliza lipases de fungos e referem sua aplicação em indústrias de alimentos e aromas, farmacêuticas e químicas (JAEGER e REETZ, 1998). As espécies de *Rhizopus* são principalmente divididas em três grupos, incluindo *R. microsporus*, *R. oryzae* e *R. stolonifer*, sendo

que a *R. oryzae* é a mais estudada (SALAH et al., 2009). Outras espécies foram nomeadas isoladamente como a *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. niveus* e *R. javanicus* as quais possuem variações mínimas em suas estruturas (SALAH et al., 2006).

A lipase produzida por *R. oryzae* compreende uma sequência sinal de 26 aminoácidos, uma pró-sequência de 97 aminoácidos (pró-lipase) e a região da lipase madura com 269 aminoácidos, sendo que a parte madura possui 29 kDa (BEER et al., 1998). Lipases de *R. oryzae* (ROL) são normalmente secretadas extracelularmente após a clivagem da pró-lipase. A pró-lipase é uma pró-sequência de aminoácidos presente no *n*-terminal da ROL cituada antes da sequência da lipase madura (Figura 3). A pró-sequência da ROL possui pelo menos duas funções importantes: 1) evita a toxicidade, sintetizando uma forma não-destrutiva; 2) ajuda no enovelamento e na formação de pontes dissulfeto da lipase por meio de uma via influenciada por um único resíduo de cisteína na pró-sequência (BEER et al, 1996). É sugerido que várias formas desta lipase são encontradas devido ao grau de ação proteolítica envolvido na clivagem pós-traducional, ao invés do envolvimento de diversos genes (BEER et al., 1998).

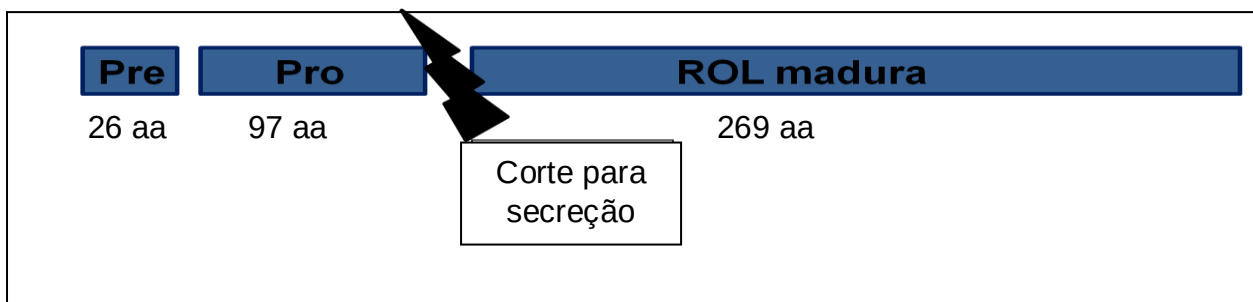


FIGURA 3 - VARIAÇÕES NO *n*-TERMINAL DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae*

Fonte: ADAPTADO VALERO (2009).

A existência de lipases intracelulares de fungos também foi descrita na literatura. Nakashima et al. (1988) utilizaram células de *R. chinensis* imobilizadas em espuma de poliuretano (BSPs) como biocatalisadores na forma de células inteiras, e encontraram que, com a imobilização celular e a adição de óleos no meio de fermentação, houve um aumento da produção de lipases intracelulares. A caracterização de lipases intracelulares foi realizada e os resultados mostraram que

fungos filamentosos imobilizados dentro de BSPs podem produzir isoformas no interior das células (ADAMCZAK e BEDNARSKI, 2004). Hama et al. (2006), com o objetivo de identificar a lipase responsável pela atividade em reações de metanólise utilizando células inteiras de *R. oryzae* determinaram a localização das lipases envolvidas na catálise. As análises por *western blot* mostraram que *R. oryzae* produziu dois tipos de lipases com massas moleculares de 34 e 31 kDa, sendo que a primeira (ROL 34) estava vinculada a parede celular, enquanto a segunda (ROL 31) era principalmente ligada à membrana celular (HAMA et al., 2006).

Embora dados da literatura comprovem a existência de lipases intracelulares de fungo *Rhizopus oryzae*, a maioria dos autores refere-se às lipases como sendo extracelulares, visto que estas são produzidas mais comumente.

Alguns autores descreveram que a lipase extracelular produzida pelo fungo *R. oryzae* (ROL) é um monômero que possui massa molecular em torno de 32 kDa, ponto isoelétrico (pI) de 6,9 e apresenta o fenômeno de ativação interfacial (SAYARI et al, 2005). Uma das principais características da lipase de *R. oryzae* é sua especificidade nas posições 1,3 do triacilglicerol, o que a faz ser muito utilizada em reações de modificação de lipídios (SCHEIB et al., 1998; MATORI, ASAHARA e OTA, 1991; OKUMURA, IWAI e TSUJISAKA, 1976). No entanto, devido ao fato de existir várias formas da lipase de *R. oryzae*, algumas características citadas conforme pode ser observado na Tabela 1, gera faixas de atuação no que se refere ao pH, temperatura e estabilidade.

TABELA 1 – PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE EXTRACELULAR DE *Rhizopus oryzae*

Propriedades da Lipase de <i>R. oryzae</i>		Referências
Massa Molecular (kDa)	31-32	Hama et al. (2006); Sayari et al. (2005); Salah et al. (2001).

TABELA 1 – PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE EXTRACELULAR DE *Rhizopus oryzae* (continuação)

Especificidade	1,3 específica	Scheib et al (1998); Matori et al (1991); Okumura et al (1976).
Ponto isoelétrico (pI)	6,85 – 7,1	Salah et al (2001); Hiol et al (2000).
Temperatura ótima (°C)	30 a 40	Karra-Châabouni et al (2008); Lopez et al (2008) ; Ghamgui et al (2007); Salah et al (2001) ; Hiol et al (2000) ; Essamri et al (1998).
pH ótimo	5,5 a 8,5	
Termoestabilidade	20 a 37°C (pH = 5,0 a 8,0)	Karra-Châabouni et al (2008); Ghamgui et al (2007) ; Hiol et al (2000).

Com relação à estrutura da lipase ROL, estudos de difração raio-X mostraram que a sua estrutura tridimensional apresenta um padrão conformacional comum, denominado de α/β hidrolase, composto de uma sequência de α -hélices e folhas β -pregueadas. A ROL possui em seu sítio ativo a tampa hidrofóbica *lid* (Figura 4) (BORNSCHEUER, 2008).

Na Figura 4, podem ser visualizados os resíduos de aminoácidos da lipase de *Rhizopus oryzae* (ROL) modificada por mutagênese de saturação para aumentar a estabilidade da ROL para aldeídos. A tampa hidrofóbica (*lid*) está representada pela cor vermelha, o sítio ativo aparece na cor rosa, e os resíduos de aminoácidos histidina, lisina e cisteína estão representados pelas cores alaranjada, azul e verde, respectivamente.

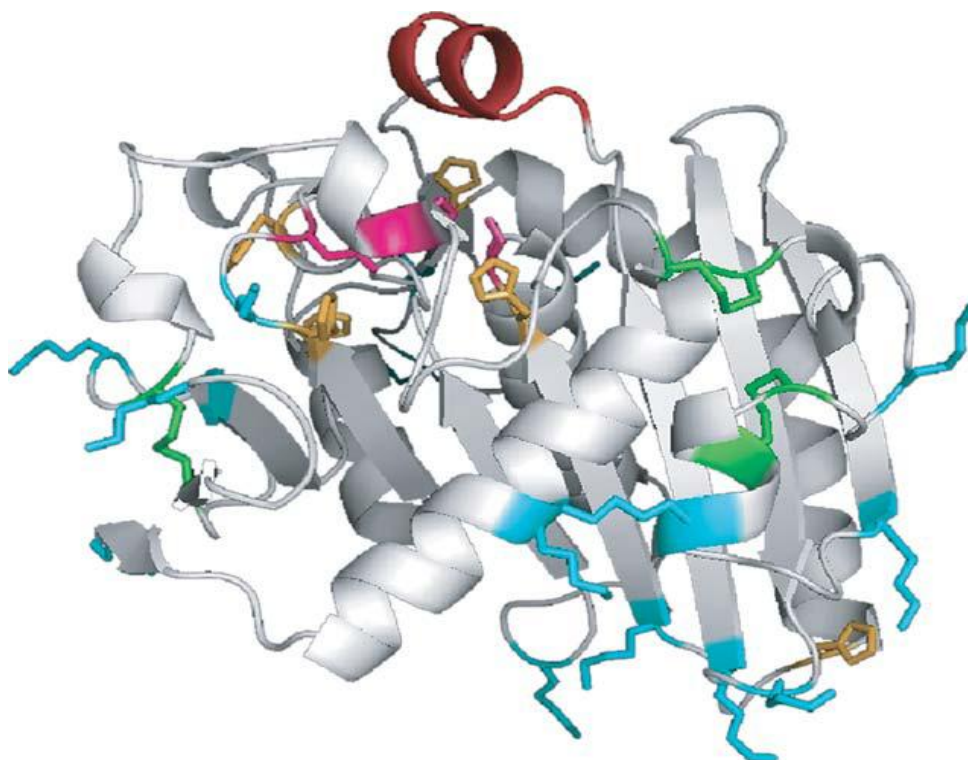


FIGURA 4 – ESTRUTURA DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* MODIFICADA GENETICAMENTE

Fonte: BORNSCHEUER (2008)

2.1.3.1 Lipase Recombinante de *Rhizopus oryzae*

Genes das lipases de *R. delemar* (DEREWENDA et al., 1984), *R. oryzae* (SAYARI et al., 2005; BEER et al., 1998) e *R. niveus* (KOHNO et al., 1994) já foram clonados e seqüenciados. Devido ao seu elevado grau de semelhança, lipases de *Rhizopus* podem fornecer um sistema interessante para estudar o significado de determinadas regiões e posições para sua seletividade de substrato e atividade. Embora alguns estudos de caracterização inicial com lipases de *Rhizopus* tenham sido realizados no passado, avanços reais na compreensão da estrutura e função destas enzimas foram lentos, geralmente devidos a alguns problemas encontrados durante os procedimentos de purificação (SALAH et al., 2009). Para evitar estes problemas, foi realizada a expressão específica das formas maduras destas lipases, através da construção de plasmídios, em *Escherichia coli* (DI LORENZO et al., 2005;

BEER et al., 1996, 1998), *Pichia pastoris* (SURRIBAS et al., 2007; COS et al., 2005; RESINA et al., 2004; MINNING, DANNERT-SCHIMIDT e SCHIMID,1998) e *Saccharomyces cerevisiae* (KOHNO et al., 1999).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é um excelente hospedeiro para a exógenos podem ser clonados em altos níveis colocando-os sob rígido controle do promotor PAOX 1 (álcool oxidase1), que é induzido por metanol e reprimido por outras fontes de carbono como glicose, glicerol e etanol (SREEKRISHNA et al.,1997). *P. pastoris* é um sistema hospedeiro muito utilizado, tanto em ensaios de bancada como em escala industrial, para a produção de uma ampla variedade de proteína heterólogas (RESINA et al., 2004). Este sistema possui muitas das vantagens da expressão eucariótica, como o processamento proteolítico, dobramento, formação de ligações dissulfeto, e glicosilação. Combina a habilidade de crescimento em meio mínimo e a alta densidade celular com a disponibilidade do controle (metanol-induzido), o promotor Álcool Oxidase1 (PAOX1) (LIN CEREGHINO e CREGG, 2000). Além disso, o sistema permite a eficiente secreção de proteína que, combinada com os níveis muito baixos de proteínas endógenas, é a maior vantagem quando da sua purificação.

Algumas características bioquímicas foram determinadas por Minning, Dannert-Schmidt e Schmid (1998) para a lipase de *R. oryzae* recombinante (Tabela 2). Na primeira característica descrita na Tabela 2 que é a massa molecular já pode-se observar diferença com a lipase nativa que possui massa molecular de 31 a 32 kDa (HAMA et al., 2006 ; SAYARI et al., 2005 ; SALAH et al., 2001). Quanto a especificidade ao substrato as lipases tanto nativa como recombinante são semelhantes, visto que ambas apresentaram maior atividade contra a trioleína (BEER et al., 1996; SALAH, FENFRI e GARGOURY, 1994). O ponto isoelétrico das lipases recombinante (8,3) e nativa (6,85 a 7,1) (SALAH et al., 2001; HIOL et al., 2000) é outra característica que torna as duas formas diferentes. Conforme relatado anteriormente, estas diferenças podem estar relacionadas às diferentes cepas do fungo de origem utilizadas e também aos procedimentos de superexpressão. Quanto à melhor temperatura para a atividade, a ROL recombinante (30°C) assemelha-se com a ROL nativa (30 a 40°C) (KARRA-CHAABOUNI et al., 2008 ; LOPEZ et al., 2008 ; GHAMGUI et al., 2007; HIOL et al., 2000 ; SALAH et al., 2001 ; ESSAMRI et

al., 1998), sendo que em termos de estabilidade a ROL recombinante se mostrou mais estável (20 a 45°C) que a ROL nativa (20 a 37°C) (KARRA-CHAABOUNI et al., 2008; GHAMGUI et al., 2007 ; HIOL et al., 2000) após incubação de 30 min. A faixa de pH em relação à estabilidade da enzima é mais ampla para a ROL nativa (5,0 a 8,0) visto que a lipase recombinante incubada em tampão com pH acima de 7,0 após 18 h de incubação, perde entre 20% (pH 7,5) e 80% da atividade residual (8,0).

TABELA 2 - PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* EXPRESSA EM *Pichia pastoris*

<i>Propriedades</i>	<i>Lipase de R. oryzae expressa em P. pastoris</i>
Massa molecular (kDa)	30
Especificidade	1,3 específica
Especificidade ao substrato	Triacilgliceróis de cadeia média e Trioléína
Ponto isoelétrico (pI)	8,3
Temperatura ótima (°C)	30
Termoestabilidade	20 a 45°C (pH = 6,0 a 7,0)

Fonte: MINNING, DANNERT-SCHIMIDT e SCHIMID (1998)

2.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

A imobilização de enzimas vem sendo utilizada durante algum tempo com o objetivo de reduzir problemas de instabilidade do biocatalisador (ALMEIDA et al., 2008). Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável, e a recuperação

da enzima do meio reacional pode ser difícil caso ela não esteja imobilizada sobre um suporte sólido (SILVA, CONTENSINI e CARVALHO, 2009).

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas ou localizadas em um suporte apropriado, tornando-as insolúveis em qualquer meio, mas permitindo que a enzima entre em contato com o substrato, catalisando as reações (GIRELLI e MATTEI, 2005; PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000).

De modo geral, entre as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas estão: a possibilidade de reutilização, a facilidade de recuperação dos produtos, a melhora do controle de operação de processos e reatores, e a minimização da 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 (MALCATA, HILL e AMUNDSON, 1992). Entretanto, foram também relatadas algumas desvantagens, como perda de atividade 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).

2.2.1 Principais Métodos de Imobilização

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos (GIRELLI e MATTEI, 2005). Os principais processos de imobilização de enzimas são por ligação ou encapsulação e estão resumidos na Figura 5 (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

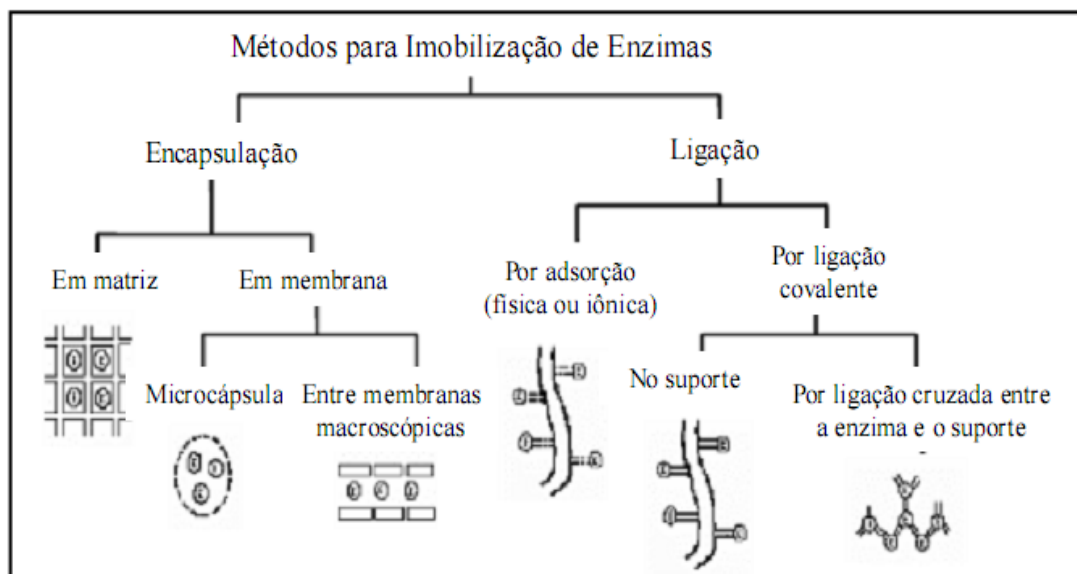


FIGURA 5 - PRINCIPAIS MÉTODOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Fonte: ADAPTADO (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

Com base na Figura 5, segue o detalhamento dos métodos de imobilização:

(a) Separação por membranas - neste método a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável. Por sua vez, este tipo pode ser subdividido em: (1) encapsulação, onde a enzima é imobilizada no interior de esferas não-rígidas, cujos envoltórios são constituídos por um polímero geleiforme e semipermeável; (2) confinamento da enzima em membranas fibrosas semipermeáveis. Para este método, as limitações difusionais são intensas; **(b) Microencapsulação**, que consiste na preparação de um sistema emulsionado, onde a enzima está confinada no interior de micelas; **(c) Entrelaçamento em polímeros** - 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; **(d) Por ligação covalente** - a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são normalmente estabelecidas entre os aminogrupos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima e 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 sua estrutura cataliticamente ativa (FORESTI e

FERREIRA, 2005); **(e) Imobilização por adsorção** - este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, por meio de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der Waals”, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas. 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 (SALIS et al., 2008).

Vários parâmetros importantes devem ser analisados para a escolha do suporte, são eles: força mecânica, estabilidade química e física, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de ligação com a enzima, custo, entre outros. A adsorção de lipases em suportes adequados tem sido a estratégia mais utilizada. Esta técnica é economicamente viável, atrativa e em alguns casos apresenta várias vantagens, principalmente quando as lipases são utilizadas em meio orgânico. Isto porque as lipases na forma imobilizada não são solúveis em meio orgânico. No entanto, em meio aquoso o ideal é utilizar lipases imobilizadas por ligação covalente, visto que podem ser reutilizadas mais vezes do que quando imobilizadas por outros métodos como a adsorção e aprisionamento (SILVA, CONTENSINI e CARVALHO, 2009).

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em suporte dependem de vários parâmetros, como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros (VILLENEUVE et al., 2000). Suportes porosos são vantajosos porque a enzima é adsorvida no interior dos poros, desde que seus diâmetros possam acomodar a enzima. A eficiência também depende da concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação (SOARES et al., 1999). Outro fator que também pode influenciar na adsorção da enzima pelo suporte é o pH da solução enzimática, que propicia valores máximos de adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Isto ocorre devido ao fato de que, no valor de pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada (VINU, MIYAHARA e ARIGA, 2005; GONÇALVES, 1999).

No caso específico de lipases, a adsorção envolve áreas hidrofóbicas em torno do sítio ativo da enzima, que é estabilizado com a “lid” na sua conformação aberta. Isto permite obter preparações imobilizadas altamente ativas, principalmente contra substratos hidrofóbicos (Figura 6) (MATEO et al., 2007). Algumas lipases não apresentam “lid”, no entanto contêm um número razoável de aminoácidos hidrofóbicos nas proximidades do sítio ativo (ALMEIDA et al., 2006), que podem interagir permitindo a formação de um ambiente que envolve a superfície do sítio ativo e o substrato, melhorando a eficiência catalítica da enzima.

Dada a grande superfície hidrofóbica em torno do sítio ativo, a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é mais vantajosa uma vez que pode propiciar: (1) a ativação da maioria das lipases, (2) a seletividade da adsorção que em alguns casos promove a purificação da lipase, (3) maior enantioseletividade da lipase (MATEO et al., 2007).

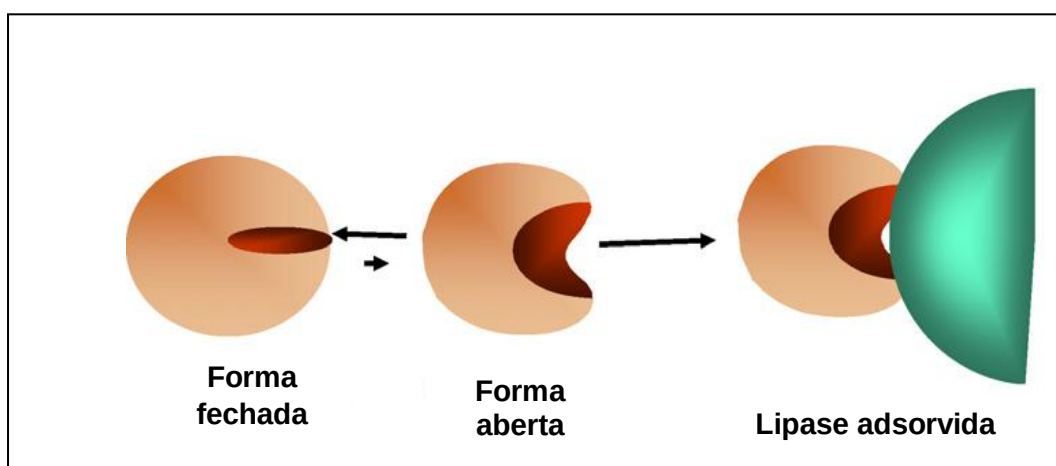


FIGURA 6 – ATIVAÇÃO INTERFACIAL DE LIPASES EM SUPORTES HIDROFÓBICOS

Fonte: MATEO et al. (2007).

2.2.2 Lipases de *R. oryzae* Imobilizadas

Com relação às lipases de *R. oryzae*, são relatados diferentes tipos de imobilização, assim como diferentes aplicações destas enzimas imobilizadas. Conforme pode ser observado na Tabela 3, quando Arai et al. (2010) utilizaram a

lipase de *R. oryzae* imobilizada em partículas de biomassa (BSPs) em reações de transesterificação para produção de biodiesel, a estabilidade da lipase foi maior após ser imobilizada e ativada com glutaraldeído. Shakeri e Kawakami (2009) verificaram que a atividade específica da ROL imobilizada em MSF (Espuma Esférica Mesocelular) de cadeia longa, na reação de transesterificação, foi 73 vezes maior que aquela da enzima livre. A ROL imobilizada em MSF pôde ser reutilizada por 8 vezes sem significativa perda da atividade. Resultados semelhantes foram encontrados por Kawakami et al. (2009) em que, por metanólise de triglicerídeos, a lipase imobilizada em sílica exibiu 10 vezes maior atividade que a lipase não-imobilizada. Outros autores verificaram maior estabilidade tanto em temperatura como em pH da ROL após ser imobilizada (KARRA-CHÂABOUNI et al. e LOPEZ et al., 2008; GHAMGUI et al., 2007; HITA et al., 2007; ODA et al., 2005). A atividade de esterificação da ROL livre e imobilizada também foi comparada e observaram-se que com a lipase na forma imobilizada houve em aumento acentuado da atividade, o que está relacionado à maior estabilidade apresentada pela lipase imobilizada (SALAH et al., 2007).

TABELA 3 – DIFERENTES TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÕES DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae*

<i>Procedência da lipase</i>	<i>Suporte/Tipo de imobilização</i>	<i>Finalidade</i>	<i>Referência</i>
Cepa IFO 4697	Suporte de partículas de biomassa (BSPs) (Encapsulação e ligação cruzada com glutaraldeído)	Síntese de ésteres para biodiesel	ARAI et al. (2010)
Amano Enzyme Inc. Triblock (tipo F-AP15)	Espuma esférica mesocelular (MSF) (Adsorção)	Síntese de ésteres para aromas (n-butirato de vinila)	SHAKERI e KAWAKAMI (2009)

TABELA 3 – DIFERENTES TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÕES PARA A LIPASE DE *Rhizopus oryzae* (continuação)

<i>Procedência da lipase</i>	<i>Suporte/Tipo de imobilização</i>	<i>Finalidade</i>	<i>Referência</i>
Amano Enzyme Inc. Triblock	Monólito de sílica (Encapsulação)	Síntese de ésteres metílicos para biodiesel	KAWAKAMI et al. (2009)
CECT 2340	Alginato de cálcio (Encapsulação)	Produção e imobilização de lipases em biorreator	LÓPEZ et al. (2008)
Não relatada (isolada do óleo de oliva em decomposição)	Fibras de celulose (Adsorção)	Caracterização da lipase livre e imobilizada e sua aplicação na síntese de ésteres (oleato de butila)	KARRA-CHÂABOUNI et al. (2008)
Não relatada	CaCO ₃ (Adsorção)	Caracterização da lipase livre e imobilizada e sua aplicação na síntese de ésteres	GHAMGUI et al. (2007)
Cepa WPG	Celite 545 (Adsorção)	Produção do éster acetato de butila (aroma de abacaxi)	SALAH et al. (2007)
Cepa IFO 4697	Espuma de Poliuretano Reticulada (Encapsulação e ligação cruzada com glutaraldeído)	Comparação entre células imobilizadas em frascos agitados e em biorreator e aplicação na síntese de ésteres	ODA et al. (2005)

2.3 BIOCATÁLISE EM MEIO ORGÂNICO

2.3.1 Meios Aquo-Restritos

A catálise enzimática em meios orgânicos (ou aquo-restritos) tem como principal vantagem realizar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água. Além disso, é possível deslocar o equilíbrio termodinâmico da reação pela diminuição da quantidade de água do meio reacional. As reações realizadas em solventes orgânicos apresentam como vantagens a diminuição do número de reações indesejáveis como por exemplo a hidrólise dos produtos, a simplificação dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador, a diminuição do risco de contaminação microbiana, a redução de possíveis inibições de substratos e produtos e o aumento da estabilidade da enzima (KRIEGER et al., 2004). No entanto, mesmo que existam vantagens na realização de reações em meios aquo-restritos, a tendência de solventes orgânicos em remover as moléculas de água da superfície da enzima especialmente no sítio ativo, pode torná-la inativa (AHMED, RAGHAVENDRA e MADAMWAR, 2010). Para superar estas limitações, várias estratégias já foram descritas na literatura como a modificação química dos aminoácidos da superfície da enzima, engenharia de proteínas, engenharia do meio reacional, entre outras (AHMED, RAGHAVENDRA e MADAMWAR, 2010). Alternativamente, também tem sido proposto que ao invés de modificar a enzima para aumentar a estabilidade em solvente, seria mais conveniente realizar uma triagem de enzimas naturalmente tolerantes em solventes para aplicações em reações de síntese em meios não-aquosos (DANDAVATE et al., 2009).

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, pois o solvente pode afetar a atividade e a estabilidade da enzima. Os solventes hidrofóbicos são menos nocivos à enzima, pois interagem menos com a água de hidratação necessária para manter a enzima cataliticamente ativa, sendo que, os solventes hidrofílicos, que contêm maior quantidade de grupos polares, tendem a retirar a água de hidratação, acarretando a perda da atividade enzimática (FABER, 2004).

Além do efeito dos solventes na atividade, estabilidade e especificidade da enzima ou nas suas relações com a água, o efeito do solvente na constante de equilíbrio das reações deve ser considerado, pois este efeito pode ser utilizado para deslocamento do equilíbrio no sentido desejado, como já mencionado anteriormente. A condição de equilíbrio é determinada pelas interações entre os reagentes, os produtos e o solvente; a natureza e o comportamento do catalisador influenciarão apenas na velocidade com que o sistema atinge o equilíbrio (HALLING, 1990).

Um dos assuntos que vêm sendo bastante estudado em biocatálise em solventes orgânicos é a utilização de sistemas livres de solventes, onde o meio reacional é composto pelos substratos da reação. Se esta possibilidade for viável, ocorre a combinação da precisão da catálise biológica com os altos níveis de produtividade, tornando os processos biocatalíticos competitivos com os processos químicos tradicionais (GIRALDO et al., 2007; FORESTI e FERREIRA, 2005). Algumas vantagens da biocatálise em sistemas livres de solventes observadas são a redução de problemas de separação, de toxicidade e de inflamabilidade dos solventes orgânicos; redução do custo inicial do produto. Além disso, estes meios permitem a recuperação do produto sem as etapas de purificação ou evaporação e a utilização dos substratos em altas concentrações (QIN et al., 2008; SELMI, et al., 1997). No entanto, algumas dificuldades podem ser encontradas no sistema livre de solventes, como por exemplo, o aumento da viscosidade do meio reacional (HALLING, 1990). Além disso, a atividade enzimática em meios reacionais livres de solventes normalmente é muito reduzida, devido à desnaturação da enzima pelos substratos, que nestes sistemas estão presentes em altas concentrações. No caso de substratos como etanol ou metanol, a desnaturação da enzima é atribuída geralmente à remoção da água de hidratação necessária para a manutenção da estrutura cataliticamente ativa, causada pelo solvente hidrofílico (KAIEDA et al., 2001; SHIMADA et al., 1999). Há também que considerar que o cossolvente do meio reacional, principalmente no caso de lipases, é geralmente um solvente hidrofóbico, que protege a enzima de desnaturação pelo solvente/substrato hidrofílico pela manutenção de sua estrutura terciária.

2.3.2 Fatores que Podem Influenciar o Processo Biocatalisado

2.3.2.1 Água

Um dos principais processos catalisados por lipases em meio predominantemente não-aquoso é a síntese de ésteres, onde a água desempenha várias funções, tendo forte influência sobre a atividade catalítica e a estabilidade da enzima (HALLING, 1984). Um mínimo de água é necessário para manter a enzima ativa em solvente orgânico. No entanto, a água pode influenciar tanto na reação de esterificação como na transesterificação, deslocando o seu equilíbrio (KAIEDA, SAMUKAWA e MATSUMOTO, 1999).

Como as lipases possuem como característica única de atuar na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa, a sua atividade geralmente depende da área interfacial. A água facilita o aumento da área interfacial disponível, assim, ela ajuda a manter a atividade da lipase. No entanto, o excesso de água pode fazer com que a enzima fique mais flexível e leve a reações laterais indesejadas como a hidrólise dos produtos. O teor de água em sistemas aquo-restritos é geralmente definido pela atividade termodinâmica de água (a_w). O valor ótimo de a_w depende consideravelmente da enzima empregada ou quando esta estiver 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, SOLINAS e MONDUZZI 2003). O solvente e cossolvente, a polaridade e a quantidade de substratos também influenciam no valor ótimo de a_w (LU et al., 2009; JEGANNATHAN et al., 2008). Na reação de esterificação deve haver um controle da a_w do meio reacional, visto que a água é um dos produtos desta reação e o excesso desta pode propiciar a hidrólise dos produtos.

2.3.2.2 Solventes

O uso de enzimas em meios orgânicos é de grande interesse visto que permite a ocorrência de reações de síntese que são difíceis de ocorrer em altas quantidades de água. No entanto, é conhecido que a atividade enzimática é fortemente influenciada pela polaridade do solvente orgânico, que pode provocar a desnaturação da enzima e levar à perda da atividade catalítica. O valor do $\log P$ de solventes é o principal parâmetro utilizado para descrever a polaridade do solvente e seus principais efeitos na atividade da enzima, onde o coeficiente de partição P corresponde a um padrão octanol/água do sistema de duas fases (LAANE, BOEREN e VEEGER, 1987).

O efeito de solventes orgânicos com diferentes $\log P$ na atividade de lipases tem sido extensivamente relatado na literatura. Essamri, Deyris e Comeau (1998), verificaram o efeito de 10 solventes de diferentes polaridades, com valores de $\log P$ variando de 0,91 a 3,5, na atividade da lipase de *R. oryzae*. Entre os solventes testados, a lipase manteve maior atividade naqueles com menor polaridade (*n*-hexano, *n*-heptano, ciclohexano e pentano), ou seja, solventes com maior polaridade provocaram menor estabilidade por parte da enzima. Este é apenas um exemplo dos vários estudos recentes que reportam a utilização de um solvente apolar como cossolvente da reação sendo mais vantajosa (ADNANI et al, 2010; SÁNCHEZ-OTERO et al., 2010; PIRES-CABRAL, FONSECA e FERREIRA-DIAS, 2010; LIU et al, 2010; LIMA et al., 2004).

Para a síntese de ésteres, pelo menos uma quantidade estequiométrica de álcool, um dos substratos da reação, é requerida para a completa conversão dos triacilgliceróis (TAGs) ou ácidos graxos. No entanto, a esterificação ou alcoólise é diminuída significativamente pela adição de álcool logo no início do processo enzimático. Esta inativação é causada pelo álcool de cadeia curta polar e é um dos maiores obstáculos para a produção enzimática de ésteres (SHIMADA et al., 2002). O mecanismo de inativação da enzima pelo álcool pode ocorrer pela inibição competitiva, onde ocorre a ligação de moléculas do solvente no sítio ativo da enzima (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; YADAV e DEVI, 2004), ou também pelo fato do

solvente orgânico retirar a água essencial em torno da molécula enzimática, alterando sua conformação nativa, o que provoca a perda da atividade catalítica por desnaturação (SHIMADA et al., 2002). Para tentar solucionar este problema, são sugeridas três opções: adição do álcool em etapas, alteração do acceptor acila e mudança do cossolvente. A adição do álcool em etapas foi a estratégia mais comumente citada nos vários estudos. Esta estratégia é ainda a primeira escolha, porque se pode atingir um alto rendimento com condições de funcionamento simples (TAN, LU e NIE, 2010).

Outro método empregado para a redução da inativação da enzima pelo álcool foi descrita por Tan et al. (2010), em reações de síntese de ésteres para biodiesel, em que o álcool (metanol ou etanol) é substituído por aceptores acila como o acetato de metila ou acetato de etila. Após o acetato de metila ser utilizado como acceptor em uma reação catalisada pela lipase comercial Novozyme 435, houve um rendimento de 92% de éster metila, sendo que a razão molar da reação foi de 12:1 (acetato de metila:óleo), e o acetato de metila não mostrou efeito negativo na atividade enzimática. Segundo Du et al. (2004), que também utilizaram o acetato de metila como acceptor acila na reação de transesterificação com o óleo de soja para a produção do biodiesel, não foi detectada perda da atividade pela lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme 435) imobilizada em resina acrílica, mesmo após ser utilizada continuamente por 100 vezes. Embora o acetato de metila tenha tido esta vantagem para a produção de biodiesel, a baixa velocidade de reação e o alto custo ainda são fatores que restringem sua aplicação na indústria (DU et al., 2004).

Com utilização de solventes apolares como meio reacional das reações de alcoóis como substratos, o processo de inativação da lipase pode ser mais acentuado visto que o álcool é insolúvel no sistema. Este problema pode ser resolvido com a utilização de um cossolvente que aumente a solubilidade do metanol ou etanol no meio reacional (TAN et al., 2010). O *tert*-butanol é um bom solvente para o substrato metanol e muitos estudos estão focados neste solvente (TAN et al., 2010). Royon et al. (2007) utilizaram a lipase imobilizada *Candida antarctica* B (Novozyme 435) como catalisador em solvente *tert*-butanol na produção de biodiesel a partir do óleo de algodão. Em um sistema em batelada, a inibição da

lipase causada pelo metanol foi eliminada pela adição de *tert*-butanol no meio reacional. Isto também produziu um perceptível aumento na velocidade de reação e no rendimento em éster (97%), sendo que na reação em que não foi utilizado o *tert*-butanol (livre de solvente) não houve conversão em éster, ou seja, a lipase foi completamente inibida pelo metanol.

Outros solventes como o 1,4-dioxano e líquidos iônicos foram também pesquisados como solventes para a produção de biodiesel catalisada por lipase (HA, et al., 2007; ISO, et al., 2001). No entanto, embora estes solventes resolvam o problema de inativação da lipase causada pelo metanol ou etanol, dificuldades na recuperação do biocatalisador do meio de reação fazem com que estes métodos sejam menos competitivos em escala industrial (HA et al., 2007). Por isso, solventes apolares como o *n*-heptano e *n*-hexano são tradicionalmente utilizados como cossolventes em reações de síntese (item 2.3.1).

2.3.2.3 Temperatura

Conforme descrito por alguns estudos, a temperatura afeta consideravelmente a velocidade de reação catalisada por enzimas por dois mecanismos distintos: o mecanismo químico, onde a velocidade de reação aumenta com a temperatura pelo aumento da energia cinética dos reagentes (substratos) e pelo aumento da transferência de massa, e o mecanismo associado à desnaturação da enzima pelo aumento da temperatura (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005; FUKUDA, KONDO e NODA, 2001). Estes autores também determinaram a temperatura ideal para lipases, onde a desnaturação da enzima ainda é baixa e a atividade catalítica é alta na reação de transesterificação, que foi em torno de 40°C. No entanto, este valor depende da enzima e de suas características de atividade e estabilidade em solventes orgânicos, sendo assim, é difícil generalizar esta informação.

A investigação do efeito da temperatura sobre a velocidade de reação é sempre recomendada para selecionar a temperatura ideal a ser utilizada na reação.

É importante salientar, que, como em meios aquosos, a temperatura ótima para a atividade enzimática está relacionada com dois fenômenos de consequências opostas: o aumento do número de choques entre as moléculas, que causa um aumento da velocidade, e a desnaturação da enzima pela temperatura, que leva a uma menor velocidade de reação, sendo assim a produtividade e a eficiência da conversão também pode ser melhorada (MACRAE, 1983).

Alguns estudos indicam que a estabilidade térmica da lipase imobilizada é maior do que da enzima livre porque o suporte evita a transição da conformação da enzima em altas temperaturas (KIM et al., 2006). Yigitoglu e Temoçin (2010) verificaram o efeito da temperatura na atividade da lipase de *Candida rugosa* na forma livre e imobilizada (fibras de polietileno) e verificaram que após 180 min na temperatura de 50°C houve maior estabilidade por parte da enzima imobilizada que permaneceu com 54% da atividade de hidrólise, sendo que a enzima na forma livre refere apenas 30% da atividade residual. Foi relatado que o aumento da estabilidade térmica foi uma das vantagens gerais das enzimas imobilizadas.

2.4 LIPASES NA SÍNTESE DE ÉSTERES - PRINCIPAIS APLICAÇÕES

Os ésteres de ácidos graxos possuem diversas aplicações como na indústria alimentícia, na forma de aromas, na produção de sabões, na fabricação de medicamentos, perfumes e cosméticos, na produção e modificações de componentes alimentares (lipídios estruturados), e também na produção de biocombustíveis.

A crescente procura por ésteres formulados especialmente para aplicação como aditivos e aromas em indústrias de perfumes, alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, torna necessário encontrar formas alternativas para a obtenção de aromas, ao invés da extração de seus materiais naturais, que são muito escassos ou caros para uso comercial (KUMAR, MODAK e MADRAS, 2005; ABBAS e COMEUAU, 2003). A síntese de ésteres na indústria geralmente baseia-se na esterificação química direta de ácidos graxos com álcool na presença de

catalisadores inorgânicos em temperaturas elevadas ($\pm 100^{\circ}\text{C}$). No entanto, essas reações químicas são tediosas, não-seletivas e consomem uma grande quantidade de energia. A utilização de enzimas como biocatalisadores para a síntese de ésteres para a produção de aromas permite o desenvolvimento de produtos com melhores propriedades, além de catalisar reações em temperaturas relativamente baixas e ainda serem consideradas “naturais” pelas indústrias alimentares (KISS et al., 2004; WELSH, WILLIAN e DAWSON, 1990).

As lipases podem ser utilizadas como biocatalisadores em processos de modificação de óleos e gorduras, para a produção dos chamados lipídeos estruturados (UNDURRAGA, MARKOVITS e ERAZO, 2001; PABAI, KERMASHA e MORIN, 1995). Lipídios estruturados são produtos da modificação de um triacilglicerol, obtidos da transesterificação química ou enzimática, com a finalidade de alterar a composição em ácidos graxos e/ou sua distribuição posicional na molécula de glicerol. Estes compostos podem ser sintetizados com o propósito de melhorar ou modificar características físicas (polimorfismo, ponto de fusão, conteúdo de gordura sólida, viscosidade e consistência) e/ou químicas (estabilidade oxidativa) dos triacilgliceróis. Além disso, a modificação de lipídeos também pode ter o propósito de modificar uma ou mais propriedades nutricionais (presença ou ausência de ácidos graxos saturados ou insaturados de fácil absorção e digestão), obtendo-se assim lipídios nutracêuticos ou funcionais, que podem proporcionar benefícios específicos para a saúde (D'AGOSTINI e GIOIELLI, 2002; GIOIELLI, 2002).

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 biodiesel é um produto que vem sendo muito estudado atualmente e pode ser obtido por meio de processos de esterificação ou transesterificação. O método mais comum de produção do biodiesel é por catálise química, consistindo da transesterificação de óleos vegetais com alcoóis de cadeia curta, como o metanol, na presença de ácidos ou bases como catalisadores (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007). O método químico para a síntese de biodiesel tem sido utilizado em escala industrial nos últimos anos. No entanto, problemas graves relacionados à remoção do catalisador do meio reacional, requerimento excessivo de energia, dificuldade de recuperação do glicerol, reações

laterais indesejáveis e o alto custo de refino do produto torna este processo dispendioso (OGNJANOVIC, BEZBRADICA e KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009). Atualmente, a produção biotecnológica de biodiesel com lipases tem recebido considerável atenção e tem tido um rápido desenvolvimento, visto que a tendência de adotarem-se processos ecologicamente aceitáveis é crescente (RANGANATAHN, NARASIMHAN e MUTHUKUMAR, 2008; SHIMADA et al., 2002). O emprego de lipases como biocatalisadores nas reações de transesterificação permite que a reação ocorra em condições brandas e há uma fácil recuperação do glicerol sem purificação ou produção de resíduos químicos. Além disso, no processo enzimático evita-se a formação de sabões, o que ocorre no processo químico quando se utiliza um catalisador básico. Se a lipase estiver na forma imobilizada há a combinação dessas vantagens com a possibilidade de reutilização do biocatalisador (DIZGE et al., 2009; NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005).

Um outro exemplo de produto obtido da síntese de ésteres são os monoésteres de carboidratos, que são surfactantes biodegradáveis e de baixa toxicidade e possuem, conseqüentemente, aplicações na indústria de detergentes, alimentos (como emulsificantes), entre outros. A monoacilação regioespecífica dos açúcares envolve diversas etapas de protonação e desprotonação, 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; GANDHI et al., 2000). Um exemplo de éster de sacarose, que tem propriedades emulsificantes, é o palmitato de isopropila, usado em preparações medicinais para cosméticos, nas quais é necessária uma boa absorção do produto pela pele (REYES-DUARTE et al., 2005).

Lipases também podem ser utilizadas para modificação de antioxidantes, pela catálise seletiva destes compostos. Um exemplo é a vitamina C, um antioxidante que possui característica hidrofílica e devido a isso não pode ser usado para este fim em compostos hidrofóbicos como, por exemplo, em margarinas. Este problema pode ser solucionado pela esterificação dos grupos hidroxila da vitamina C. A modificação química requer condições drásticas de temperatura e pressão, o que resulta em uma mistura de produtos. Uma reação de esterificação catalisada por

lipase utilizando ácidos graxos produz ésteres de vitamina C com propriedades antioxidantes promissoras (ADAMCZAK, BORNSCHEUER e BEDNARSKI, 2005).

As aplicações atuais de lipases são reservadas a produtos de alto valor agregado, mas o desenvolvimento de processos mais econômicos, a identificação de novas lipases ou a produção de lipases termoestáveis com custo reduzido são desejáveis para aplicação industrial, tornando possível o seu emprego em produtos de maior consumo (LEE e AKOH, 1998).

2.4.1 Mecanismos de Reações Enzimáticas para a Síntese de Ésteres

2.4.1.1 Reação de Esterificação

A reação de formação de ésteres a partir de ácidos graxos é denominada esterificação, que consiste na obtenção de ésteres pela reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), com formação de água como subproduto (Figura 7).

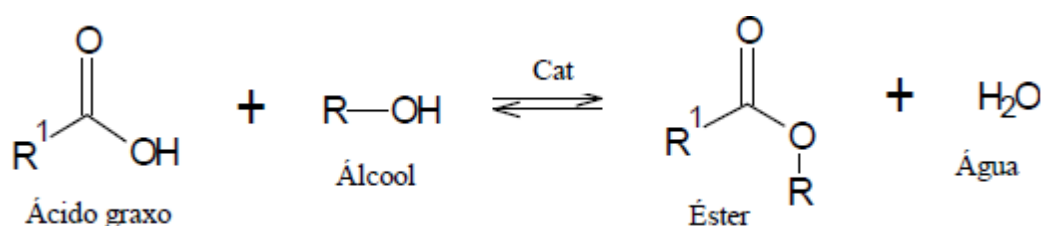


FIGURA 7 – EQUAÇÃO GERAL DE UMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A Figura 8 mostra um esquema do mecanismo de síntese do oleato de etila catalisada pela lipase de *Candida rugosa* (CRL) (FORESTI e FERREIRA, 2009). Este método baseia-se no papel da água e etanol como parte de uma rede de ligações de hidrogênio, agindo na adsorção do ácido graxo e na estabilização dos intermediários. As etapas do mecanismo de reação de oleato de etila (com base no mecanismo de Ping Pong Bi-bi) são: 1) Estado inicial: modelo da enzima nativa e

substratos longe da enzima; 2) Adsorção do ácido oléico no sítio ativo da enzima e o etanol ainda afastado da enzima; 3) Formação de um intermediário tetraédrico: a) com o etanol longe do intermediário, ou b) com o etanol perto do intermediário; 4) Liberação de água e formação da acil enzima (etanol perto do sítio ativo ou não). Água perto da tríade catalítica; 5) Adsorção do etanol pelo sítio ativo da enzima; 6) Formação do segundo intermediário tetraédrico; 7) Regeneração do sítio ativo e dessorção do oleato de etila.

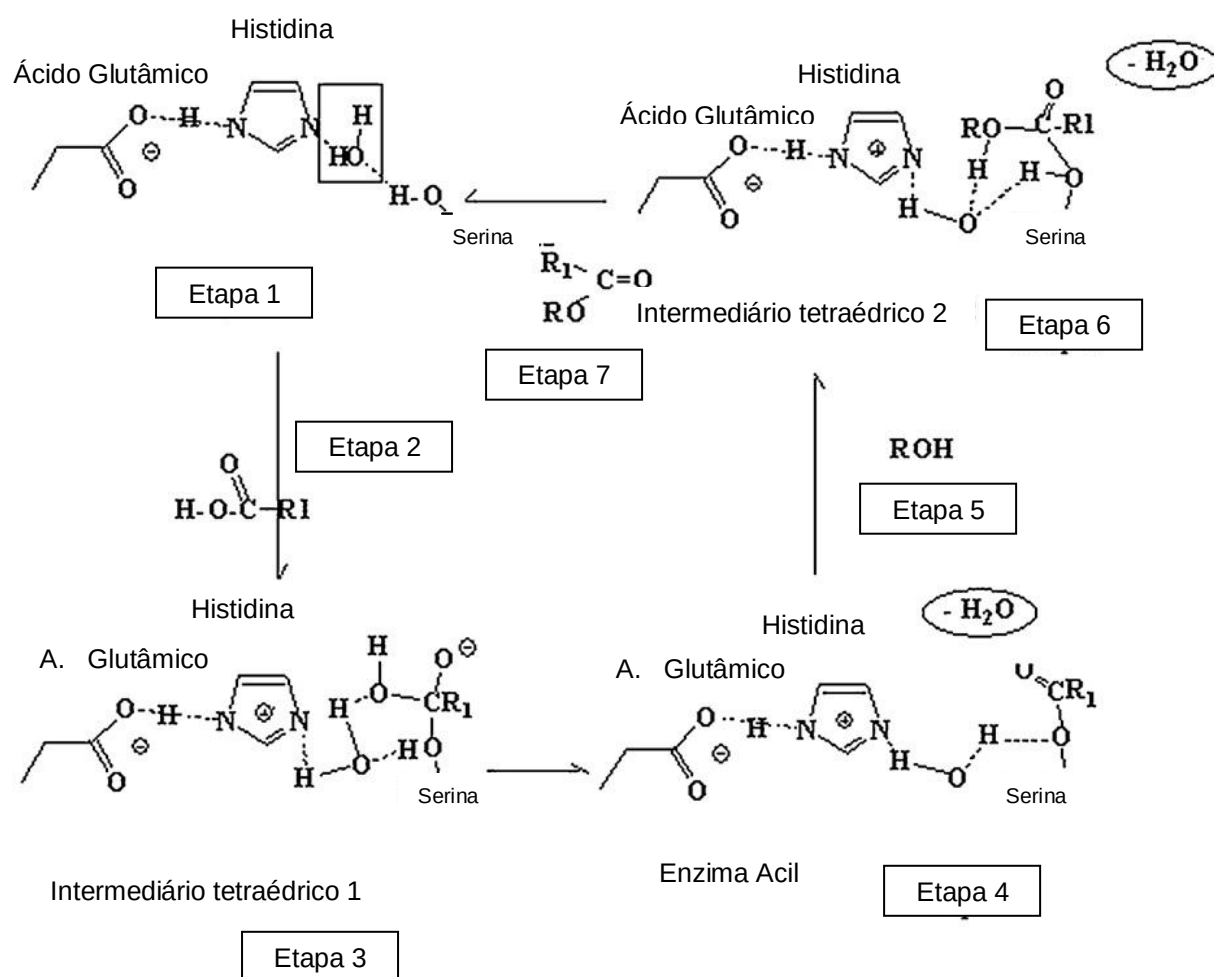


FIGURA 8 – MECANISMO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADO PELA LIPASE DE *Candida rugosa* (CRL)

Fonte: FORESTI e FERREIRA (2009)

2.4.1.2 Reação de Transesterificação

A transesterificação é uma reação orgânica onde um éster é transformado em outro pela mudança na porção alcóxi, podendo ser representada pela equação mostrada na Figura 9.

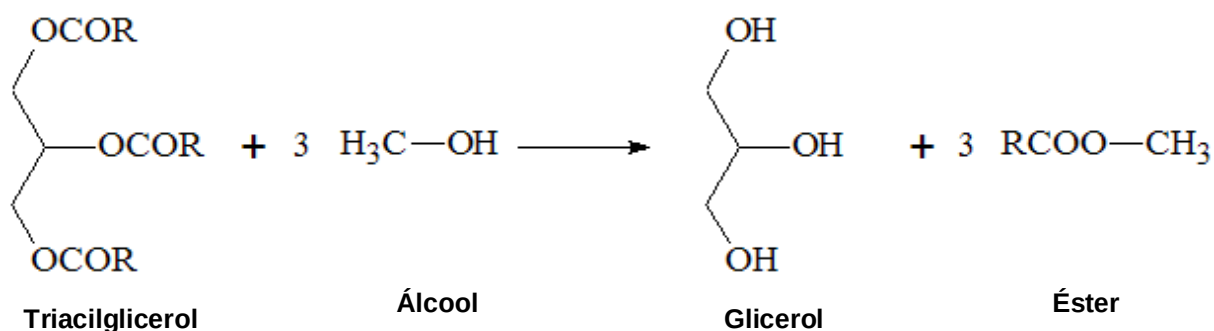


FIGURA 9 - EQUAÇÃO GERAL PARA UMA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

A Figura 10 representa o mecanismo da reação de transesterificação via catálise enzimática proposto por Al-Zuhair, Lig e Jun (2007), que é composta pelas seguintes etapas: (a) a base (grupo amino, da enzima) desprotona a hidroxila do ácido carboxílico da estrutura da proteína, etapa de adição nucleofílica, onde há a formação do complexo enzima-substrato; b) o próton do ácido conjugado do grupo amino é abstraído pelo oxigênio do grupo alquila do substrato, e uma molécula de diacilglicerol é formada, a partir do diacilglicerol forma-se o monoacilglicerol e posteriormente uma molécula de glicerol; c) o álcool é desprotonado pela base, atacando o átomo de carbono da carbonila, onde um intermediário tetraédrico é formado. Finalmente, em (d) o próton é transferido do ácido conjugado, do grupo amino da enzima, para o átomo de oxigênio do complexo enzima-álcool, resultando no éster alquílico do ácido graxo e glicerol (REETZ e JAEGER, 1998).

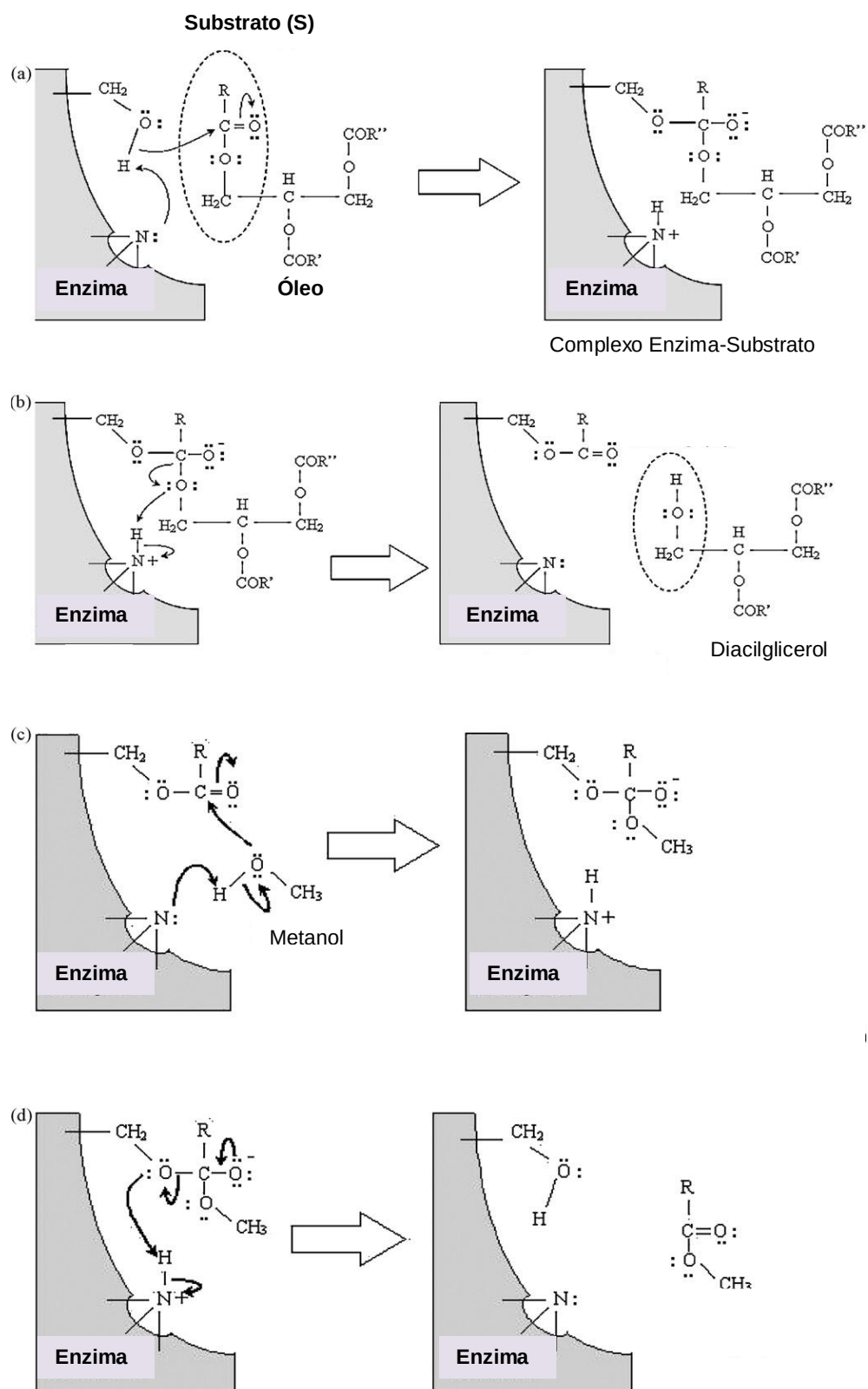


FIGURA 10 – MECANISMO PROPOSTO PARA A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

Fonte: ADAPTADO (AL-ZUHAIR, LIG E JUN, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo e a otimização do processo de síntese enzimática de ésteres etílicos, empregando a lipase recombinante de *Rhizopus oryzae*, imobilizada em suporte hidrofóbico.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a enzima livre (pH, temperatura ótimos para atividade), bem como verificar sua estabilidade em diferentes temperaturas e valores de pH e em diferentes solventes orgânicos.
- Determinar as condições de imobilização da lipase ROL no suporte hidrofóbico Accurel MP1000 e caracterizar a enzima imobilizada em termos de condições ótimas para a atividade e estabilidade, principalmente em meios aquo-restritos.
- Estudar os efeitos dos parâmetros razão molar (ácido/álcool), concentração de enzima no meio reacional, aumento da concentração de substratos, temperatura e adição do etanol em etapas no rendimento da reação de esterificação.
- Estudar a aplicação da lipase ROL na síntese do éster oleato de etila, em duas condições diferentes: na presença do cossolvente *n*-heptano e em sistema livre de cossolvente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná.

O material utilizado para a imobilização da lipase foi o polipropileno em pó Accurel MP – 1000 (Membrana GmbH, Obernburg, Germany).

O ácido oleico (Sigma) utilizado nas reações de esterificação e nas curvas analíticas tinha uma pureza de 90%. O *n*-heptano utilizado nas reações de esterificação foi adquirido da Vetec com pureza de 99,5%; o etanol utilizado foi adquirido da Synth, com pureza de 99,5%. Para a dosagem da atividade de hidrólise da lipase foram utilizados como substratos a tributirina (C4, pureza 98%), tricaprilina (C8, pureza 99%) e trioleína (C18, pureza 65%) (Sigma). Os demais reagentes foram de grau analítico e tiveram o grau de pureza requerido no experimento.

4.1 LIPASE

O gene que codifica a lipase utilizada neste trabalho foi clonado a partir do DNA do fungo *Rhizopus oryzae* (ATCC 853) e expresso na levedura *Pichia pastoris*. A enzima foi gentilmente cedida pelo Professor Francisco Valero da Universidade Autônoma de Barcelona (Espanha). Neste trabalho, para fins de simplificação, a lipase recombinante de *R. oryzae* será denominada de “ROL”. A enzima foi recebida na forma de pó e os processos de expressão e purificação que a que ROL foi submetida foram descritos por Minning, Dannert-Schmidt e Schmid (1998) e Minning et al. (2001). A lipase de *R. oryzae* (ROL) (ATCC 853), foi expressa em *P. pastoris* por meio do plasmídio pPICZαA-ROL contendo o cDNA da ROL. A levedura *P. pastoris* é um bom sistema hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Este tipo de expressão usa elementos que incluem fortes promotores induzíveis derivados de genes da via de utilização do

metanol, assim como promotores fortemente regulados pela presença de alcoóis, tal como o promotor do gene álcool oxidase 1 (PAOX1) (CEREGHINO e CREGG, 2000). Há três tipos de cepas de levedura *P. pastoris* que variam na sua habilidade em utilizar o metanol. O melhor tipo ou o fenótipo que melhor utiliza o metanol é o Mut⁺, que foi empregado para a superexpressão da lipase utilizada neste trabalho.

Após produção e superexpressão da lipase, foram realizados os seguintes processos de purificação: centrifugação para eliminação de biomassa; microfiltração do sobrenadante em membrana 0,22 µm para eliminar os possíveis restos de biomassa existentes; ultrafiltração tangencial por membrana de 10 kDa; diálise do concentrado obtido no passo anterior com tampão Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,5 e, finalmente, a liofilização do concentrado final sem aditivos (VALERO, 2010).

4.1.1 Eletroforese SDS – PAGE

Para verificar a pureza da lipase ROL, as amostras foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE. Foi utilizado o método descrito por Laemmli (1970), com gel de corrida em uma concentração de 12% (m/v) em acrilamida: bisacrilamida. Para tanto, a lipase foi dissolvida em tampão Tris-HCl 2,5 mmol.L⁻¹ pH 8,0, obtendo-se diferentes soluções com as seguintes concentrações de proteína: 0,003 mg/mL, 0,002 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,0005 mg/mL e 0,0002 mg/mL. Amostras foram preparadas com 10 µL das soluções de proteína + 5 µL do tampão de amostra (100 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, SDS 4% (m/v), azul de bromofenol 0,2% (m/v), glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v)), e em seguida foram fervidas a 95°C por 5 min para serem aplicadas no gel. No primeiro poço do gel foi aplicada uma amostra contendo um padrão de massa molecular (MW), com os seguintes marcadores: kDa: 14,4, lisozima; 18, β-lactoglobulina; 25, REase Bsp98I; 35, lactato desidrogenase; 45, ovoalbumina; 66,2, albumina soro bovina; 116, β-galactosidase. (Ferramentas - Unstained Protein- SM0431). Posteriormente, o gel foi lavado para retirar o excesso de SDS, em seguida foi fixado e corado com Coomassie Blue R-250 e revelado com solução descorante contendo 45% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético

glacial. A corrida do gel foi realizada em um equipamento Mini-PROTEAN[®] (Bio-Rad), por 60 min a 180 V.

4.1.2 Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade

Para determinar o efeito da temperatura na atividade lipolítica da enzima livre, a atividade enzimática foi determinada pelo método do pH Stat (item 4.4.1.3) nas temperaturas entre 20 e 45°C, em pH 7,25. A temperatura foi controlada por banho termostatzado.

A estabilidade à temperatura foi determinada pela incubação da enzima em tampão Tris-HCl 2,5 mmol.L⁻¹ pH 7,25, em temperaturas entre 20 e 50°C, durante 24 h, na ausência do substrato. Após a incubação, a atividade residual da enzima foi determinada a 35°C pelo método do pH Stat (item 4.4.1.3).

4.1.3 Efeito do pH na Atividade e na Estabilidade

Para determinar o efeito do pH na atividade lipolítica da enzima livre, os ensaios foram realizados variando-se o pH do meio reacional entre 6,25 a 9,0, durante o ensaio de determinação da atividade de hidrólise pelo método do pH Stat (item 4.4.1.3). A temperatura utilizada foi de 35°C. O pH da solução foi conferido pelo próprio equipamento pH Stat.

A estabilidade ao pH foi determinada pela incubação da enzima livre em tampão fosfato 2,5 mmol.L⁻¹ para valores de pH entre 6,25 a 7,0, e em tampão Tris HCl 2,5 mmol.L⁻¹ para os valores de pH entre 7,25 e 9,0, durante 24 h, a 4°C. A temperatura de 4°C foi escolhida para garantir a estabilidade da enzima nesta condição, de modo que o efeito observado fosse devido apenas ao pH e não à desnaturação por efeito da temperatura. Após incubação, a atividade residual foi determinada pelo método do pH Stat (item 4.4.1.3) na temperatura de 35°C.

4.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM ACCUREL MP-1000

4.2.1 Descrição do Suporte para a Imobilização

O suporte hidrofóbico escolhido para a imobilização da lipase foi o polipropileno em pó Accurel MP – 1000 (Membrana GmbH, Obernburg, Germany), por sua grande área superficial (Tabela 4) e devido ao fato de que vários autores mostraram que este suporte pode promover a ativação de lipases e aumentar a sua estabilidade (SALUM et al., 2008; VILLENEUVE et al., 2000; SOARES et al., 1999; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS DO SUPORTE HIDROFÓBICO DE IMOBILIZAÇÃO UTILIZADO NESTE TRABALHO

Propriedades Físicas	Accurel MP-1000
Composição	Polipropileno
Natureza	Hidrofóbica
Área de superfície (m ² /g)	55,985
Densidade da partícula (g/cm ³)	1,993
Porosidade das partículas	0,70
Tamanho das partículas(μm)	< 1500

Fonte: AL-DURI E YONG (2000).

4.2.2 Procedimento de Imobilização

Para a imobilização, foi utilizado o método proposto por Al-Duri e Yong (2000). O suporte Accurel MP-1000 (0,1g) foi umedecido com solução de etanol (50% em água, v/v) por 30 min a fim de excluir o ar contido dentro das partículas. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada e filtrado. Em um Erlenmeyer, colocou-se a solução enzimática e o suporte em proporções e condições requeridas para cada experimento. Esta mistura foi agitada a 150 rpm, na temperatura de 4°C.

O suporte foi então removido da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo, seco em dessecador a vácuo por cerca de 16 h na temperatura de 4°C e armazenado na mesma temperatura.

4.2.3 Determinação da Quantidade de Proteína a ser Oferecida para Imobilização

A quantidade de proteína adequada para a imobilização foi verificada diluindo-se o extrato lipolítico em tampão e misturando-o ao suporte para a imobilização, mantendo-se o volume do extrato lipolítico constante, o que resultou em quantidades de 10, 15, 20, 25 e 30 mg de proteína por g de suporte (SALUM et al., 2008). As misturas foram mantidas sob agitação por 72 h (VALERO, 2009). Após filtração e secagem dos suportes (item 4.2.2), a atividade da enzima imobilizada foi determinada, com o objetivo de verificar a quantidade de proteína inicial para que a atividade fosse máxima no suporte. A determinação da atividade lipolítica foi realizada pela hidrólise do pNPP (palmitato de *p*-nitrofenila) em meio de solvente orgânico (item 4.4.1.2), para não haver a dessorção da enzima do suporte, como ocorreria em meio aquoso.

4.2.4 Cinética da Imobilização

Esta etapa teve como objetivo determinar o tempo de contato entre o extrato lipolítico e o suporte, para o cálculo da eficiência da imobilização, o que foi verificado pela ausência de atividade e de proteína no sobrenadante após a imobilização. Para tanto, alíquotas de 0,5 mL foram retiradas em 24, 48 e 72 h durante a imobilização. Estes tempos foram pré-estabelecidos seguindo um protocolo de imobilização para esta lipase em um mesmo tipo de suporte (VALERO, 2009). A atividade residual no sobrenadante foi medida pelo método do pNPP em meio aquoso (item 4.4.1.1) e a concentração residual de proteína do sobrenadante foi quantificada pelo método de Bradford (item 4.4.2). Os dados foram expressos em porcentagem de atividade e de proteína inicial, respectivamente.

A partir dos resultados experimentais, a eficiência da imobilização (E) foi calculada pela Equação 1 (YADAV e JADHAV, 2005).

$$E = (At_i - At_f).100 / At_i \quad (1)$$

onde: At_i : atividade inicial total de hidrólise frente ao pNPP, antes da imobilização (U);

At_f : atividade final total de hidrólise frente ao pNPP no sobrenadante após a imobilização (U).

Para o cálculo da eficiência (E), considerou-se atividade inicial e final do sobrenadante frente à reação de hidrólise do pNPP em meio aquoso.

4.2.5 Estabilidade da Enzima Imobilizada ao Armazenamento

Para saber se a lipase, após ser imobilizada em Accurel, ficaria estável sob armazenamento, a enzima ficou armazenada em geladeira (4°C) durante 5 meses. A atividade da enzima foi verificada mensalmente, utilizando-se o método de hidrólise da trioleína em meio orgânico (item 4.2.7.2).

4.2.6 Estabilidade da Enzima Imobilizada à Temperatura e em Solventes Orgânicos

Para este ensaio, 30 mg de enzima imobilizada foram adicionados em 5 mL de tampão Tris-HCl 2,5 mmol.L⁻¹ pH 8,0, utilizando-se tubos de ensaio de 10 mL com tampa. Os tubos foram colocados em banho termostatizado, onde permaneceram durante 24 h em cada temperatura. As temperaturas utilizadas foram 30°C, 40°C e 50°C. Após a incubação, o material foi então removido da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo e seco em dessecador por 16 h na temperatura de 4°C.

Para verificar se a enzima imobilizada era estável em solventes orgânicos, esta foi incubada nos seguintes solventes: etanol ($\log P$ - 0,24), considerando-se os estudos de síntese do oleato de etila utilizando o etanol como um dos substratos, *n*-hexano ($\log P$ 3,5) e *n*-heptano ($\log P$ 4,0), que poderiam ser utilizados como cossolventes nas reações de esterificação. O procedimento utilizado para estes ensaios foi o mesmo descrito anteriormente para a estabilidade à temperatura, exceto que o tampão Tris-HCl foi substituído pelos solventes. A atividade residual da enzima foi verificada utilizando-se o método de hidrólise da trioleína em meio orgânico (item 4.2.7.2).

4.2.7 Determinação da Atividade de Hidrólise da Enzima Imobilizada em Meio Orgânico

Como já mencionado anteriormente, a atividade de hidrólise da ROL imobilizada foi sempre determinada em meio orgânico para prevenir a dessorção da enzima do suporte, tendo sido utilizados dois métodos, descritos a seguir.

4.2.7.1 Método do pNPP

O método do pNPP em meio orgânico foi utilizado primeiramente por ser um método rápido e prático. Para tanto, foi utilizada a metodologia descrita por Pencreac'h e Baratti (1996) e estabelecida no LTEB por Lima et al. (2004). A reação foi realizada em *n*-heptano contendo 10 mmol.L^{-1} de pNPP e foi iniciada pela adição da enzima imobilizada. A cada 3 min, amostras foram retiradas e o *p*-nitrofenol liberado foi extraído por uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. As amostras foram analisadas conforme o protocolo descrito em 4.4.1.2.

4.2.7.2 Hidrólise da Trioleína

O método proposto por Lowry e Tinsley (item 4.4.3.1) foi utilizado para quantificar indiretamente o teor de ácidos graxos liberados durante a hidrólise da trioleína (Sigma-Aldrich, 68%) catalisada pela enzima imobilizada. Este método também foi empregado porque utiliza um substrato específico de lipases, sendo importante para a caracterização da lipase imobilizada. O procedimento proposto por Gonçalves (1999), com algumas modificações foi seguido. O meio reacional consistiu de 10 mL de *n*-heptano contendo 20 mg da enzima imobilizada ($3,9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de suporte, método do *p*NPP), $70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de trioleína e 0,2 mL (2%, v/v) de água destilada. A mistura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm na temperatura de 40°C. A reação foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo pela retirada de alíquotas de 100 μL do meio reacional e dosagem de ácidos graxos livres pelo método de Lowry-Tinsley (1976) (item 4.4.3.1).

4.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS UTILIZANDO A LIPASE DE *Rhizopus oryzae* IMOBILIZADA

4.3.1 Procedimento Padrão para a Reação de Esterificação em *n*-Heptano

A reação de síntese do oleato de etila (Figura 11) foi utilizada como reação padrão da síntese de ésteres, visto que as condições reacionais já haviam sido otimizadas para outras lipases (SALUM et al., 2008; FERNANDES et al., 2007). O meio reacional foi composto por 10 mL *n*-heptano, $70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido oleico (Sigma Aldrich, 90%) e $210 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de etanol (99,5%), sendo utilizada uma razão molar ácido graxo:etanol de 1:3. A razão molar entre os substratos foi escolhida com base em estudos prévios (SALUM et al., 2008; FERNANDES et al., 2004). A reação foi iniciada por adição de 70 U da enzima imobilizada e a mistura foi mantida em agitador orbital a 180 rpm e 40°C. A reação foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo pela retirada de alíquotas de 100 μL do meio reacional, que

foram analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual pelo método de Lowry-Tinsley (1976), como descrito no item 4.4.3.1. A conversão em éster foi calculada a partir do consumo de ácidos graxos do meio reacional. Foram realizados também controles com a adição do suporte sem a lipase.

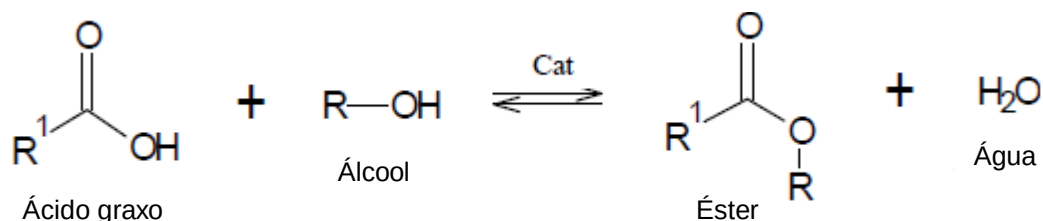


FIGURA 11 - EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Nos experimentos descritos a seguir (itens 4.3.1.1 e 4.3.1.2), foram mantidos os mesmos volumes e condições citadas em 4.3.1.

4.3.1.1 Influência da Concentração de Lipase Imobilizada

As reações de esterificação foram realizadas utilizando diferentes quantidades de enzima imobilizada - 30, 60, 90, 100 e 120 mg - correspondentes, respectivamente, a 21, 42, 63, 70 e 83 unidades totais de atividade no meio reacional (atividade de hidrólise da trioleína em meio orgânico – item 4.2.7.2).

4.3.1.2 Influência da Razão Molar dos Substratos

Grande parte dos estudos feitos sobre a síntese de ésteres por via enzimática tem verificado o efeito da razão molar dos substratos (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007). Este estudo torna-se importante porque diferentes razões molares proporcionam modificações no deslocamento do equilíbrio da reação. Quando há quantidades estequiométricas dos reagentes, a reação tende ao equilíbrio com

baixas conversões do produto. Normalmente o excesso de álcool é usado para deslocar o equilíbrio em função da formação do produto (SINGH e SINGH, 2010; SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998). A reação de esterificação foi realizada de acordo com o descrito no item 4.3.1, com as seguintes razões molares ácido:álcool: 1:1, 1:3 e 1:9.

4.3.2 Estabilidade da Enzima Imobilizada Frente a Elevadas Concentrações de Substratos

Visto que um dos objetivos do trabalho era reduzir a concentração do cossolvente no meio até a sua total retirada, estudou-se a estabilidade da lipase imobilizada no meio de reação de esterificação utilizando altas concentrações de substratos. Para isso, a enzima imobilizada (30 mg) foi incubada nos solventes e substratos da reação (10 mL), conforme segue: 1) 700 mmol⁻¹ de ácido oleico + 700 mmol⁻¹ de etanol (RM 1:1) ; 2) 700 mmol⁻¹ de ácido oleico + 1400 mmol⁻¹ de etanol (RM 1:2) ; 3) 1400 mmol⁻¹ de ácido oleico + 700 mmol⁻¹ de etanol (RM 2:1) ; 4) 700 mmol⁻¹ de ácido oleico; 5) 700 mmol⁻¹ de etanol; 6) etanol e 7) *n*-heptano. A enzima foi incubada a 40°C, com agitação orbital de 180 rpm por 30 min, simulando as condições da reação de esterificação. Ao final do experimento, a mistura foi filtrada a vácuo em papel de filtro qualitativo e a lipase imobilizada recuperada foi lavada com *n*-heptano por 3 vezes e seca em dessecador a vácuo por 16 h na temperatura de 4°C. A atividade hidrolítica residual foi quantificada em meio orgânico utilizando como substrato a trioleína (item 4.2.7.2).

4.3.3 Efeito do Aumento da Concentração dos Substratos e da Adição do Etanol em Etapas

Para determinar o efeito do aumento da concentração dos substratos na conversão em éster, foram realizados ensaios com concentrações mais elevadas

dos substratos, em comparação com aquelas utilizadas anteriormente (70 mmol.L^{-1} de ácido oleico; 210 mmol.L^{-1} de etanol) (item 4.3.1).

Primeiramente, as quantidades de substratos foram aumentadas em 5 vezes. As razões molares ácido oleico:etanol utilizadas foram 1:1, 1:2 e 1:3, utilizando-se em cada experimento $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oleico e $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol (RM 1:1); $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oleico e $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ (RM 1:2); e $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oleico e $1,050 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol (RM 1:3), respectivamente. Foram realizadas reações com RM de 1:1 e 1:3, adicionando o etanol em uma etapa, e também reações com RM de 1:2 e 1:3, com o etanol sendo adicionado em mais etapas. A adição do etanol em etapas é importante para minimizar o efeito inibitório do etanol sobre a enzima; sendo assim, na reação em que foi utilizada a RM ácido:etanol de 1:2, uma alíquota de $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol foi adicionada no tempo zero e outra com a mesma concentração no tempo de 20 min de reação, totalizando $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol. Quando foi utilizada a razão molar ácido: etanol de 1:3, em uma das reações, alíquotas de $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol foram adicionadas nos tempos 0, 20 e 40 min de reação, totalizando $1,050 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol adicionados no meio reacional.

Em seguida, foram realizados ensaios aumentando a concentração dos substratos em 10 vezes em relação àquela utilizada nos ensaios preliminares. Portanto, as concentrações de substratos utilizadas foram $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oleico e $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol no cossolvente (*n*-heptano). A razão molar de 1:1 (ácido:etanol) foi utilizada em um primeiro ensaio, no qual o etanol foi adicionado diretamente no início da reação. Em seguida, para as outras reações, foram realizados ensaios com a adição de etanol em várias etapas, isto é, a cada 5 min, quando alíquotas de $100 \text{ }\mu\text{L}$ eram retiradas do meio reacional para análise. O volume de etanol ideal para ser adicionado em cada etapa foi verificado após realizar ensaios utilizando as seguintes massas e volumes: 44 mmol.L^{-1} ($26 \text{ }\mu\text{L}$); 88 mmol.L^{-1} ($52 \text{ }\mu\text{L}$); 176 mmol.L^{-1} ($104 \text{ }\mu\text{L}$), totalizando 700 mmol.L^{-1} , 1056 mmol.L^{-1} e 2112 mmol.L^{-1} de etanol adicionado durante toda a reação. A razão molar considerada foi a total, considerando-se o número de moles adicionados até ao final da reação.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 *Determinação da Atividade Lipolítica*

Os métodos utilizados neste trabalho levaram em conta a solubilidade da lipase ROL no meio reacional. Assim, sendo, quando a enzima estava na sua forma livre, meios aquosos foram utilizados. Para impedir a dessorção da lipase do suporte, todas as determinações de atividade hidrolítica com a lipase imobilizada foram feitas em meio orgânico.

4.4.1.1 Método de Hidrólise do *p*NPP em Meio Aquoso

Este método foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995). É baseado na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila pela enzima, em meio aquoso. A liberação do *p*-nitrofenol, o qual reage com a água e é convertido em *p*-nitrofenolato, que possui coloração amarela, seguida a 410nm (Figura 12).

Procedimento

Soluções Utilizadas:

Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila em isopropanol (3mg/mL);

Solução B: Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8 e álcool polivinílico - PVA 0,25%.

Em um béquer pequeno foram adicionados 0,9 mL da solução B + 0,1 mL da solução A e agitou-se lentamente. Em seguida, colocou-se 0,9 mL desta mistura em uma cubeta na qual, após estabilizada a temperatura de 35°C, foi adicionada a solução de enzima (0,1 mL) ou o tampão, quando se preparou o branco. A leitura foi feita sempre contra um branco contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a

35°C e pH 8,0. A cinética da reação foi acompanhada pela leitura das absorbâncias a 410 nm a cada 20 s durante 1 min.

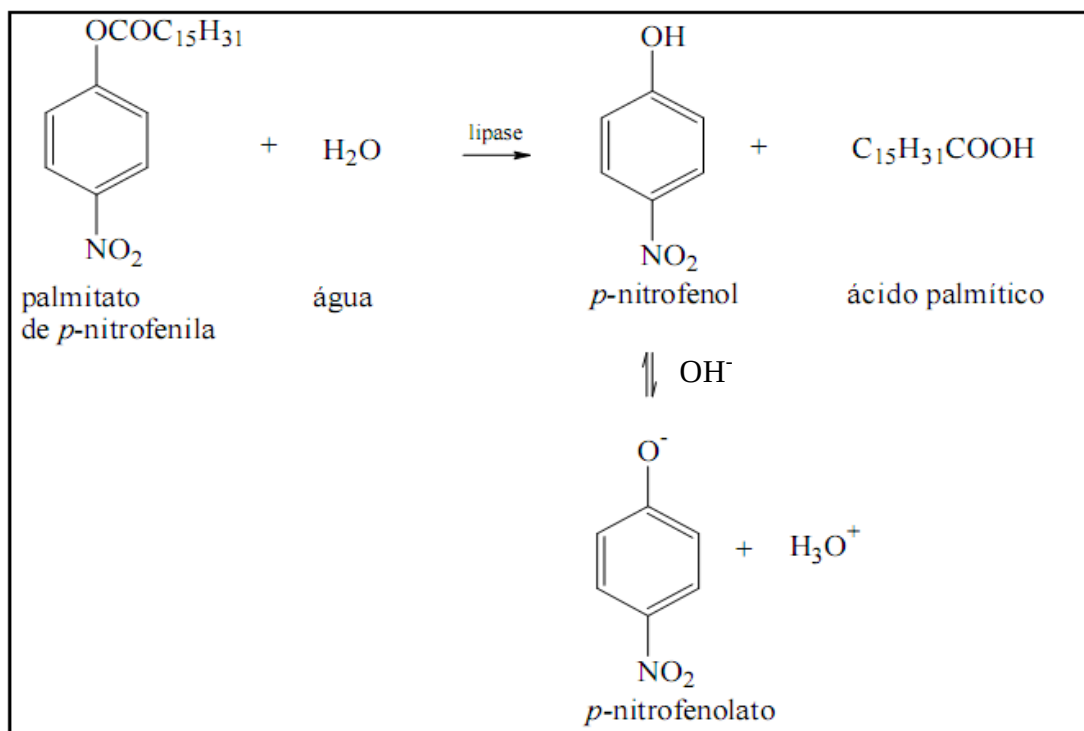


FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE *P*-NITROFENILA CATALISADA POR LIPASES

Fonte: BARON (2008)

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto. Para o cálculo da atividade enzimática, a Equação 2 foi utilizada, baseando-se no coeficiente de absorvidade molar do *p*-nitrofenol, obtido a partir de uma curva de calibração do *p*-nitrofenol nas mesmas condições do ensaio. O coeficiente de extinção molar do *p*NPP em pH 8,0 ($1,5783 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (HERNÁNDEZ-RODRIGUES et al., 2009) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura de cada amostra.

$$A = \frac{C_{ang} \cdot 60 \cdot ND}{\epsilon \cdot X_{enz}} \quad (2)$$

Sendo: C_{ang} : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em segundos);
 60: transformação de segundos para minutos;
 ND: número de diluições;
 ϵ : coeficiente de extinção molar do *p*NP a pH = 8 ($1,5783 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).
 X_{enz} : quantidade de enzima livre (mg)

4.4.1.2 Método de Hidrólise do *p*NPP em Solvente Orgânico

Os procedimentos de hidrólise do *p*NPP em meio não-aquoso foram baseados na metodologia descrita por Pencreac'h e Baratti (1996) e estabelecida no LTEB por Lima et al. (2004). A reação foi realizada em *n*-heptano contendo $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de *p*NPP. A enzima imobilizada (10 mg) foi adicionada em 5 mL do meio reacional, para início da reação, e em intervalos de tempo de 3 min, alíquotas de 100 μL de amostras foram retiradas. O *p*-nitrofenol liberado pela hidrólise enzimática foi extraído com 2 mL de uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (o rendimento da extração é de 75%). Após a agitação em vórtex por 30 s, a amostra foi centrifugada a $6.000 \times g$ por 10 min. A absorbância da fase aquosa foi determinada a 410 nm. O coeficiente de extinção molar ($0,9536 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi 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 min a 40°C , nas condições de ensaio. A atividade da enzima foi calculada a partir da Equação 3.

$$A = \frac{C_{ang}}{\epsilon \cdot m_{enz} \cdot 0,75} \quad (3)$$

Sendo: C_{ang} : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em minutos);
 ϵ : coeficiente de extinção molar do pNPP em pH 13 (NaOH 0,1 mol L⁻¹);
 m_{enz} : massa da enzima imobilizada (em mg);
0,75: correção com relação ao rendimento da extração (75%).

4.4.1.3 Método Titulométrico (pH-Stat)

Este método utiliza substratos naturais (triacilgliceróis) das lipases e foi utilizado para caracterizar e confirmar a atividade lipolítica da enzima livre, visto que o pNPP é um substrato sintético.

A metodologia proposta por Stuer, Jaeger e Winkler (1986) baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis (Figura 13), utilizando um titulador automático do tipo pHStat (Metrohm 718 Stat Titrino).

Foram utilizados os substratos tributirina (54 mmol.L⁻¹), tricaprilina (63 mmol.L⁻¹) e trioleína (62 mmol.L⁻¹) da marca Sigma – Aldrich. Para todos os substratos foi feita uma emulsão com goma arábica (3%, m/v), CaCl₂ (2 mmol.L⁻¹), tampão Tris-HCl (2,5 mmol.L⁻¹, pH 7,25) e NaCl (150 mmol.L⁻¹) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). Esta emulsão foi misturada durante 1 h em agitador mecânico. O volume de 1 mL (0,035 mg_{ptn}/mL tampão) da solução enzimática foi adicionado em 20 mL da solução (ou emulsão) sob agitação magnética (300 rpm) no próprio frasco de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado) a 25°C; a reação foi seguida por 10 min. A unidade de atividade lipolítica é definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 µmol de ácidos graxos por min.

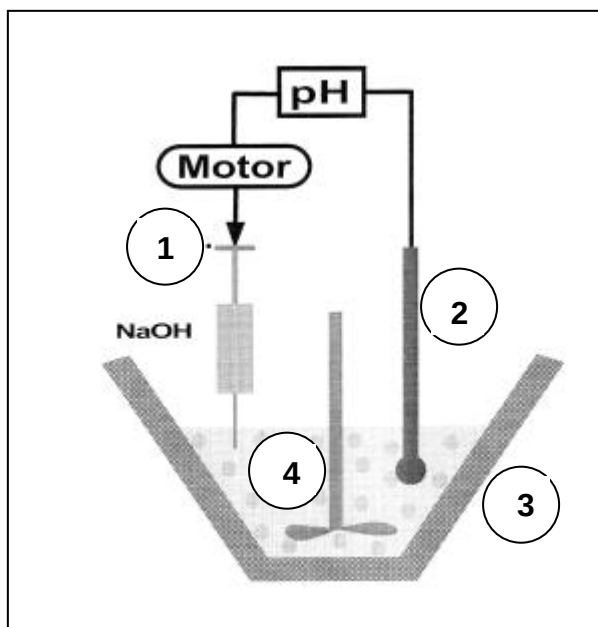


FIGURA 13 - PRINCÍPIO DO MÉTODO DE TITULAÇÃO DO pH-STAT

Legenda: 1) tubo por onde o NaOH é liberado; 2) eletrodo que mede o pH do meio reacional; 3) reator termostatizado; 4) Barra magnética para a agitação.

Fonte: BEISSON et al. (2000).

A Equação 4 foi utilizada para o cálculo da atividade:

$$A = \frac{V \cdot [\text{NaOH}] \cdot \text{FC}}{t \cdot X} \quad (4)$$

onde: V: Volume de NaOH consumido na titulação em mL;

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

FC: fator de correção do NaOH;

T: tempo em min;

X: quantidade de enzima livre (mg)

Para o cálculo das atividades, foi utilizado um fator de correção para cada valor de pH utilizado durante as reações (Tabela 5), devido à dissociação parcial das carboxilas da tributirina, tricaprilina e trioleína, que possuem um valor de pKa de 4,57, 4,89 e 6,8 respectivamente (CHAHINIAN et al., 2005).

TABELA 5 - FATORES DE CORREÇÃO PARA OS SUBSTRATOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

TRIBUTIRINA		TRICAPRILINA		TRIOLEÍNA	
pH	Fator de Correção	pH	Fator de Correção	pH	Fator de correção
4,0	4,715	5,0	1,776	5,0	64,096
4,5	2,175	5,5	1,245	5,5	20,953
5,0	1,372	6,0	1,078	6,0	7,310
5,5	1,118	6,5	1,025	6,5	2,995
6,0	1,037	7,0	1,008	7,0	1,631
6,5	1,012	7,5	1,002	7,5	2,000
7,0	1,004			8,0	1,063
7,5	1,001			8,5	1,020
				9,0	1,006

Fonte: ALOLOU et al. (2007)

4.4.2 Determinação de Proteínas

O método proposto por Bradford (1976) foi utilizado para dosagem de proteínas na solução enzimática. Este método consistiu do seguinte procedimento: 100 µL da amostra são adicionados a 1 mL da solução corante (solução de Bradford - Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L, 5% (v/v) de etanol 95% (v/v) e 10% (v/v) de ácido fosfórico 85% (m/v) em água). A mistura é homogeneizada e a absorbância lida a 595 nm. A concentração de proteínas é calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

4.4.3 Método de análise das amostras proveniente das reações de esterificação e hidrólise em meio orgânico

4.4.3.1 Método de Lowry-Tinsley

Este método mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cu^{2+} e os ácidos graxos livres (Figura 14) solúveis em fase orgânica. A concentração de ácido graxo no meio é relacionada à absorbância pela

curva de calibração feita com o ácido oleico (Sigma, pureza 90%), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio.

O método de Lowry e Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácido oleico durante as reações síntese do oleato de etila e de hidrólise da trioleína em meio orgânico, e possibilitar os cálculos dos rendimentos de esterificação e da atividade enzimática de hidrólise. No caso da reação de esterificação, a atividade foi calculada pelo desaparecimento do ácido graxo do meio reacional. Uma unidade de atividade de esterificação corresponde à quantidade de enzima que promove a síntese de 1 μmol de éster na unidade de tempo nas condições do experimento. Já para a reação de hidrólise, a atividade foi calculada a partir da liberação dos ácidos graxos no meio reacional. Neste caso, uma unidade de atividade de hidrólise corresponde à quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de ácido graxo na unidade de tempo.

Para cada ensaio, foram adicionados 100 μl da amostra a ser analisada em *eppendorfs* contendo 1,15 mL de tolueno e o reativo de cor (250 μl), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%), com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex (agitador de tubos) durante 1 min. A absorbância da fase orgânica é lida a 715 nm.

A atividade enzimática é calculada a partir da velocidade inicial da reação, sendo o cálculo da atividade feito a partir do gráfico da porcentagem de conversão em éster na reação de esterificação ou de ácidos graxos na reação de hidrólise, em função do tempo, tomando-se a equação da reta tangente ao início da curva (partindo do ponto zero). A conversão em éster (%) foi determinada a partir da concentração de ácido graxo no meio que é relacionada à absorbância através de uma curva de calibração, ou seja, o desaparecimento dos ácidos graxos do meio reacional (%) é inversamente proporcional à conversão em éster (%).

Curva Analítica

Para a determinação da curva analítica foram preparadas amostras contendo entre 5 e 160 mmol de ácido oleico pela dissolução em balões volumétricos com 10 mL de *n*-heptano. Em seguida, 100 μ L da solução do ácido foram adicionados ao reagente de Lowry (0,25 mL do reagente acetato cúprico + 1,15 mL de tolueno) formando duas fases que foram misturadas vigorosamente durante 60 s usando um misturador vórtex. A mistura foi centrifugada a 3000 $\times$ *g* por 10 min, até que a fase aquosa fosse claramente separada da fase orgânica por sedimentação. A curva analítica foi determinada a partir da medida da absorbância da solução a 715 nm contra o controle, que não continha ácidos graxos livres.

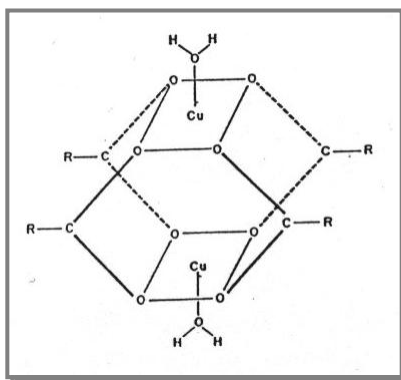


FIGURA 14 - ESTRUTURA DO COMPLEXO FORMADO ENTRE O ÍON Cu^{2+} E OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM SOLUÇÃO

4.4.4 Método de Análise das Amostras Provenientes das Reações de Esterificação por Cromatografia Gasosa

4.4.4.1 Quantificação do Teor de Éster nas Amostras por Padronização Interna

Essa metodologia de análise foi utilizada na quantificação do teor de éster das amostras referentes à melhor condição para a reação de esterificação. As análises

cromatográficas referentes a esta etapa foram realizadas no Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos da UFPR (LACAUT).

Para a análise, o solvente presente na amostra foi parcialmente eliminado deixando-a na temperatura de 50°C em estufa. Em um vial, 0,05 g de amostra foram diluídos em 1 mL da solução do padrão interno heptadecanoato de metila (Sigma-Fluka, pureza 99,8%) em *n*-heptano (10 mg.mL⁻¹). As amostras foram analisadas em cromatógrafo de fase gasosa Varian, modelo CP 3800 com detector FID equipado com coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 5 CB (100% dimetilpolisiloxano), com 0,32 mm de diâmetro interno, 60 m de comprimento e 1,00 µm de filme líquido. A temperatura do injetor foi de 250°C, a relação *split* de 1:50, e a quantidade de amostra injetada igual a 1,0 µL. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a temperatura do detector FID de 300°C com programação de temperatura do forno: temperatura inicial de 250°C, permanecendo por 10 min, elevação a 280°C na razão de 20°C/min, permanecendo por 15 min. Fluxo do gás de arraste de 1 mL.min⁻¹ com pressão constante de 20 psi. O tempo total da corrida foi de 26 min.

Nesta etapa do trabalho, o teor de éster em cada amostra (C) foi calculado pela Equação 5:

$$C (\%) = \frac{\Sigma A - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{PI \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} \times V_{PI} \text{ (mL)}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (5)$$

Onde: C = porcentagem de éster na amostra

A = soma das áreas dos picos

A_{PI} = área do pico do padrão interno

PI = concentração do padrão interno (mg.mL⁻¹)

VPI = volume do padrão interno (mL)

m_{amostra} = massa da amostra utilizada da análise (g)

4.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas com a finalidade de verificar alterações conformacionais no suporte Accurel antes e depois do processo de imobilização da lipase ROL estudada neste trabalho, bem como para verificar se houve alterações na enzima imobilizada após as reações de esterificação. As análises foram realizadas em um microscópio Jeol (Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR). Esta técnica permite visualizar o material superficialmente, com aproximadamente 10 nm de espessura. Amostras de 0,5 mg de suporte (com ou sem a enzima) previamente secas foram utilizadas. Para obtenção da imagem da superfície foi necessário depositar um filme de ouro sobre o suporte.

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS

Para comparar se duas amostras apresentavam diferenças significativas entre si, foi aplicado o teste t, com o auxílio das ferramentas de análise do Excell, com nível de significância de 5%, onde:

- $p > 0,05$ significa que não houve diferença significativa entre a média das amostras;
- $p < 0,05$ significa que houve diferença significativa entre a média das amostras

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

Conforme relatado anteriormente, já existem alguns dados sobre a caracterização da lipase ROL recombinante na literatura (item 2.1.3.1). No entanto, pequenas modificações na enzima devido aos procedimentos de superexpressão, ou mesmo da cepa de origem do fungo, podem levar a diferenças nas características cinéticas da enzima, cujo conhecimento é necessário para o trabalho experimental. Devido a isto, foi feita uma caracterização da ROL utilizada neste trabalho, com ênfase nas propriedades de maior importância para o seu emprego em biocatálise, tais como caracterização da atividade de hidrólise, pH e temperatura ótimos para a atividade e ensaios de estabilidade, cujos resultados estão apresentados a seguir.

5.1.1 Eletroforese SDS-Page

Para verificação do grau de pureza do extrato lipolítico utilizado, foi realizada uma eletroforese SDS-Page. Como pode ser observado na Figura 15, existem várias bandas de diferentes massas moleculares presentes no extrato enzimático, indicando que a enzima não está pura. A banda correspondente à lipase ROL é provavelmente a banda de 30 kDa, considerando que esta é a massa molecular esperada para esta enzima (HAMA et al. e SALAH et al., 2006; MINNING, DANNERT-SCHMIDT e SCHMID 1998).

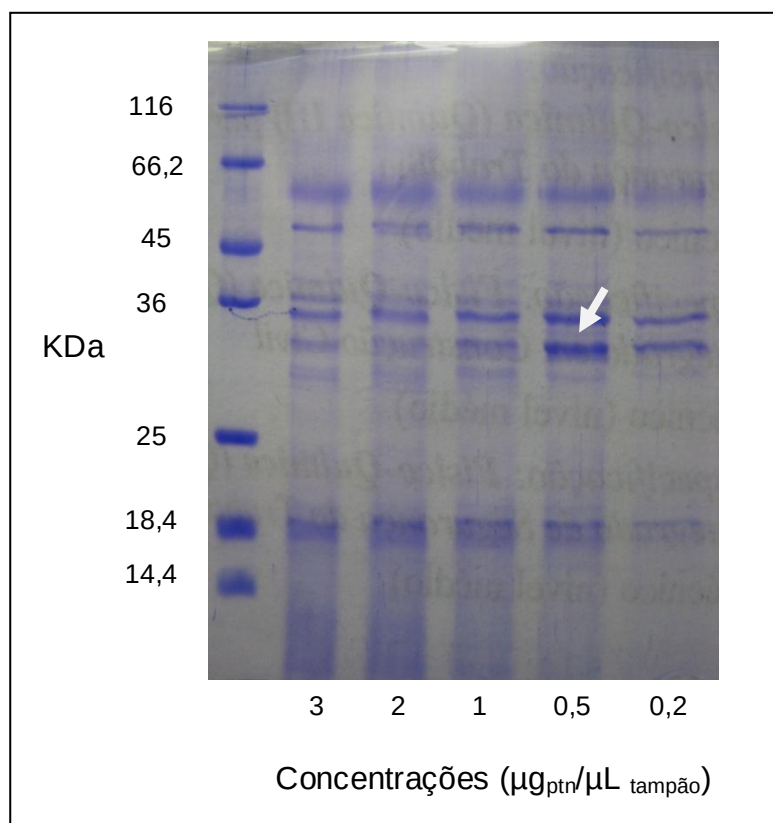


FIGURA 15 - ELETROFORESE SDS-PAGE DO EXTRATO LIPOLÍTICO DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

5.2 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA ENZIMA LIVRE

5.2.1 Atividade de Hidrólise

A atividade da enzima na forma livre foi determinada pelos seguintes métodos: hidrólise do *p*NPP em meio aquoso (item 4.4.1.1) e titulométrico (pHStat) (item 4.4.1.3). Para o primeiro, foi utilizado como substrato sintético o éster palmitato de paranitrofenila (*p*NPP) e para o segundo, foram empregados os substratos naturais de lipases tributirina (C4), tricaprilina (C8) e trioleína (C18:1). Os resultados estão mostrados na Tabela 6. A maior atividade hidrolítica ocorreu com o substrato tricaprilina ($874 \pm 20 \text{ U.mg}^{-1}$), no entanto, a enzima também apresentou uma alta

atividade contra trioleína ($625 \pm 20 \text{ U.mg}^{-1}$), o que, segundo Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999), mostra que a atividade de ROL corresponde a de uma lipase “verdadeira”.

Minning, Dannert-Schmidt e Schmid (1998) também verificaram maior atividade de hidrólise da ROL recombinante na forma purificada para os substratos tricaprilina (9608 U.mg^{-1}) e trioleína (8571 U.mg^{-1}), após fazer ensaios para determinação da especificidade da enzima com vários substratos pelo método titulométrico em pH Stat. Considerando que lipases atuam na interface de uma emulsão e sua atividade está relacionada à área interfacial (JAEGER e REETZ, 1998), a menor atividade relatada para a trioleína pode estar relacionada à qualidade da emulsão formada, pois, quanto mais longa a cadeia do substrato, mais insolúvel ele será, e pior a qualidade da emulsão, que apresenta uma menor área interfacial.

TABELA 6 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* RECOMBINANTE COM DIFERENTES SUBSTRATOS EM MEIO AQUOSO

Substrato	Atividade específica $^*(\text{U.mg}^{-1})$
pNPP	292 ± 17
Tributirina C4	534 ± 27
Tricaprilina C8	874 ± 20
Trioleína C18:1 (Δ^9)	625 ± 20

* Proteínas dosadas por Bradford (1976).

Condições: pH 7,25, 25°C, duração: 10 min, concentração da enzima: 0,5 mg/mL. Substratos pré-emulsificados.

Estes valores de atividade também podem ser comparados com alguns estudos que utilizaram a lipase de *R. oryzae* nativa. Essamri, Deyris e Comeau (1998), utilizaram o micélio em pó de *R. oryzae* (ATCC 24563) contendo a lipase e, nas melhores condições, o extrato lipolítico apresentou atividade de 4 U.mg^{-1}

utilizando como substrato a tricaprilina. Salah et al. (2001) relataram atividade de 1800 U.mg⁻¹ utilizando a lipase de *R. oryzae* (cepa não relatada) purificada contra o substrato tricaprina. Hama et al. (2006) encontraram a atividade de 2560 U.mg⁻¹ para lipase de *R. oryzae* (cepa IFO 4697) na forma pura, utilizando a trioleína como substrato. As atividades de hidrólise encontradas neste trabalho para a ROL recombinante podem ser consideradas altas, visto que esta não se encontra na sua forma pura.

5.2.2 Efeito do pH e Temperatura Sobre a Atividade da Enzima

5.2.2.1 Temperatura

Os melhores valores de atividade foram obtidos numa faixa de 30 a 40°C (Figura 16), sendo que a atividade mais alta foi observada na temperatura de 35°C para todos os substratos utilizados (trioleína, tricaprilina e tributirina), ficando em torno de 743, 1182 e 621 U.mg⁻¹, respectivamente.

Minning, Dannert-Schmidt e Schmid (1998) também relataram a temperatura de 35°C como ótima para a ROL recombinante purificada. Entretanto, dados fornecidos por Valero (2009) que utilizou como substrato o éster 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-glutárico-(metilresorufina), mostraram que, para este substrato, 40°C é a temperatura ideal para a maior atividade desta lipase. Algumas diferenças podem ocorrer devido a diferenças na metodologia de dosagem aplicada e nas condições de expressão e purificação das lipases. Outros autores relatam valores de temperatura ótimos para a atividade da lipase de *R. oryzae* nativa entre 30 a 40°C, semelhantes aos encontrados neste trabalho (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2008; LOPEZ et al., 2008; GHAMGUI et al., 2007; SALAH et al., 2001; HIOL et al., 2000).

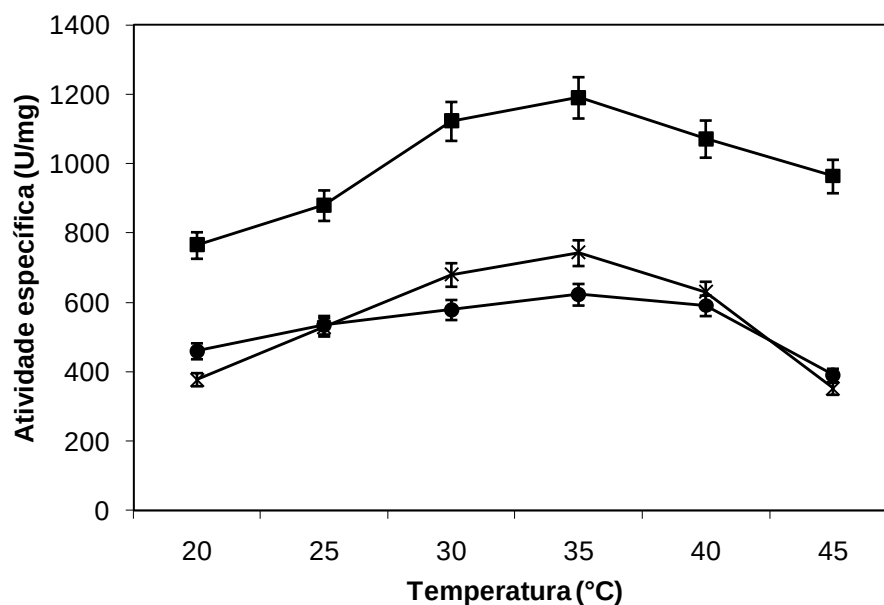


FIGURA 16 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* RECOMBINANTE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS

Condições: pH 7,25, duração: 10 min, concentração de proteína: 0,035 mg/mL. Substratos pré-emulsificados. (■) tricaprilina, (x) trioleína, (●) tributirina.

5.2.2.2 pH

Os ensaios para verificação da atividade da enzima sob diferentes valores de pH foram feitos a 35°C, visto que foi esta a temperatura ótima para a atividade de hidrólise observada no experimento anterior. A lipase apresentou maior atividade na faixa de pH entre 7,25 e 8,5 utilizando os substratos tributirina e tricaprilina (Figura 17). Entretanto, quando utilizado o substrato trioleína, ficou evidenciado que existe um valor de pH de 8,25 para a máxima atividade. Esta diferença pode estar relacionada à qualidade da emulsão, que por sua vez é fortemente influenciada pelo comprimento da cadeia do ácido graxo do triacilglicerol e pelo pH do meio. Outros autores que utilizaram a lipase de *R. oryzae* relatam valores de pH entre 7,0 e 8,5 para a melhor atividade da enzima (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2008; LOPEZ et al., 2008; GHAMGUI et al., 2007; ESSAMRI, DEYRIS e COMEAU, 1998).

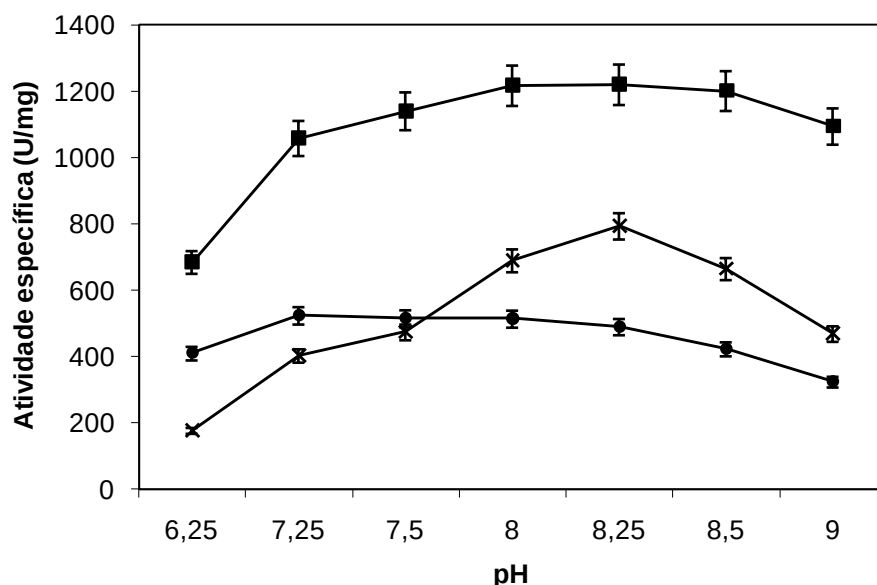


FIGURA 17 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS

Condições: 35°C, concentração da enzima: 0,035 mg/mL. Substratos pré-emulsificados. (■) tricaprilina, (x) trioleína, (●) tributirina.

5.2.3 Estudos de Estabilidade da Enzima

5.2.3.1 Efeito da Temperatura

Neste trabalho, visto que já houve a verificação do efeito do substrato na atividade de hidrólise da enzima, foi escolhido o substrato trioleína para a medida de atividade nos estudos de estabilidade. O tempo de 24 h de incubação foi utilizado porque um dos objetivos do estudo era utilizar esta lipase na síntese de ésteres em reações de esterificação e transesterificação, que podem necessitar de longos períodos para a total conversão em éster.

A ROL recombinante apresentou queda de atividade após ser incubada por 24 h em temperaturas entre 20 e 50°C (Figura 18). A atividade de hidrólise diminuiu conforme houve o aumento da temperatura, havendo perda de atividade de 40% a

20°C, com queda drástica a partir de 35°C e, a 50°C, praticamente nenhuma atividade residual foi detectada.

A estabilidade à temperatura depende do tempo de incubação utilizado no experimento, e, em muitos casos, estes tempos de incubação diferem significativamente, o que dificulta comparações. Por exemplo, no estudo de Minning, Dannert-Schimidt e Schmid (1998), a ROL expressa em *P. pastoris* foi estável em temperatura de até 50°C (70% de atividade residual), no entanto, o período de incubação foi de apenas 30 min. Por outro lado, a ROL nativa é estável em temperaturas entre 20 e 37 °C (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2008; GHAMGUI et al., 2007; HIOL et al., 2000). Hiol et al. (2000) incubaram a ROL (produzida a partir de uma cepa extraída do fruto de palma), em temperaturas de 20 a 50°C, durante 30 min, e a enzima manteve-se estável até 35°C, havendo perda da atividade a partir desta temperatura. Ghamgui et al. (2007) verificaram que a enzima, após 24 h de incubação em temperaturas entre 30 a 70°C, foi completamente inativada já a 50°C, o que está de acordo com os dados do presente estudo. Karra-Châabouni et al. (2008), após incubação da ROL (cepa isolada do óleo de oliva em decomposição) em temperaturas de 25 a 60°C durante 1 h, relataram que em 50°C a enzima já havia perdido 90% da atividade. Como pode ser observado, não há padronização nas metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. Além disso, a termoestabilidade das lipases varia entre os gêneros, as espécies e até entre as isoformas produzidas por uma mesma cepa.

Conforme os resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que a ROL livre é pouco estável à temperatura, justificando os ensaios de imobilização que visam aumentar a sua estabilidade.

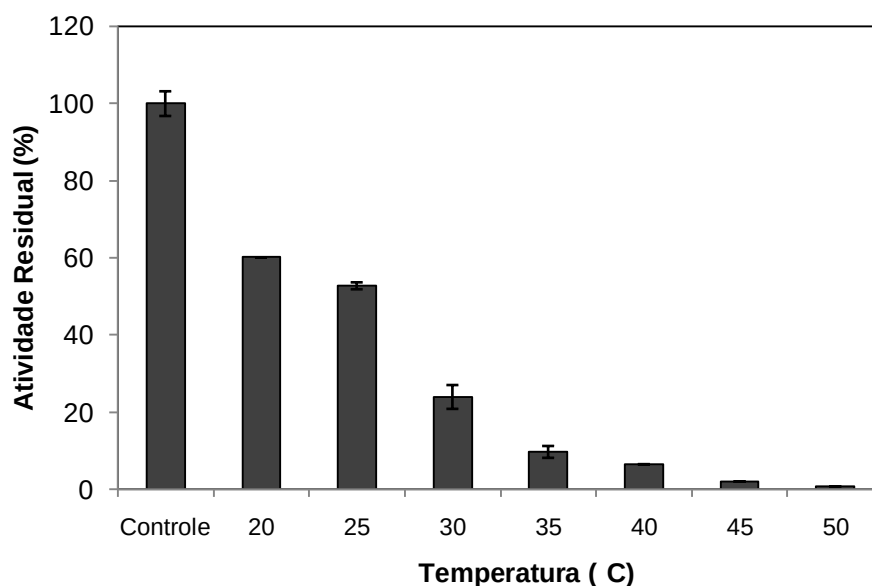


FIGURA 18 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

Condições: Incubação de 24 h em tampão Tris-HCl pH 8,0. Controle: sem pré-incubação.

5.2.3.2 Efeito do pH

Após ser incubada em tampões com diferentes valores de pH por 24 h a 4°C, a ROL recombinante apresentou maior estabilidade em pH 8,0, mantendo 92% da atividade inicial (Figura 19). Em valores de pH 7,0 e 9,0 a atividade residual foi ainda alta (em torno de 65-70%), mas, curiosamente, em pH 6 e pH 6,25 houve perda total da atividade.

Os resultados relatados na literatura com relação ao efeito do pH na estabilidade de ROL são bastante heterogêneos. Nos dados reportados por Valero (2009), a lipase ROL recombinante foi incubada em tampões com valores de pH entre 7,25 e 9,0 durante 1 h a 25°C e foi encontrado que, em pH 7,25, a ROL foi mais estável, e que, conforme houve o aumento do pH de incubação, maior foi a perda de atividade enzimática. Entretanto, Minning, Dannert-Schmidt e Schmid (1998) verificaram que entre os valores de pH 6,0 e 7,0, a lipase de *R. oryzae* recombinante é mais estável após incubação de 30 min na temperatura de 30°C, no entanto, valores inferiores ou superiores a este, a lipase perde em torno de 60 a

90% de atividade. Em relação à lipase na sua forma nativa, Hiol et al. (2000) relatam que a ROL manteve-se estável (atividade residual de 100%) entre os valores de pH 5,0 e 7,5, após incubação da enzima na faixa de pH de 3,5 e 8,5 durante 1 h a 25°C. No estudo de Ghamgui et al. (2007), os autores relatam que a ROL foi mais estável em pH 8,0, após 24 h de incubação na temperatura de 25°C. Karra-Châabouni et al. (2008), verificaram maior estabilidade da enzima em pH 6,0 após 1 h de incubação a 4°C.

Novamente, estes diferentes resultados para uma mesma enzima podem ser atribuídos a alguns fatores, como a origem ou mesmo às isoformas produzidas por um mesmo microrganismo (LOPEZ et al., 2004). Estas variações também dependem em grande parte das condições do ensaio, como o tempo de incubação, pH e temperatura, do método e do substrato utilizado para a medida de atividade, tornando, muitas vezes, a comparação com outros estudos é inviável.

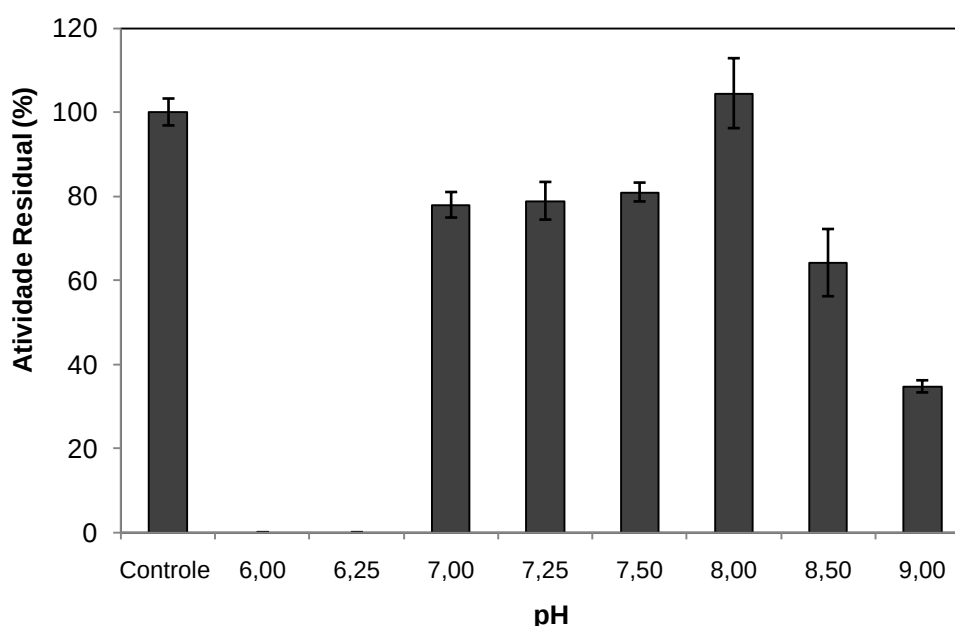


FIGURA 19 - EFEITO DO pH SOBRE A ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

Condições: Incubação de 24 h em tampão fosfato ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) para os valores de pH entre 6,25 e 7,0 e tampão Tris-HCl ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) para os valores de pH entre 7,25 e 9,0 a 4°C. Controle: sem pré-incubação.

5.3 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO

O principal interesse em imobilizar a lipase ROL foi o de aumentar a atividade e estabilidade da enzima em meios orgânicos, além de propiciar a recuperação da enzima após a sua utilização nas reações de esterificação.

5.3.1 Determinação da Quantidade de Proteína a ser Oferecida para a Imobilização

Para todas as concentrações de proteínas estudadas, observou-se (Figura 20) que a imobilização se processou com 24 h de contato entre o suporte e a solução enzimática, pois menos de 10% de atividade residual foram encontrados no sobrenadante após este período. Mesmo para a maior concentração de proteína inicialmente oferecida para imobilização (30 mg.g⁻¹ de suporte). Percebe-se assim que o aumento do tempo de imobilização (para 48 e 72 h) não causou aumento significativo na adsorção da lipase no suporte. Portanto, o tempo de 24 h foi adotado para os experimentos subsequentes.

Conforme descrito no item 2.2.1, a imobilização por adsorção, que foi o método utilizado neste trabalho, pode proporcionar a imobilização seletiva das lipases. Isto pode ser observado na Figura 21, em que a concentração de proteína residual no sobrenadante decresce para aproximadamente 55% (10-20 mg proteína inicial /g suporte) nas primeiras 24 h de imobilização, estabilizando-se a partir deste tempo. A Figura 20 mostra que, neste mesmo meio de imobilização, não há mais atividade enzimática. Sendo assim, as proteínas encontradas no sobrenadante após 24 h (Figura 21) não são lipases.

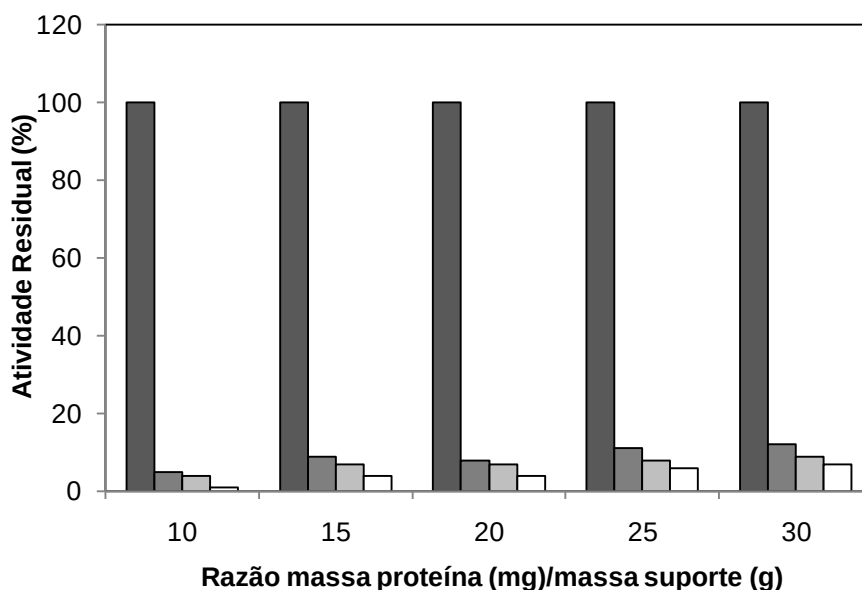


FIGURA 20 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* EM ACCUREL MP-1000 EM TERMOS DE ATIVIDADE RESIDUAL DO SOBRENADANTE

Atividade residual do sobrenadante determinada pelo método do *pNPP* em meio aquoso. (■) 0 h, (▒) 24 h, (░) 48 h, (□) 72 h.

Segundo Sabuquillo et al. (1998), o método de adsorção hidrofóbica seletiva em suportes ativados por diferentes grupos hidrofóbicos de baixa força iônica tem sido usado para concentrar e purificar lipases presentes em extratos brutos de proteínas. Os mesmos autores relatam que o mecanismo pelo qual as lipases são adsorvidas em suportes hidrofóbicos é diferente daquele utilizado para a maioria das proteínas. Dada a grande superfície hidrofóbica em torno do sítio ativo, a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é mais vantajosa uma vez que pode propiciar a ativação da maioria das lipases, a seletividade da adsorção que, em alguns casos, promove a purificação da lipase e a maior enantioseletividade da lipase.

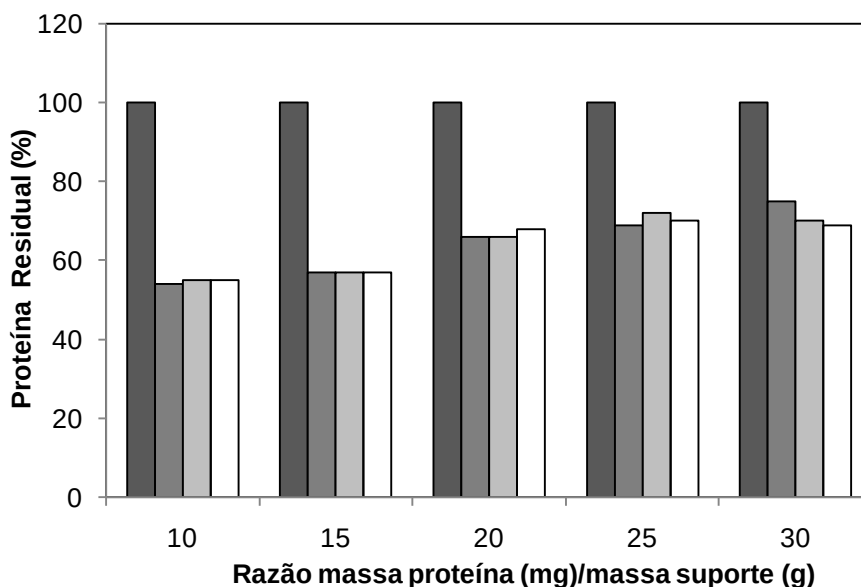


FIGURA 21 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA E DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* NO TEOR DE PROTEÍNAS RESIDUAIS

Proteína residual do sobrenadante determinada pelo método do Bradford (1976). (■) 0 h, (■) 24 h, (■) 48 h, (□) 72 h.

5.3.2 Eficiência da Imobilização

Considerando que a eficiência de imobilização é calculada pela máxima adsorção de atividade do sobrenadante no suporte, obteve-se a melhor a eficiência de imobilização, 99%, para a menor concentração inicial de proteínas, 10 mg/mL (Tabela 7). O aumento da concentração de proteína inicial na solução enzimática promoveu uma redução de E, atingindo 7% de redução para a mais alta concentração (30 mg de proteína/g de suporte). No entanto, pode-se considerar que houve uma boa eficiência de imobilização (93 a 99%) para todas as quantidades de proteínas utilizadas no processo de imobilização. Entretanto, o fato de ter se conseguido uma boa eficiência de imobilização não garante que a enzima esteja ativa no suporte, pois este parâmetro mostra apenas que houve o desaparecimento da atividade no sobrenadante após a imobilização.

TABELA 7 - EFICIÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA POR GRAMA DE SUPORTE

Razão proteína / massa suporte (mg.g ⁻¹)	E (%)
10	99
15	96
20	96
25	94
30	93

a) Eficiência (%) – calculada a partir dos dados da Figura 20 por diferença entre a atividade inicial da solução enzimática e a atividade final do sobrenadante após a imobilização.

Segundo Almeida et al. (2008), a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos pode causar ativação da enzima e esta ativação depende da relação proteína/suporte utilizada no processo de imobilização. Quando há uma baixa relação proteína/suporte, pode haver ainda alguns sítios de adsorção disponíveis e alguma ativação pode ser observada, mas esta situação não é a ideal, pois as forças atrativas entre os sítios de adsorção de proteínas que ainda estão livres podem distorcer a conformação estrutural da enzima. A ativação máxima é encontrada para relações intermediárias, quando um ambiente que maximiza a eficiência catalítica da enzima é formado.

Considerando o exposto acima, para saber qual a melhor relação proteína/suporte em termos de atividade, foram realizados ensaios de atividade da enzima imobilizada, utilizando-se o método de hidrólise do *pNPP* em meio orgânico (Figura 22). As atividades em meio orgânico foram mais baixas (100 a 220 U.g⁻¹), comparadas à atividade da enzima livre em meio aquoso (292 ± 17 U.mg⁻¹, Tabela 6), e a razão proteína/suporte de 15 mg.g⁻¹ proporcionou a maior atividade da lipase (220 ± 42 U. g⁻¹ de suporte).

Em geral, lipases possuem atividade significativamente menor em meios orgânicos do que em meio aquoso (RAHMAN et al., 2005; PENCREAC'H e BARATTI, 1996). Este fato pode ser atribuído ao efeito negativo do solvente sobre a

conformação cataliticamente ativa da enzima ou ao teor de água presente no sistema, visto que, em uma reação de hidrólise, a reação não é favorecida em baixos teores de água. No entanto, a dosagem 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 (BARON et al., 2005).

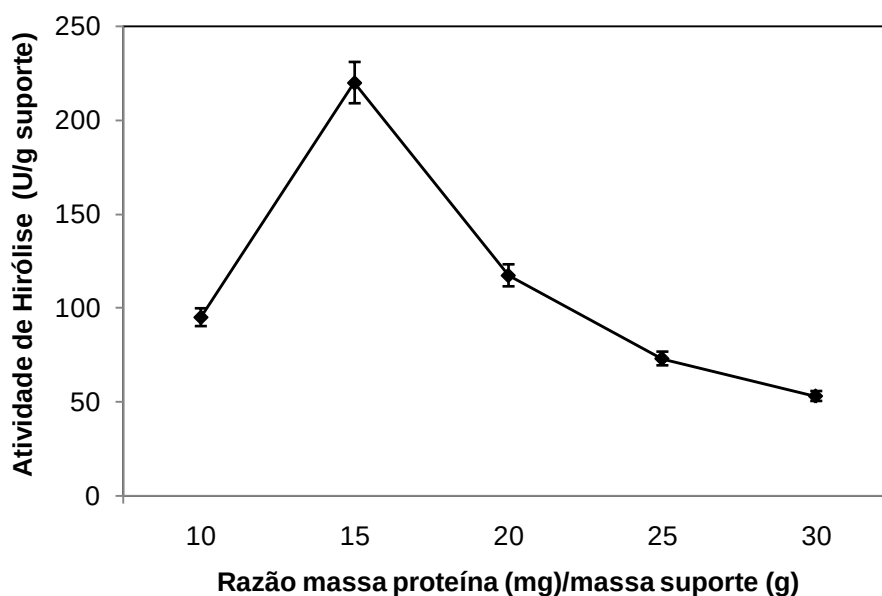


FIGURA 22 – ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* IMOBILIZADA, EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA OFERECIDA PARA A IMOBILIZAÇÃO (MÉTODO p NPP MEIO ORGÂNICO)

Portanto, com base nos resultados destes experimentos, a concentração de enzima oferecida para a imobilização escolhida para os ensaios subsequentes foi de 15 mg proteína/g de suporte, com o tempo de imobilização de 24 h.

5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após verificar as melhores condições de imobilização, foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para verificar as possíveis modificações

que ocorrem no suporte antes e após a imobilização. A Figura 23 (a,b,c) representa o suporte antes da imobilização, onde podem ser observadas as cavidades vazias. Já na Figura 23 (d,e,f) nota-se que as cavidades foram parcialmente preenchidas.

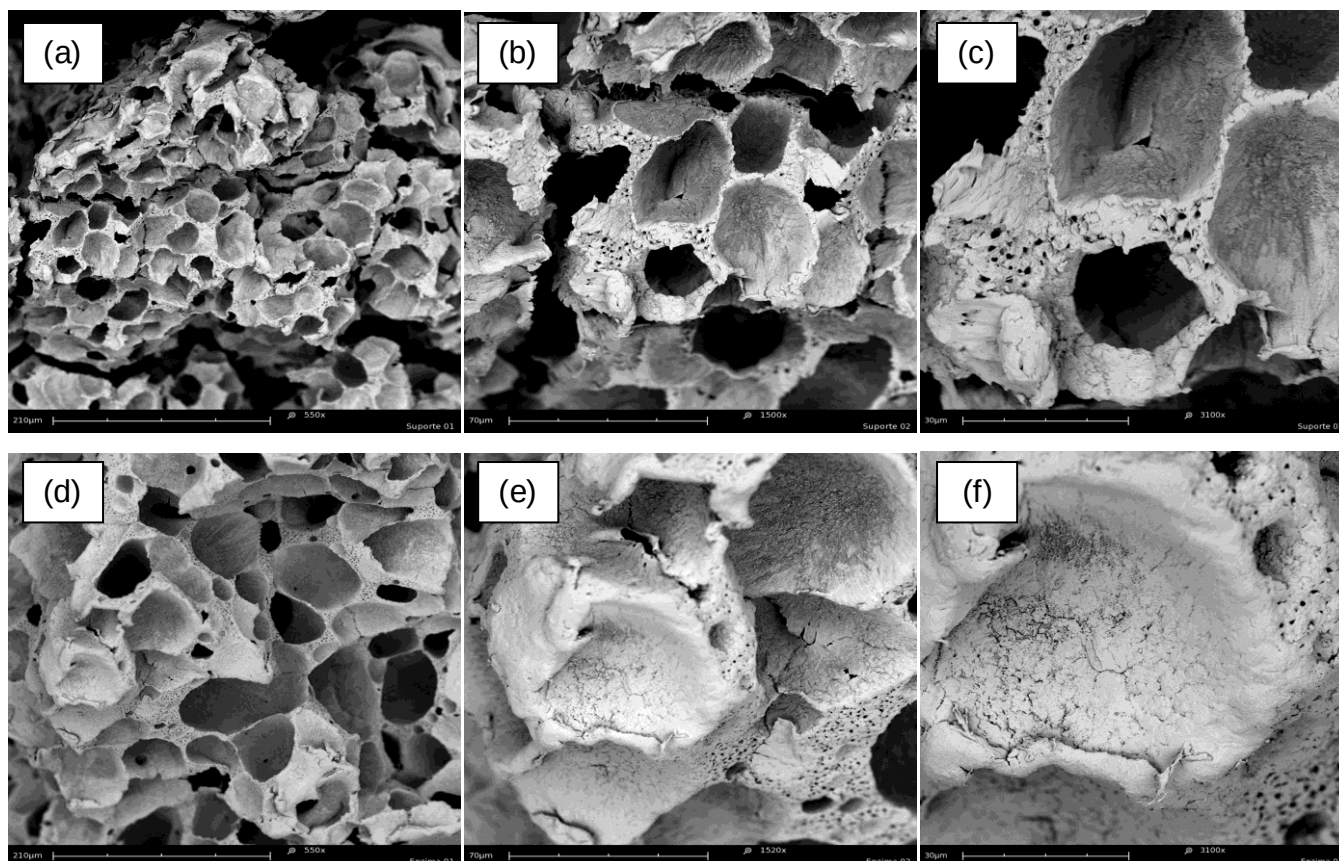


FIGURA 23 – FOTOMICROGRAFIA DO SUPORTE ACCUREL MP 1000 ANTES (A,B,C) E APÓS (D,E,F) A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*. AUMENTO: (A,D) 500, (B,E) 1500, (C,F) 3000.

5.3.4 Atividade de Hidrólise Contra Trioleína em Meio Orgânico

A atividade de hidrólise da enzima imobilizada contra o substrato trioleína foi também importante, visto que este é um substrato natural de lipases. A reação de hidrólise foi realizada em meio orgânico e este método passou a ser utilizado para a caracterização da enzima após cada imobilização.

Neste experimento, foram utilizados 20 mg da enzima imobilizada e a atividade de hidrólise contra a trioleína obtida foi de 695 U.g^{-1} de suporte, calculada a partir da velocidade inicial da reação (Figura 24). Observou-se uma grande diferença (cerca de 3,6 vezes) entre os valores de atividade utilizando como substrato o *pNPP* (220 U.g^{-1}) e a trioleína (695 U.g^{-1}). Esta diferença pode ser explicada pela preferência da lipase ROL por triglicerídeos naturais e de cadeia média e longa, que já havia sido constatada quando dos ensaios em meio aquoso, em que se observou um aumento de 292 U.mg^{-1} de atividade de hidrólise contra o *pNPP* para 625 U.mg^{-1} de atividade utilizando a trioleína como substrato (Tabela 6).

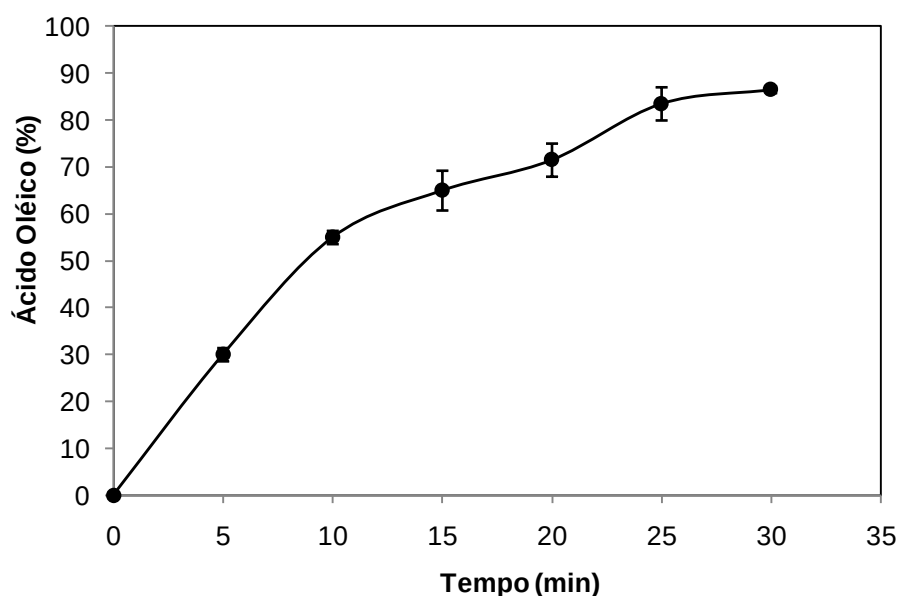


FIGURA 24 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DURANTE A HIDRÓLISE DA TRIOLEÍNA CATALISADA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* IMOBILIZADA EM MEIO ORGÂNICO

Atividade de hidrólise da trioleína em meio orgânico. Meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L^{-1} de trioleína, 2% de água destilada e 20 mg de enzima imobilizada. Condições da reação: 40°C e 200 rpm.

O mesmo ensaio e condições foram utilizados para determinar a atividade da enzima livre empregando-se o extrato lipolítico em pó, porém, a lipase não apresentou nenhuma atividade, indicando que, nestas condições, a ROL é instável. Provavelmente a lipase livre, em contato com o solvente orgânico, forme agregados de proteínas, em cuja superfície situam-se as enzimas que estão diretamente em

contato com o solvente, sendo por ele desnaturadas. No interior dos agregados, a enzima não está em contato com o substrato, e, portanto, a catálise não ocorre. A flexibilidade conformacional de proteínas é considerada um fator crucial da sua função (DANIEL et al., 2003; KLIBANOV, 1997), sendo assim, as enzimas são menos ativas em solventes anidros do que na água devido à sua limitada flexibilidade conformacional, ou seja, ao enrijecimento das conformações da enzima.

5.3.5 Estabilidade ao Armazenamento

A Figura 25 mostra a estabilidade da enzima imobilizada armazenada a 4°C, em termos de atividade residual e pode-se observar que a lipase ROL imobilizada mantém-se muito estável (100% de atividade) ao armazenamento durante 5 meses. Um fator que pode ter influência na manutenção da atividade da lipase armazenada é a sua baixa umidade, pois a presença de água no material pode levar ao crescimento microbiano e à desnaturação da enzima (RÜKOLD, GROBECKER e ISENGARD, 2001).

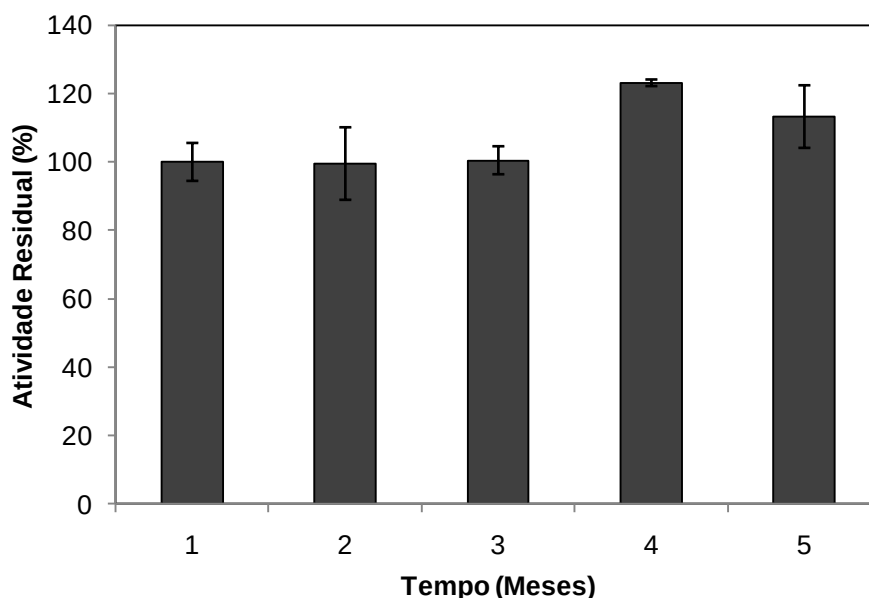


FIGURA 25 – ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* IMOBILIZADA SOB ARMAZENAMENTO A 4°C

Atividade residual de hidrólise da trioleína em meio orgânico. Meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de trioleína, 2% de água destilada e 20 mg de enzima imobilizada. Condições da reação: 40°C e 200 rpm.

Geralmente, as enzimas permanecem ativas quando conservadas em baixas temperaturas, provavelmente porque tendem a manter a sua estrutura original. Outro fator que mantém a enzima estável durante o armazenamento, é o fato de estar imobilizada, pois provavelmente as interações múltiplas da enzima ao suporte, evitam qualquer processo intermolecular como proteólise e agregação (BASRI et al., 1994). Ghamgui et al. (2007) também verificaram que a lipase ROL nativa (cepa não relatada) imobilizada em CaCO_3 manteve-se estável após armazenamento a 4°C durante 240 dias, perdendo menos de 10% da atividade a partir do 151º dia de armazenamento.

5.3.6 Estabilidade à Temperatura - Enzima Imobilizada x Enzima Livre

A estabilidade à temperatura da enzima imobilizada é de grande importância devido à sua permanência nas reações de esterificação e transesterificação que geralmente são realizadas entre 30 e 50°C, por algumas horas. O efeito da temperatura na velocidade da reação, tanto em meios aquo-restritos como em meios aquosos é o mesmo, ou seja, a velocidade de reação aumenta com a temperatura devido ao aumento do número de choques entre as partículas envolvidas na reação. No entanto, o outro fenômeno, que é a desnaturação da enzima com a temperatura, influencia contrariamente, ou seja, a estabilidade da enzima poderá diminuir em ambientes com elevadas temperaturas e a alta eficiência catalítica será perdida rapidamente, antes de uma conversão em éster significativa ser alcançada (FORESTI e FERREIRA, 2005).

Nesse trabalho, foi realizada uma comparação dos efeitos da estabilidade à temperatura entre a lipase livre e imobilizada após incubação por 24 h. Conforme observado na Figura 26, a ROL imobilizada é mais estável à temperatura do que a ROL livre, pois sua atividade residual foi de 76 %, 60% e 40%, respectivamente, nas temperaturas de 30°C, 40°C e 50°C. Já a enzima na forma não-imobilizada, manteve apenas 20% da atividade a 30°C, e a partir de 40°C houve praticamente perda total da atividade. Portanto, pode-se concluir que a enzima quando imobilizada em

Accurel apresenta maior estabilidade à temperatura, condição primordial para a realização dos ensaios de esterificação.

A maior estabilidade à temperatura de lipases imobilizadas em Accurel também foi relatada por vários autores e está provavelmente relacionada com a maior rigidez da enzima, conferida pela sua ligação com o suporte. Benaiges et al. (2010) verificaram que a lipase 2 de *Candida rugosa* expressa na levedura *Pichia pastoris*, após ser imobilizada em Accurel EP 100, apresentou maior estabilidade à temperatura do que a enzima na forma livre, que perdeu toda a atividade após a incubação em tampão durante 1 h, sendo que a lipase imobilizada manteve em torno de 25% da atividade inicial após incubação pelo mesmo período (1h). Os autores também verificaram que a lipase recombinante foi muito menos estável que a sua forma nativa e atribuíram este resultado ao maior grau de glicosilação da enzima da cepa nativa. Kaewthong et al. (2005) também relataram uma maior estabilidade da lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada em Accurel EP 100, que após incubação durante 24 h na temperatura de 45°C, manteve 90% da atividade inicial, enquanto a lipase livre perdeu 50% da atividade.

Outros autores que utilizaram a lipase de *R. oryzae* também realizaram comparações de estabilidade à temperatura entre a enzima livre e imobilizada. No estudo de Karra-Chaabouni et al. (2008), foi descrita uma maior estabilidade para a ROL imobilizada em fibras de celulose do que para a lipase livre após incubação por 1 h nas temperaturas entre 25 e 60°C. Nas mesmas condições, houve perda de 60% da atividade pela lipase livre na temperatura de 40°C, sendo que para a lipase imobilizada a perda de atividade só ocorreu após ficar incubada em temperaturas maiores que 50°C durante o mesmo período. Ghamgui et al. (2007) relataram que ROL nativa imobilizada em CaCO_3 também apresentou maior estabilidade à temperatura do que a lipase livre, visto que houve perda total da atividade a partir da incubação durante 24 h em temperaturas maiores que 50°C para a lipase livre. Já a lipase imobilizada manteve entre 15% a 40% da atividade em temperaturas maiores que 50°C após o mesmo período de incubação.

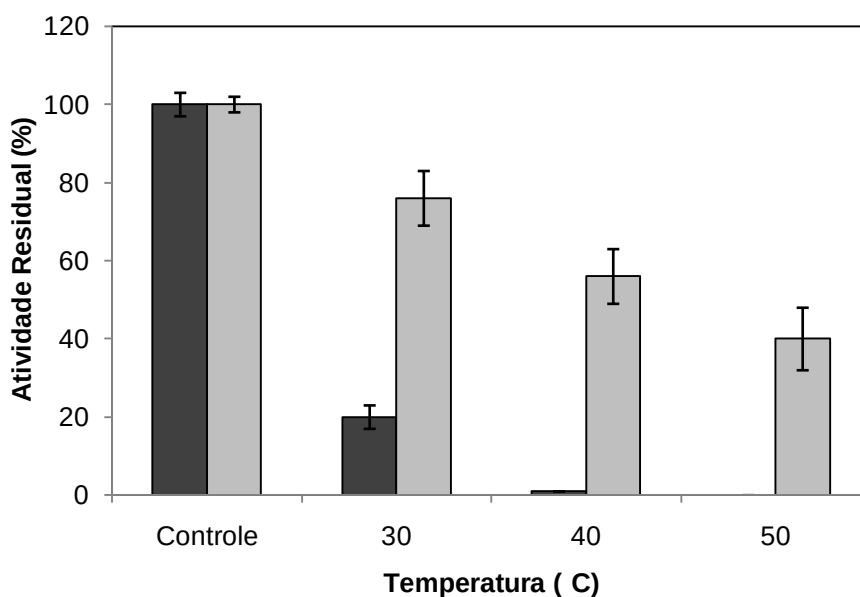


FIGURA 26 – ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* LIVRE E IMOBILIZADA À TEMPERATURA

Enzima (livre e imobilizada) incubada durante 24h, tampão Tris-HCl pH 8,0. (■) Livre, (□) Imobilizada. Controle: sem pré-incubação. Atividade residual de hidrólise da trioleína em meio orgânico - meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de trioleína, 2% de água destilada e 20 mg de enzima imobilizada. Condições da reação: 40°C e 200 rpm.

5.3.7 Estabilidade em Solventes Orgânicos

Antes de iniciar as reações de biocatálise em solventes orgânicos, foi necessário verificar também a estabilidade da enzima livre e imobilizada em solventes com polaridade diferentes, para assim dar início aos ensaios de reações de síntese em meios reacionais onde a enzima fosse estável. A atividade enzimática é fortemente afetada pela escolha do solvente orgânico, que pode provocar a desnaturação da enzima levando à perda da atividade do catalisador. Normalmente, para lipases, o valor de log P é o parâmetro utilizado para a escolha do solvente do meio reacional, pois quanto maior é este valor, maior é a atividade relatada para lipases (KRIEGER et al., 2004). Os solventes utilizados foram *n*-heptano (log P 4,0), *n*-hexano (log P 3,5) e etanol (log P -0,24). Os dois primeiros foram selecionados pela possibilidade de uso como cossolvente e o etanol, pela sua utilização como substrato da reação de esterificação. A temperatura também foi uma variável estudada neste experimento, pois, até então, a estabilidade à temperatura havia

ocorrido pela incubação da lipase imobilizada em tampão e não em solventes orgânicos. Os valores de temperatura utilizados foram 30°C, 40°C e 50°C, com 24 h de incubação.

A enzima livre não apresentou atividade de hidrólise após ser incubada nestes solventes e nestas condições, confirmando sua instabilidade em solventes orgânicos, que já havia sido mostrada no ensaio de atividade de hidrólise da trioleína em meio orgânico (item 5.3.4). A baixa estabilidade da lipase na forma livre pode ser explicada pelo fato de que esta se encontra menos rígida e fica mais exposta à interação com o solvente orgânico do que quando imobilizada (KLIBANOV, 1997).

A lipase na forma imobilizada está mais protegida de choques moleculares e portanto estará menos suscetível a desnaturação térmica e por este motivo foi estável nos solventes *n*-hexano e *n*-heptano, mantendo 76% e 77% da atividade residual, nas temperaturas de 30°C e 40°C, respectivamente (Figura 27). Também pode ser observado na Figura 27 que o *n*-heptano proporcionou maior estabilidade da enzima, mesmo após incubação em temperaturas mais altas, visto que na temperatura de 50°C, a enzima manteve 60% da atividade inicial. Isto deve-se ao fato que em *n*-heptano, uma série de interações polares entre solvente e proteína deixam de ocorrer e isso diminui a desnaturação térmica. A enzima, mesmo na forma imobilizada, foi muito menos estável em etanol (Figura 27) nas três temperaturas estudadas, sendo que, a 50°C, manteve menos que 10% da atividade inicial.

Alguns estudos mostram resultados semelhantes aos deste trabalho. Cadirci e Yasa (2010), por exemplo, incubaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* P21 por 2 h em vários solventes com valores de log P variando entre -0,76 e 4,0. A perda de atividade foi mais acentuada após a incubação em solventes mais polares, ou seja, aqueles com menor valor de log P. Este fato pode estar relacionado à retirada da camada de água essencial em torno da enzima provocada pela interação com os solventes solúveis em meio aquoso, ocorrendo uma possível perda da conformação catalítica da enzima (LIMA et al., 2004).

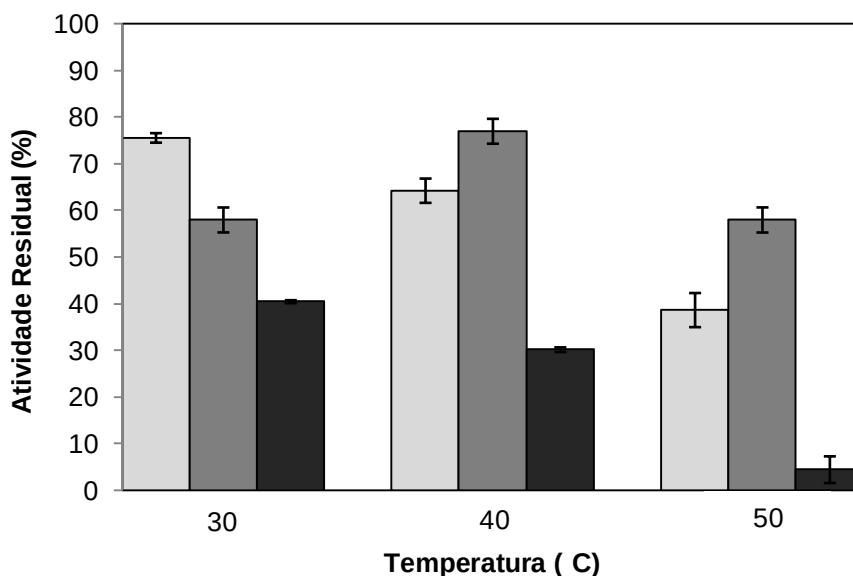


FIGURA 27 – ATIVIDADE RESIDUAL DE HIDRÓLISE DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* IMOBILIZADA APÓS INCUBAÇÃO EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Enzima imobilizada incubada durante 24 h em solventes. (□) *n*-hexano, (▒) *n*-heptano, (■) Etanol. Atividade residual de hidrólise da trioleína em meio orgânico - meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de trioleína, 2% de água destilada e 20 mg de enzima imobilizada. Condições da reação: 40°C e 200 rpm.

Wu et al. (2007) estudaram a estabilidade da lipase de *M. javanicus* por 2 h, tanto em solventes polares como apolares, e novamente foi encontrado que aqueles mais polares provocam a redução da atividade residual após a incubação. Outros autores também relatam perda de atividade enzimática após incubação em solventes polares, que tendem a desnaturar ou inibir a enzima (LIU et al., 2010; TALUKDER et al., 2010; KARRA-CHAABOUNI et al., 2008; ESSAMRI, DEYRIS e COMEAU, 1998).

A baixa atividade residual apresentada pela lipase estudada após incubação de 24 h em etanol ocorre provavelmente pelos efeitos de inibição competitiva, em que ocorre a ligação de moléculas do solvente ao sítio ativo da enzima, ou, pela desnaturação da enzima (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; YADAV e DEVI, 2004). Segundo Yu et al. (2007), a desnaturação pode ser explicada da seguinte forma: quando a reação é realizada na presença de solventes polares, esse tipo de solvente (hidrofílico) pode perturbar a estrutura funcional da enzima por retirar sua

camada de “água essencial”, cuja função é preservar a conformação molecular cataliticamente ativa da enzima. As moléculas de água apresentam maior afinidade de ligação com o solvente polar do que por ligar-se à enzima, diminuindo sua flexibilidade conformacional, uma vez que a água serve como uma espécie de lubrificante da estrutura da enzima (STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000). Além disso, a forte interação do solvente polar com a enzima pode resultar em uma variação da conformação do sítio ativo, inativando ou desnaturando a enzima (DOUKYU e OGINO, 2010).

5.4 BIOCATÁLISE UTILIZANDO A LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

5.4.1 Síntese do Oleato de Etila

Inicialmente, a síntese do oleato de etila foi realizada conforme previamente descrito no item 4.3.1, utilizando 70 U de atividade enzimática (hidrólise da trioleína em meio orgânico), equivalentes a 100 mg de enzima imobilizada ou 22 mg do extrato lipolítico em pó. Para a ROL livre não houve conversão em éster nas condições utilizadas (Figura 28). Este ensaio confirma os resultados anteriores, onde foi visto que a lipase livre não é ativa em solventes orgânicos (itens 6.3.3 e 6.3.6). Para a ROL imobilizada, houve 93% de conversão em éster em 60 min de reação, com uma produtividade, calculada em 60 min, de $1815 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ (Figura 28). A atividade de esterificação foi calculada nos primeiros 20 min de reação e o valor obtido foi de 294 U.g^{-1} de suporte. Foi realizado um controle negativo, com o suporte sem a enzima. Os resultados mostraram que não houve conversão em éster, confirmando a atividade catalítica desta lipase.

Resultados semelhantes ao deste trabalho também foram encontrados por Salah et al. (2007), que utilizaram a lipase de *R. oryzae* (cepa WPG) livre e imobilizada em Celite 545 (cristais de sílica) na síntese de acetato de butila, e verificaram uma conversão em éster de 25% com a lipase imobilizada e apenas 3% com a lipase livre. Melo, Pastore e Macedo (2005) também mostraram que tempo de

síntese do butirato de citronila (citronelo é um monoterpene acíclico natural) para a conversão de 100 % dos substratos, reduziu de 48 para 24 h após imobilização da lipase de *Rhizopus* sp. em Celite 545. Khare e Nakajima (2000) relataram que, quando utilizaram a lipase de *R. japonicus* na forma livre em reações de transesterificação, a enzima não apresentou nenhuma atividade. Considerando os resultados deste trabalho e alguns dados da literatura, percebe-se a importância da imobilização das lipases para serem utilizadas na síntese de ésteres.

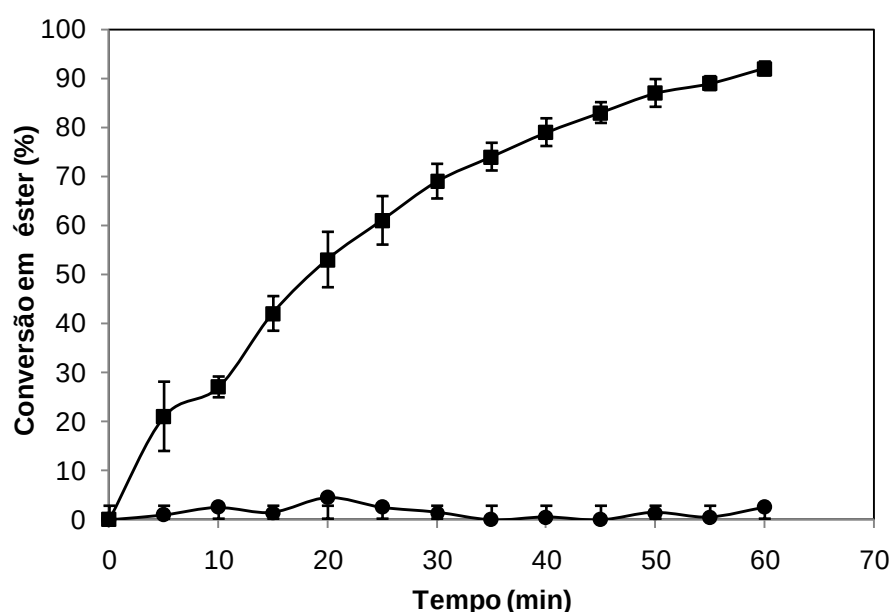


FIGURA 28 – CINÉTICA DA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

Reação de esterificação - Meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol.L⁻¹ de etanol, 70 U de catalisador (livre ou imobilizado). Condições: 40°C e 180 rpm. (●) Livre (■) Imobilizada.

A comparação dos resultados de esterificação entre os diferentes trabalhos encontrados na literatura em muitos casos é feita utilizando-se a conversão em éster (%) como parâmetro. Entretanto, devido às diferentes concentrações de substratos utilizadas, este parâmetro não espelha bem a eficiência da enzima. Em termos de síntese, com baixas concentrações de substrato, a enzima pode converter 100% do substrato rapidamente, enquanto levará mais tempo para a conversão quando as concentrações de substratos são maiores. Portanto, outro parâmetro, a

produtividade em éster, que leva em consideração o tempo de conversão por massa de biocatalisador, pode ser empregado para propiciar melhor comparação entre os resultados. Assim, comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os de outros citados na literatura, tanto em termos de produtividade, quanto em percentagem de conversão em éster, os resultados podem ser considerados altos. Abbas e Comeau (2003) utilizaram a lipase de *Mucor* sp. imobilizada em Amberlite IRC 50 (resina de troca iônica) na síntese do caproato de etila em ciclohexano e encontraram produtividades em torno de $71 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, com 98% de conversão em éster em 4 h de reação. Kanwar et al. (2008) verificaram uma produção de $32 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ na síntese do butirato de geranila (geraniol é monoterpênóide e um álcool), utilizando a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713 imobilizada em um polímero na forma de gel (AAc-co-HPMAcl-EGDMA), no tempo de reação de 15 h, com uma conversão de 100% em éster. O elevado tempo de reação que é descrito na maioria dos estudos torna os valores de produtividade inferiores aos encontrados neste trabalho.

5.4.1.1 Efeito da Quantidade de Lipase Imobilizada na Velocidade da Reação de Esterificação

A influência da quantidade de lipase imobilizada adicionada ao meio reacional foi estudada para os valores de 30, 60, 90, 100 e 120 mg da preparação, que correspondem a 21, 42, 63, 69,5 e 83 U de atividade de hidrólise da trioleína em meio orgânico, respectivamente. A velocidade da reação foi maior conforme houve o aumento da quantidade de lipase imobilizada adicionada ao meio (Figura 29). Quando 120 mg de lipase foram adicionados, obteve-se uma conversão de 99% em 60 min de reação. No entanto, não houve diferenças significativas entre as quantidades de 90 e 100 mg ($p > 0,05$) e 100 e 120 mg ($p > 0,05$) de lipase imobilizada, indicando que a quantidade de 90 mg é a ideal em reações com as concentrações de substratos utilizadas. Com quantidades de lipase imobilizada inferiores à esta (30 e 60 mg) houve uma menor conversão em éster ($p < 0,05$).

Os resultados da Figura 29 estão de acordo com os relatados na literatura para lipases de *Rhizopus*. Por exemplo, Salah et al. (2007) utilizaram a lipase de *R. oryzae* imobilizada em Celite 545, e avaliaram o efeito da quantidade de catalisador (100, 300, 500 e 700 U) na reação de síntese do acetato de butila. Os autores encontraram que, quanto maior a quantidade de catalisador, maior é a conversão em éster, porém, com 500 U a velocidade de reação é estabilizada. Ghamgui et al. (2007) também utilizaram diferentes quantidades (30, 60, 120 e 300 U) da lipase de *R. oryzae* imobilizada em CaCO_3 na reação de síntese do oleato de butila, e verificaram que o rendimento da reação é diretamente proporcional à quantidade de catalisador. Também não houve diferença significativa entre 60, 120 e 300 U. Alguns autores associam este comportamento de haver uma quantidade determinante de catalisador para cada reação à água formada durante a reação de esterificação, que possui uma função crucial nas reações em solventes orgânicos (ZAKS e KLIBANOV, 1998; VALIVETY et al., 1992). No entanto, quando já houve o máximo de conversão em éster, um alto conteúdo de água é liberado durante a reação, o que estimula a reação inversa, isto é, a hidrólise do éster formado.

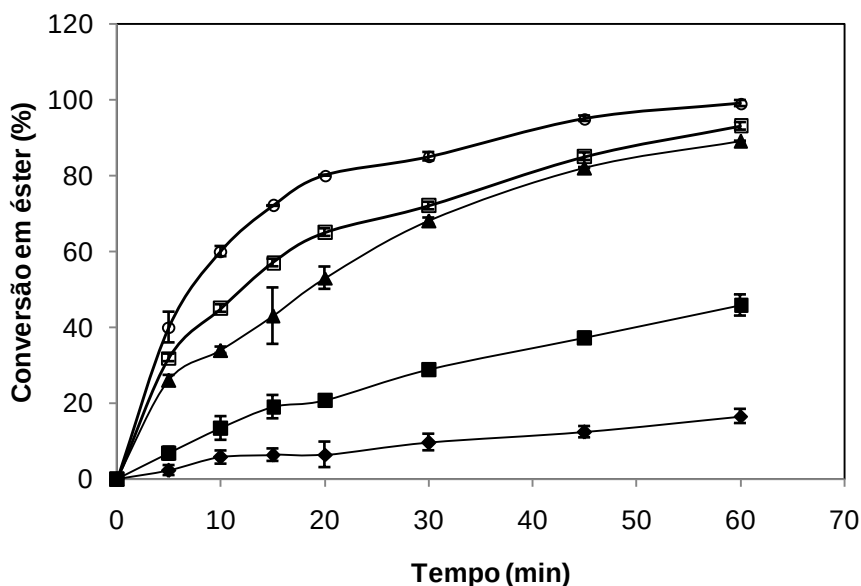


FIGURA 29 – INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE CATALISADOR NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

Condições: Quantidade de enzima imobilizada (♦) 30 mg, (■) 60 mg, (▲) 90 mg, (□) 100 mg, (○) 120 mg. Reação de esterificação – Meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol.L⁻¹ de etanol (RM 1:3), 70 U de catalisador (imobilizado). Condições: 40°C e 180 rpm.

5.4.1.2 Efeito da Razão Molar dos Substratos na Reação de Esterificação

O efeito da razão molar dos substratos na reação de esterificação também foi estudado, tendo em vista que maiores concentrações de um dos substratos são utilizadas para provocar o deslocamento do equilíbrio termodinâmico da reação na direção da síntese (SINGH e SINGH, 2010). Quando há quantidades estequiométricas dos reagentes, a reação tende a entrar em equilíbrio com baixas conversões do produto. Normalmente, o excesso de álcool é usado para deslocar o equilíbrio em função da formação do produto (AKOH et al., 2007; MA e HANNA, 1999).

As razões molares de ácido oleico:etanol estudadas foram 1:1; 1:3 e 1:9. Conforme apresentado na Figura 30, a razão molar que proporcionou a maior conversão em éster foi de 1:3 ácido:etanol (93% de conversão, 60 min). Este resultado está de acordo com o descrito por Singh e Singh (2010). Quando o etanol foi utilizado com uma concentração 9 x maior que a do ácido oleico, RM 1:9 (ácido:etanol), houve uma menor conversão em éster no mesmo intervalo de tempo (54%). Isto pode ser explicado pela ação prejudicial do etanol à enzima (YU et al., 2007; STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000). Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores em reações de esterificação utilizando a lipase de *R. oryzae* (TALUKDER et al., 2010; KARRA-CHAABOUNI et al., 2008; SALAH et al., 2007; GHAMGUI et al., 2007). Para a reação com RM 1:1 foi observado que ocorreu uma menor conversão em éster (73% em 60 min) que aquela em foi utilizado uma RM de 1:3.

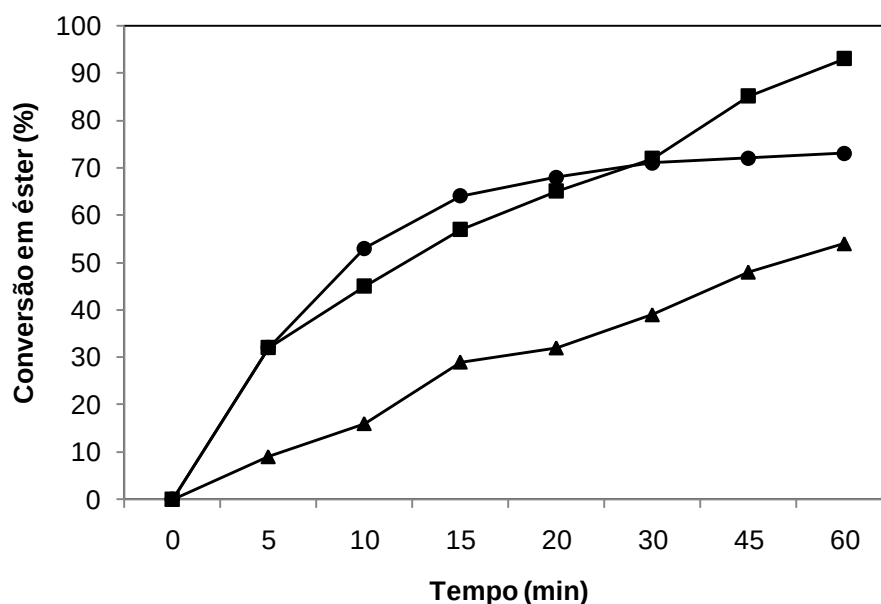


FIGURA 30 – INFLUÊNCIA DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* (●) 1:1, (■) 1:3, (▲) 1:9

Reação de esterificação - Meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol.L⁻¹ de etanol (RM 1:3), 70 U de catalisador (livre ou imobilizado). Condições: 40°C e 180 rpm.

5.4.1.3 Estabilidade da Enzima Imobilizada Frente a Elevadas Concentrações de Substratos

Entre os principais objetivos deste trabalho estava a utilização de altas concentrações de substratos na reação de esterificação, para assim promover o aumento da produtividade em éster e também a retirada do cossolvente do meio reacional. Sendo assim, foi necessária a verificação da estabilidade da enzima no meio reacional de esterificação, utilizando quantidades aumentadas dos substratos. Para tanto, a enzima imobilizada foi incubada em presença dos substratos (ácido oleico e etanol) e do cossolvente *n*-heptano a 40°C, com agitação de 180 rpm durante 30 min, simulando as condições de reações de esterificação (RM ácido oleico:etanol 1:1; 1:2; 2:1). A cada 10 min, amostras de lipase imobilizada eram retiradas, lavadas com *n*-heptano e colocadas em dessecador. A atividade hidrolítica residual era, em seguida, quantificada pelo método de hidrólise da trioleína em meio orgânico (item 4.2.7.2).

A maior estabilidade (cerca de 80% de atividade residual) foi obtida para o *n*-heptano, seguindo-se o ácido oleico (71%) e o meio com RM 2:1 ácido oleico:etanol (67%). Quando a ROL foi incubada em concentrações elevadas de etanol no meio (RM 1:2 ácido:etanol) ou somente etanol, verificou-se perda da atividade lipolítica de 48% e 77%, respectivamente, após 30 min (Figura 31).

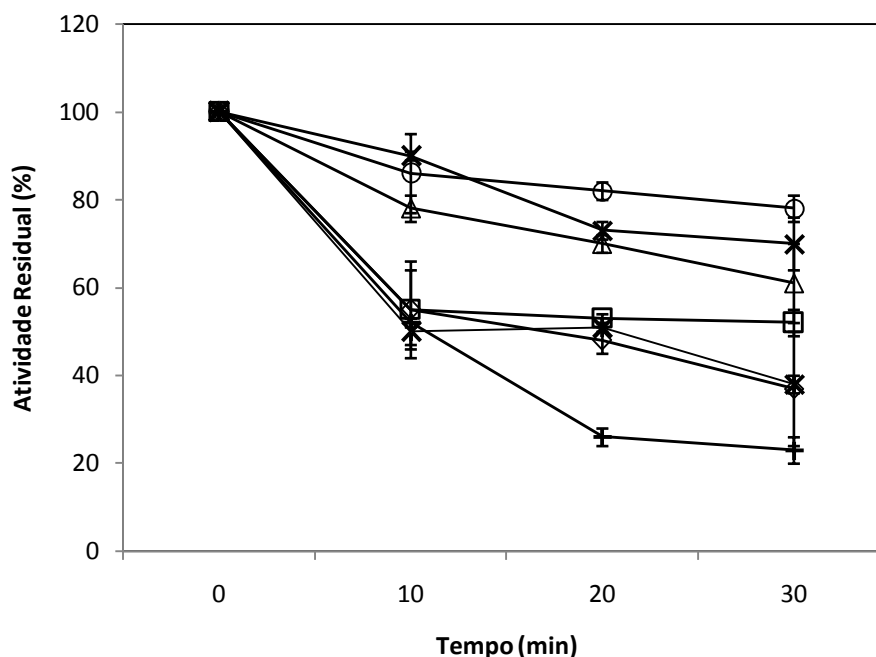


FIGURA 31 – ESTABILIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae* NO COSSOLVENTE E SUBSTRATOS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DIFERENTES TEMPOS

Incubação durante 10, 20 e 30 min em diferentes RM ácido oleico:etanol (◇) 1:1, (□) 1:2, (△) 2:1, (x) Ácido oleico + *n*-heptano; (*) etanol + *n*-heptano; (○) *n*-heptano; (+) etanol, sob agitação de 180 rpm. Atividade de hidrólise residual da trioleína em meio orgânico: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de trioleína, 2% de água destilada e 20 mg de enzima imobilizada. Condições da reação: 40°C e 200 rpm.

As cinéticas de perda de atividade (Figura 31) durante a incubação indicam que uma maior concentração de etanol presente no meio tende a diminuir a atividade residual da enzima, e, que esse efeito é intensificado pelo tempo de incubação. Estes resultados confirmam os obtidos anteriormente (Figuras 27, 30) e são de grande importância para as futuras reações em que se objetiva o aumento da concentração dos substratos, uma vez que a máxima produção em éster deve ocorrer antes do início da perda de atividade da enzima.

A lipase parcialmente purificada de *Acinetobacter* sp. foi incubada em diferentes concentrações de solventes (15 e 30 mmol.L⁻¹) durante 30 min, e apresentou perda de 10% e 30% da atividade de hidrólise quando incubada em etanol e metanol, respectivamente (AHMED, RAGHAVENDRA E MADAMWAR, 2010). Trubiano, Borio e Errazu (2007) utilizaram a lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 435) e verificaram que, conforme houve o aumento da razão molar ácido:etanol no meio reacional de esterificação (1:0,5; 1:1; 1:2,5; e 1:10), maior foi a perda da atividade da enzima. Conforme foi relatado anteriormente, os resultados encontrados neste trabalho, como em outros descritos na literatura, são atribuídos aos efeitos de inibição causada pelo álcool no catalisador ou à desnaturação da enzima pela remoção da água essencial para manutenção da sua estrutura cataliticamente ativa (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; YU et al., 2007).

Portanto, estes resultados referentes à estabilidade da lipase de *R. oryzae* frente à altas concentrações de etanol, sugerem que, para manutenção da atividade enzimática, baixas concentrações de etanol ou a adição de etanol em etapas, devem ser adotados para as reações de síntese.

5.4.1.4 Efeito do Aumento da Concentração de Substratos (5 x) na Velocidade da Reação de Esterificação

A concentração de substratos de 5 vezes mais em relação aos ensaios preliminares foi utilizada em um primeiro momento, sendo assim, a quantidade de biocatalisador no meio reacional também foi aumentada para 250 U (350 mg). Para isso, a reação de esterificação foi realizada, inicialmente, utilizando-se uma razão molar ácido oleico:etanol de 1:3, com a adição do etanol em uma só etapa, como nos experimentos anteriores. Conforme pode ser observado na Figura 32, a conversão em éster foi cerca de 16% e produtividade de 430 mg.h⁻¹.g_{cat}⁻¹ calculada nos primeiros 30 min de reação. Tendo em vista que a baixa conversão em éster e a reduzida produtividade poderiam estar relacionadas ao excesso de etanol utilizado, uma nova reação foi realizada utilizando-se uma razão molar ácido graxo:etanol de 1:1 com o etanol adicionado em etapa única no início da reação. Neste caso, a

conversão em éster foi de 75% (Figura 32) e a produtividade foi de $3103 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ nos primeiros 20 min de reação, quando ocorre o equilíbrio. Este resultado confirma o efeito deletério do etanol à enzima. Assim, nas próximas reações, este substrato foi adicionado em etapas.

Com o objetivo de aumentar a quantidade de álcool para deslocar o equilíbrio da reação, foi realizada uma reação com razão molar de 1:2 e adição do etanol em 2 etapas onde $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol foi adicionado no tempo zero, e a mesma quantidade foi adicionada em 30 min de reação. Desta vez, a conversão máxima ocorreu em 50 min e foi de 92% ($3537 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ em 20 min). Visto que nas reações com uma menor quantidade de substratos foi encontrado que uma razão molar ácido:etanol de 1:3 seria a ideal (Figura 30), realizou-se uma nova reação utilizando esta razão de substratos, mas com a adição do etanol em 3 etapas (0, 20 e 40 min). A conversão em éster teve um pequeno aumento (3%) em relação à reação em que foi utilizada uma razão molar de 1:2 (adição do etanol em 2 etapas), não havendo diferença significativa entre estas duas reações ($p > 0,05$). Portanto, para estas concentrações de substratos ($0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oléico e $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$) e com RM 1:2 já acontece a conversão máxima catalisada pela ROL (Figura 32).

Na Figura 32 também se observa que a velocidade da reação começa a diminuir a partir de 15 min para todas as condições estudadas e que, para as condições onde o etanol foi adicionado em etapas, a reação ainda progride até atingir o equilíbrio em cerca de 40 min, onde a conversão é máxima (cerca de 97%).

O comportamento de reações de esterificação em diferentes concentrações de substratos também foi verificado por Pires-Cabral et al. (2010). Após quantidades de 78 mmol.L^{-1} de ácido butílico e 105 mmol.L^{-1} de etanol serem utilizadas em uma reação de 30 dias em reator de leito fixo, a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em espuma de poliuretano manteve-se estável durante todo este período. No entanto, com o aumento da concentração para 350 mmol.L^{-1} de ácido butílico e 530 mmol.L^{-1} de etanol, a lipase, nas mesmas condições manteve-se estável somente até 120 h, sendo que, após este período, a reação entrou em equilíbrio, com 80% de conversão em éster. Os autores justificam este fato pelo efeito inibitório do etanol

que foi adicionado em grandes quantidades, que pode prejudicar a ação enzimática, mesmo imobilizada, pois pode penetrar e se acumular dentro da espuma.

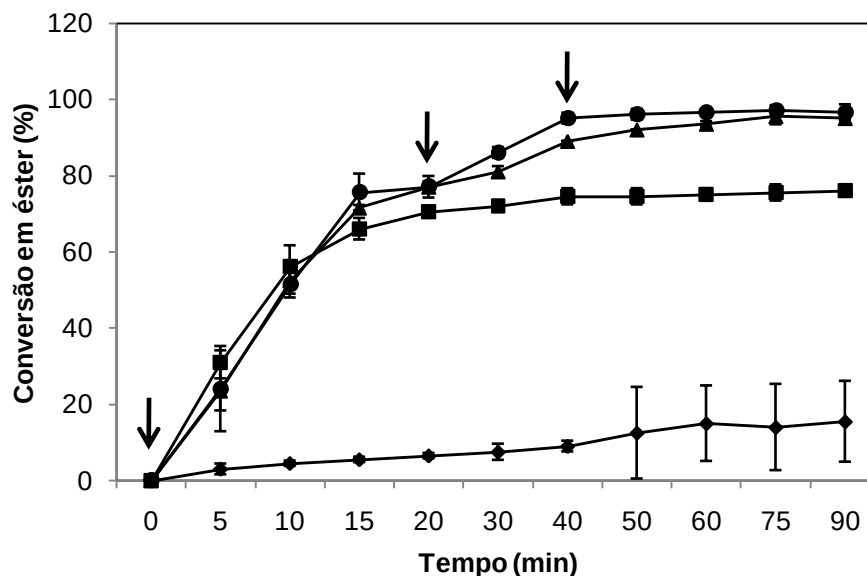


FIGURA 32 – CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA UTILIZANDO UMA CONCENTRAÇÃO 5x MAIOR DE SUBSTRATOS EM RELAÇÃO AOS ENSAIOS PRELIMINARES (FIGURAS 28, 29 E 30)

Reação de esterificação – Meio reacional: 250 U de catalisador, 0,35 mol.L⁻¹ de ácido oleico, 0,70 mol.L⁻¹ de etanol. Condições: 40°C e 180 rpm. (♦) 1:3 adição direta de etanol, (■) 1:1 adição direta de etanol, (▲) 1:2 adição de etanol em 2 etapas, (●) 1:3 adição de etanol em 3 etapas. As flechas indicam os tempos da adição do etanol quando em etapas.

5.4.1.5 Efeito do Aumento da Concentração de Substratos (10 x) na Velocidade da Reação de Esterificação

Após a obtenção de resultados satisfatórios das reações de síntese do oleato de etila em que a concentração dos substratos foi aumentada em 5 vezes, com adição do etanol em etapas, o aumento de 10 vezes a quantidade de substratos também foi estudado. Sendo assim, foram realizadas reações com 0,7 mol.L⁻¹ de ácido oleico e diferentes concentrações de etanol adicionado em etapas, obtendo-se reações com valores de RM ácido: etanol de 1:1, 1:1,5 e 1:3. A quantidade de catalisador no meio reacional também foi aumentada, de 250 U (350 mg) (utilizadas nas reações com 5 x mais substratos, item 5.4.1.4) para 300 U (450 mg).

Os resultados apresentados na Figura 33 mostram que houve uma grande diferença, tanto na conversão quanto na produtividade em éster, entre as reações em que o etanol foi adicionado em mais de uma etapa e aquela em que o etanol foi adicionado diretamente no início da reação. No ensaio em que o etanol foi adicionado de uma só vez, a conversão em éster foi de apenas 18% ($914 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$) em 30 min de reação. Nas reações em que foram adicionadas pequenas alíquotas de álcool em espaços curtos de tempo, ou seja, 26 e 52 μL (44 e 88 mmol.L^{-1}) a cada 5 min, a conversão em éster foi de 69 e 88% (90 min), correspondentes a produtividades de $1432 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ e $3879 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, respectivamente. No entanto, a velocidade inicial destas reações foi baixa, ficando em torno de 13 e 18 U.g^{-1} , respectivamente (Figura 33). Isto ocorre provavelmente, devido a quantidade reduzida de etanol no início da reação, sendo assim há uma dificuldade do deslocamento do equilíbrio para a formação dos produtos. Devido a isso, a quantidade de etanol a ser adicionada em cada etapa foi aumentada para 176 mmol.L^{-1} , assim, o deslocamento do equilíbrio da reação para a formação dos produtos foi otimizado. A porcentagem de conversão em éster para esta reação foi de 76% e a produtividade foi de $7200 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, em 25 min de reação. Visto que este método de adição de 2112 mmol.L^{-1} etanol em 12 etapas proporcionou uma maior velocidade inicial (408 U.g^{-1}) da reação, aumentando também a produtividade em éster, esta metodologia foi escolhida para os demais experimentos.

Na Figura 33 estão mostrados os resultados das reações em que foi utilizada a mesma concentração de etanol, no entanto, com métodos de adição do etanol diferentes. Na primeira reação, a adição do etanol ($0,7 \text{ mol.L}^{-1}$) ocorreu em 1 etapa e na segunda o etanol ($0,7 \text{ mol.L}^{-1}$) foi adicionado em 16 etapas, sendo que nesta houve uma melhora considerável da eficiência catalítica da enzima - cerca de 1,5 vezes em relação a produtividade e cerca de 74% de aumento na conversão em éster. Na terceira e quarta reações, quando foram adicionadas quantidades maiores de etanol (1,056 e 2,112 mol.L^{-1} , respectivamente), desta vez em 12 etapas, a produtividade aumentou cerca de 4 e 8 vezes, respectivamente, em relação à primeira, em que o etanol foi adicionado de 1 só vez. Sendo assim, este experimento comprova que a adição do etanol em etapas é um método válido para aumentar a eficiência catalítica da enzima.

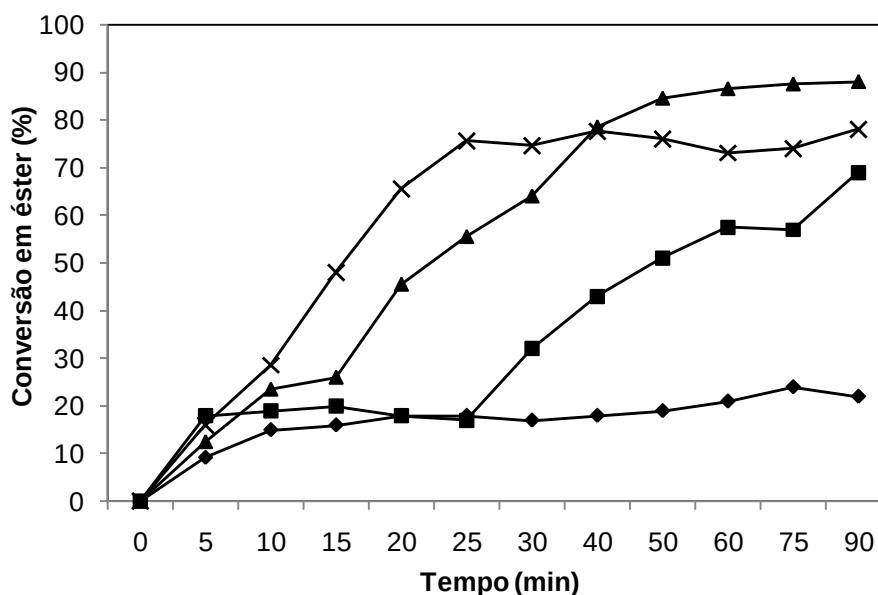


FIGURA 33 - INFLUÊNCIA DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS EM 10x EM RELAÇÃO AOS ENSAIOS PRELIMINARES (FIGURAS 28, 29 E 30) E DA ADIÇÃO DE ETANOL EM ETAPAS NA CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Reação de esterificação – Meio reacional: 300 U de catalisador, 0,7 mol.L⁻¹ de ácido oleico. Condições: 40°C e 180 rpm. A adição do etanol em etapas ocorreu a cada 5 min até 30 min e a cada 10 min até 75 min. (◆) 0,7 mol.L⁻¹ direta, (■) 0,7 mol.L⁻¹ em 16 etapas, (▲) 1,056 mol.L⁻¹ em 12 etapas, (x) 2,112 mol.L⁻¹ em 12 etapas.

Alguns autores já vêm descrevendo a metodologia de adição do etanol em etapas com o propósito de aumentar o rendimento em éster das reações de esterificação e transesterificação e minimizar os efeitos negativos deste solvente sobre o biocatalisador. Sun et al. (2010) utilizaram a lipase de *R. oryzae* (IFO 4697) como catalisador da metanólise para a produção de biodiesel, com a adição de metanol em 3 etapas. Os autores observaram um maior rendimento em éster (94%), assim como maior estabilidade da lipase, que pôde ser reutilizada por 10 vezes. Salum et al (2010), para o sólido fermentado com atividade lipolítica produzido por *Burkholderia cepacia*, demonstraram que, com a metodologia de adição de etanol em mais de uma etapa, o rendimento em éster pode aumentar em torno de 20%. Outros autores também apresentaram vantagens desta estratégia em suas reações (TALUKDER et al., 2010; NARANJO et al., 2010; LV et al., 2010), no entanto, a

maioria não testou a adição do etanol em mais de 3 ou 4 etapas, como foi o caso do presente trabalho.

5.4.1.6 Estudos de Inibição da Enzima pelo Etanol

Para identificar se realmente a lipase era inibida competitivamente pelo etanol durante a reação de esterificação, como proposto por Al-Zuhair, Lig e Jun (2007) e Yadav e Devi (2004), ou se a enzima perdia a atividade lipolítica irreversivelmente por desnaturação pelo etanol, a atividade de hidrólise residual da enzima foi determinada após reações de esterificação descritas anteriormente (Figura 33).

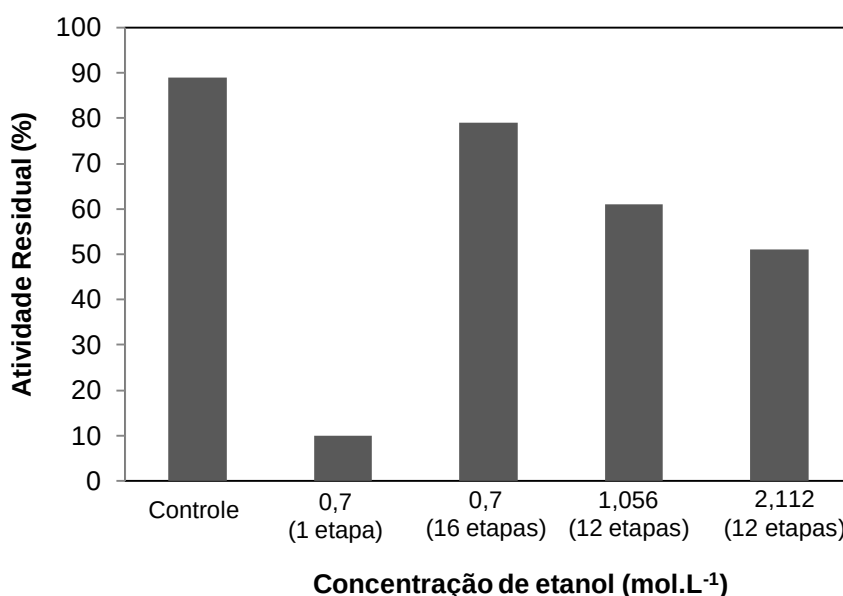


FIGURA 34 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE RESIDUAL DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* APÓS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO MOSTRADAS NA FIGURA 30, COM DIFERENTES ETAPAS DE ADIÇÃO DE ETANOL

Controle: sem pré-incubação. Atividade residual de hidrólise da trioleína em meio orgânico - meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de trioleína, 2% de água destilada e 20 mg de enzima imobilizada. Condições da reação: 40°C e 200 rpm.

Pode-se observar na Figura 34 que a perda de atividade da ROL foi diretamente proporcional ao volume de etanol adicionado em cada etapa, com maior perda da atividade com a adição do etanol diretamente no início da reação (90%).

Estes resultados mostram que, além da possível inibição da enzima por parte do etanol durante a reação de esterificação, ocorre a desnaturação da enzima e perda da atividade catalítica. Conforme descrito por Lima et al. (2004), acredita-se que solventes miscíveis em água, como é o caso do etanol, retiram a camada essencial da enzima levando ao desenovelamento da molécula com a exposição dos resíduos hidrofóbicos que ficam no seu interior. Segundo estes autores, esta desnaturação ocorre em um ritmo muito mais rápido do que em um sistema aquoso puro. Matassoli et al. (2009), utilizaram as lipases comerciais Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM na síntese do palmitato de etila e após o estudo de diferentes métodos de adição do etanol, verificaram que, com a adição do álcool em etapas, houve uma maior conversão em éster durante a reação. Os autores também relacionaram a menor conversão em éster quando da adição do etanol em 1 etapa no início da reação com a desativação da enzima provocada pelo excesso de álcool.

5.4.1.7 Efeito da Adição de Peneira Molecular

A presença de água no meio reacional gerada como produto da reação pode levar à reversão da reação de esterificação, e por isso, o teor de água no meio reacional pode ter grande influência nos rendimentos de síntese (SALIS et al., 2008). Em muitos experimentos do presente trabalho, a velocidade de reação diminuiu após 15 min, e entra em equilíbrio, dependendo das condições utilizadas no experimento, muito antes da conversão completa. Por exemplo, no caso das melhores condições (adição de $2,112 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol em 12 etapas, Figura 33), obteve-se no máximo 76% em éster. Uma das explicações para este resultado é o fato de a enzima ser desnaturada pelo etanol, como mostrado no item anterior. Entretanto, era importante também estudar o efeito da água gerada, na tentativa de maximizar o rendimento da reação. Para tanto, peneiras moleculares foram adicionadas no meio reacional que apresentou as melhores condições para a síntese de ésteres (adição de $2,112 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol em 12 etapas, Figura 33) logo no início da reação. Primeiramente, a peneira molecular foi ativada permanecendo em temperatura de 100°C durante 16 h, em seguida uma quantidade de 5 g ($0,46 \text{ g / g}$ de meio reacional) foram adicionados logo no início da reação.

Na Figura 35 pode-se observar que os dois perfis das reações, com e sem peneira molecular, foram praticamente idênticos (considerando-se as barras de erro), sendo que, com a utilização da peneira molecular, a produção em éster foi de 71% ($6748 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$) em 25 min de reação. Com este resultado, conclui-se que, não é o efeito da água que provoca o estabelecimento do equilíbrio da reação a partir de 25 min, e sim a desativação da enzima por efeito do etanol.

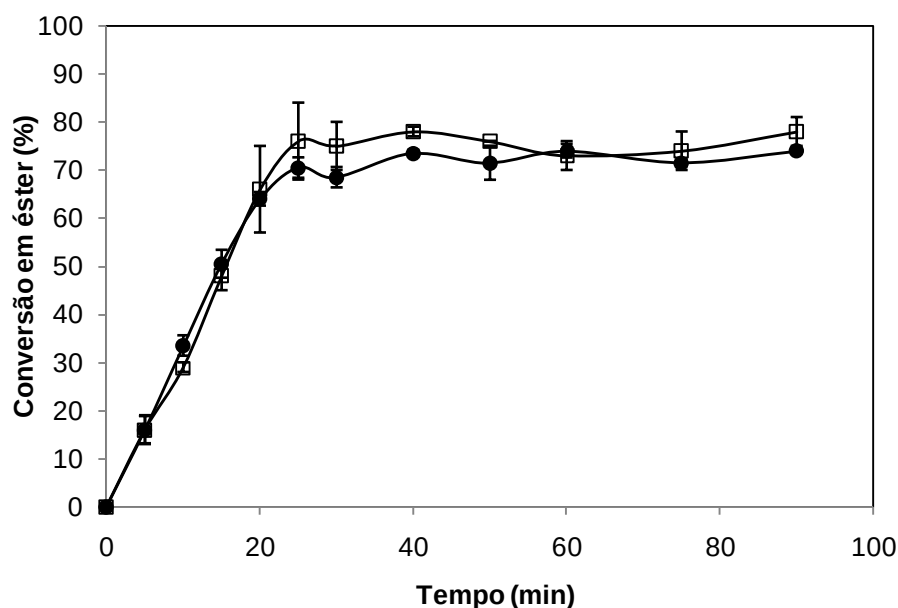


FIGURA 35 - INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE PENEIRA MOLECULAR NA CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Reação de esterificação – Meio reacional: 300 U de catalisador, $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oleico. Condições: 40°C e 180 rpm. (x) $2,112 \text{ mol.L}^{-1}$ em 12 etapas. (□) Sem peneira molecular (●) Com peneira molecular

Alguns autores que utilizaram peneira molecular no meio de reação de síntese de ésteres relataram efeitos controversos. Kanwar et al. (2008) utilizaram peneira molecular na síntese de butirato de geranila catalisada pela lipase de *Pseudomonas aeruginosa* e verificaram que 100 mg/mL de peneira molecular aumentou a conversão em éster em apenas 2% após 15 h de reação. Os autores também verificaram que com quantidades superiores ou inferiores a esta, o rendimento da reação era reduzido. Segundo Adnani et al. (2010), o efeito negativo na conversão por adição de peneira molecular em reações de esterificação pode estar relacionado à retirada da água imprescindível para a atividade enzimática. No entanto, em publicação anterior, Kanwar et al. (2008) verificaram o efeito da peneira

molecular na síntese de propionato de etila pela mesma lipase e verificaram que, com adição de 300 mg, o rendimento da reação aumentou em 35% em relação à reação sem a peneira molecular. Outros autores também demonstraram as vantagens da adição da peneira molecular em reações de esterificação (ADNANI et al., 2010; JIA et al., 2010; LAOSIRIPOJANA et al., 2010).

5.4.1.8 Reavaliação do Efeito da Quantidade de Catalisador no Meio Reacional

O estudo do efeito da adição de quantidades menores de biocatalisador no meio reacional é importante para redução do custo do processo. Sendo assim, foi realizada uma reação com a metade da quantidade de enzima utilizada anteriormente, ou seja, 150 U de biocatalisador, comparando-se com o controle, com 300 U no meio reacional, usada nos experimentos anteriores. Conforme pode ser observado na Figura 36, para a quantidade de enzima de 150 U, houve uma menor porcentagem de conversão em éster (65%) em relação à reação em que se utilizou 300 U de catalisador (76%). Entretanto, a redução da conversão não foi diretamente proporcional à redução da quantidade da enzima. A produtividade, que leva em conta a massa de catalisador utilizado, foi em torno de $800 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ a mais de éster em relação ao ensaio controle ($7200 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$), visto que a produtividade ficou em torno de $8454 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$. Raita, Champreda e Laosiripojana (2010) estudaram o efeito do aumento da quantidade de lipase (*Aspergillus* sp.) imobilizada em PCMC (microcristais) em 5, 10, 20 e 30% em relação ao meio reacional e verificaram que o aumento de 20 para 30% de biocatalisador não teve efeito na conversão em éster na reação de etanolise do óleo de palma. Chen, Du e Liu (2008) também não encontraram efeitos positivos com concentrações maiores de catalisador durante a síntese de biodiesel.

Mahapatra et al. (2009) justificam esta indiferença quanto a velocidade de reação com maiores quantidades de enzima devido a problemas difusionais e à dificuldade em manter a suspensão uniforme quando maiores massas de enzima são utilizadas nos meios reacionais.

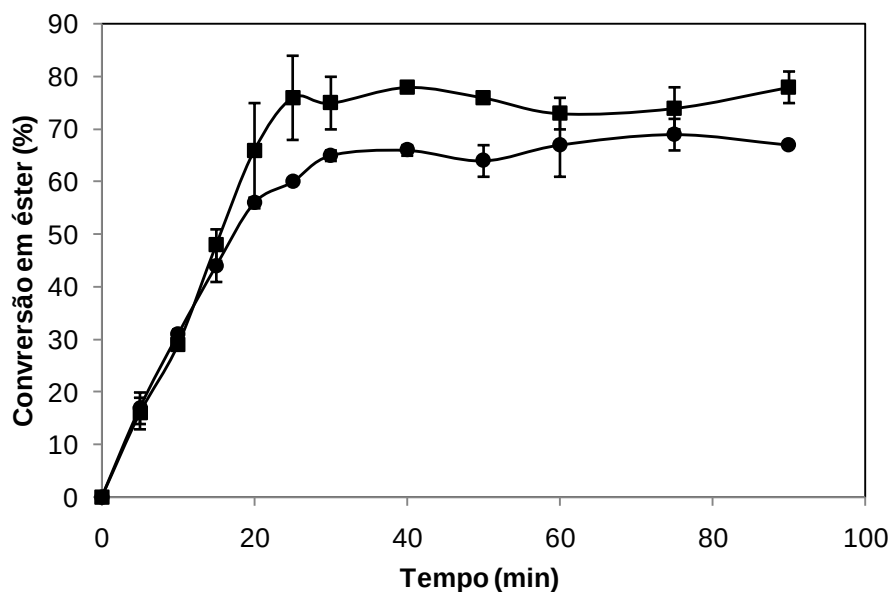


FIGURA 36 - REAVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE CATALISADOR (ROL RECOMBINANTE) NA CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Reação de esterificação – Meio reacional: $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oleico, $2,112 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol em 12 etapas. Condições: 40°C e 180 rpm. (■) 300 U (●) 150 U.

5.4.1.9 Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura na velocidade da reação de síntese do oleato de etila foi estudado na faixa de 25°C a 40°C . As condições reacionais utilizadas foram as otimizadas anteriormente (RM 1:3, $2,112 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol adicionados em 12 etapas, 150 U de catalisador), com a mais alta concentração de substrato (700 mM de ácido oleico e 2112 mM de etanol).

A Figura 37 mostra que não há diferença significativa na conversão em éster quando a reação foi realizada a 25°C ou 30°C , obtendo-se cerca de 79% de conversão em 25 min para ambos os casos. A produtividade alcançada para este ponto foi de $10163 \pm 341 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$. Entretanto, a elevação da temperatura para 40°C causa um significativo decréscimo da conversão (65%, 25 min). Provavelmente a estabilidade da lipase ROL aqui utilizada tem um importante papel nestes

resultados, pois, conforme mostra a Figura 27, a atividade residual da enzima em presença de etanol decresce com a temperatura.

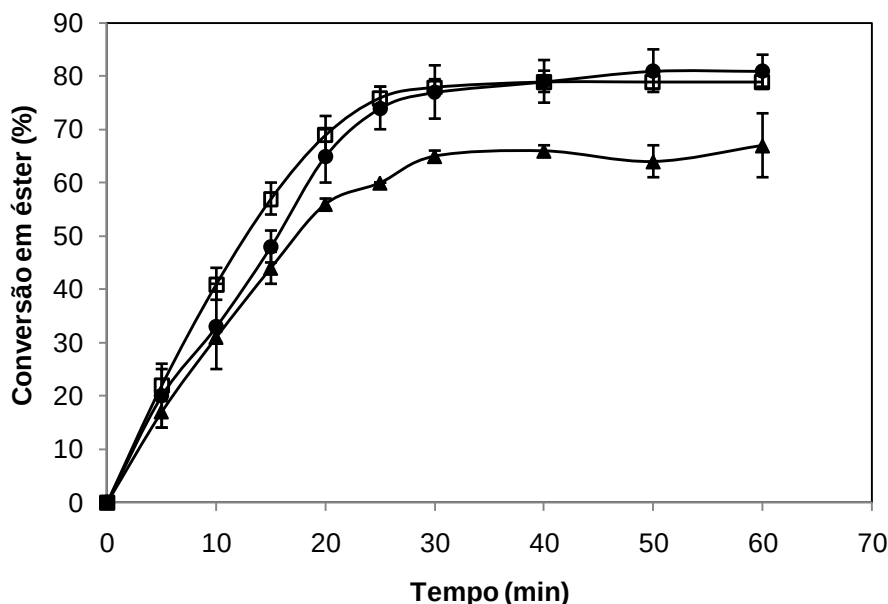


FIGURA 37 - EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

Reação de esterificação – Meio reacional: 150 U, 0,7 mol.L⁻¹ de ácido oleico, 2,112 mol.L⁻¹ de etanol em 12 etapas. Condições: 180 rpm. (♦) 25°C, (□) 30°C, (▲) 40°C.

Estes resultados confirmam os obtidos anteriormente (Figuras 33, 35 e 36), a reação entra em equilíbrio a partir de 25 min, sendo este efeito é atribuído parcialmente à desnaturação e à inibição competitiva da enzima pelo etanol. Nenhuma das tentativas deste trabalho (remoção da água, variação da temperatura e das concentrações do substrato) até este ponto logrou levar a reação à completude devido a este efeito. Alguns autores têm relatado que o *tert*-butanol como cossolvente em reações de esterificação e transesterificação, foi um excelente meio de reação tanto para a produção de biodiesel a partir de triglicerídeos utilizando células inteiras ou lipases imobilizadas de *Rhizopus oryzae*, provocando maior estabilidade do catalisador (LI et al, 2007; LI et al.; WANG et al, 2006). Raita, Champreda e Laosiripojana (2010), realizaram a metanólise do óleo de palma utilizando lipases e verificaram que a adição do *tert*-butanol à mistura de reação leva

ao aumento da atividade lipolítica e estabilidade operacional das lipases, resultando em um aumento do rendimento de conversão em éster. O pré-tratamento da lipase imobilizada desnaturada por metanol com *tert*-butanol também levou à regeneração da atividade da enzima (CHEN e WU, 2003). Em vista disso, foi estudado o efeito deste cossolvente como um agente protetor da enzima nas reações de esterificação, no entanto, o efeito protetor para o catalisador não foi observado neste trabalho, tendo sido obtidas baixas conversões (15%), mesmo após 3 h de reação (dados não apresentados).

Ozyilmaz e Gezer (2010) relataram que o equilíbrio da reação depende das propriedades termodinâmicas dos substratos. Estas propriedades dependem do comprimento de cadeia dos substratos, solvente utilizado, e principalmente da temperatura, que tem uma enorme influência sobre o estado físico dos substratos tais como ionização, solubilidade e viscosidade do meio, entre outros (OZYILMAZ, TUKEL e ALPTEKIN, 2005). Portanto, a temperatura pode influenciar no rendimento, conforme os substratos utilizados, e em geral, temperaturas entre 30°C e 55° C são relatadas. Conforme pode ser observado na Tabela 8, a maioria dos autores encontrou que temperaturas na faixa de 30 a 40°C foram as melhores para a maior conversão em éster em reações de esterificação. Por outro lado, alguns trabalhos relatam que temperaturas maiores proporcionaram maior conversão em éster, como é o caso de LIU et al. (2010), que, estudando a síntese do laurato de laurila, obtiveram 45°C, e Varma e Madras (2010), que relataram a faixa de 50-55°C para a síntese do propionato de isopropila.

Comparando-se os valores de produtividade encontrados neste trabalho ($10163 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$) com os descritos por autores que utilizaram lipases como biocatalisadores (Tabela 8), observa-se uma acentuada diferença. Os melhores resultados foram obtidos com lipases comerciais, mas mesmo assim, em termos de produtividade não foram encontrados trabalhos que descreveram melhor eficiência catalítica que a ROL recombinante utilizada neste trabalho. A maioria dos trabalhos relata altas conversões em éster, no entanto, geralmente utiliza reduzidas concentrações de substratos, o que facilita a conversão, no entanto as produtividades em éster são baixas. Os valores máximos encontrados foram descritos por Talukder et al. (2010) e Yadav e Dhoot (2009) (8833 e $6000 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$).

¹, respectivamente), para a lipase comercial de *Candida antarctica*, Novozyme 435, que geralmente apresenta alta eficiência catalítica.

Outra vantagem apresentada pela ROL utilizada neste trabalho é a velocidade com que catalisa a reação. Como pode ser observado ainda na Tabela 8, o tempo de reação descrito na maioria dos trabalhos para a máxima conversão em éster é de 1 a 36 h, sendo que no presente trabalho o tempo de reação foi de 25 min para a conversão de 79% em éster.

TABELA 8 - Estudos de síntese de ésteres por reação de esterificação catalisada por lipases

Lipase	Tipo de enzima / Suporte	Éster	Cossolvente	Temperatura (°C)	Adição álcool (etapas)	Conversão (%)	Tempo (h)	Produtividade (mg.h ⁻¹ .g _{cat} ⁻¹) *	Referência
Lipase porcina pancreática	Alginato de Cálcio	Acetado de isoamila	<i>n</i> -hexano	40	1	**nc	1	226	OZYLMAZ e GEZER (2010)
<i>Candida rugosa</i>	Poliuretano hidrofílico	Butirato de Etila	<i>n</i> -hexano	30	1	80	36	5	PIRES-CABRAL et al. (2010)
<i>Candida antarctica</i> Novozyme (435)	Resina Acrílica	Palmitato de metila	Iso-octano	40	2	100	3	8833	TALUKDER et al. (2010)
<i>Candida antarctica</i> Novozyme (435)	Resina Acrílica	Caproato de <i>n</i> -butila	<i>n</i> -hexano	30	1	97	1	5	SÁNCHEZ-OTERO et al. (2010)
<i>Rhizopus microsporus</i>	Bagaço de cana e semente de girassol	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano	30	1	>98	3	76	ZAGO (2010)
<i>Burkholderia cepacia</i> (LTEB 11)	Accurel EP-100	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano	37	1	100	3	67	SALUM et al. (2008)
<i>Candida antarctica</i> Novozyme (435)	Resina Acrílica	Laurato de cinamila	Tolueno	30	1	60	2	6000	YADAV e DHOOT (2009)
<i>Burkholderia cepacia</i> (LTEB 11)	Farelo de milho (sólido fermentado)	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano	37	1	94	18	9	FERNANDES et al. (2007)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Accurel MP-1000	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano	30	12	93	0,4	10163	Este trabalho

* Produtividade = massa de éster (mg) produzido em 1 h de reação, por 1 g de catalisador.

** Dados não citados pelo autor.

5.4.1.10 Validação dos Resultados de Síntese do Oleato de Etila por GC

Após estudar as melhores condições da reação de esterificação visando uma maior produtividade em éster, foi realizado um ensaio de validação do método de Lowry-Tinsley, pela análise das amostras da reação de esterificação por GC (item 4.4.4.1) e pelo método colorimétrico (item 4.4.3.1).

As condições do ensaio foram aquelas já otimizadas anteriormente (RM 1:3 – ácido:etanol; $2,112 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol adicionados em 12 etapas; temperatura de 30°C e 150 U). As reações foram realizadas em duplicata e acompanhadas durante 90 min, com alíquotas de $200 \mu\text{L}$ coletadas em intervalos de 10 min até 30 min e em seguida a cada 30 min até 90 min (Figura 38).

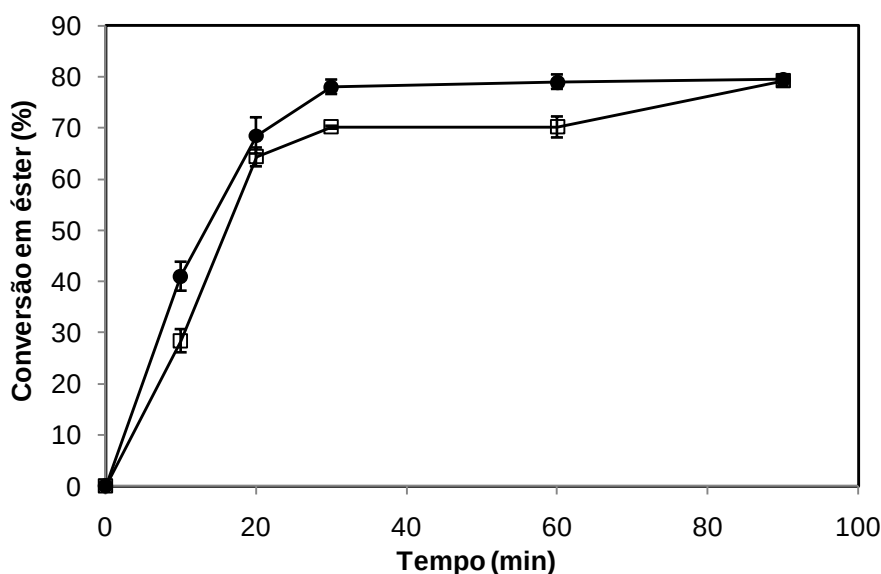


FIGURA 38 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÉSTERES PARA UMA MESMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM *N*-HEPTANO, CATALISADA PELA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

Reação de esterificação – Meio reacional: 150 U, $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oleico, $2,112 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol em 12 etapas. Condições: 40°C e 180 rpm. (●) Lowry-Tinsley (□) Cromatografia de fase gasosa.

Os resultados mostraram que a porcentagem de conversão em éster foi bastante próxima, comprovando a validade do método Lowry-Tinsley utilizado até

aqui. A reação analisada por CG apresentou menores valores de conversão no decorrer do tempo, entretanto a percentagem em éster no final da reação ($78,4\% \pm 0,4$ em 90 min) foi muito próxima daquela obtida pelo método de Lowry-Tinsley ($79\% \pm 1,4$ em 90 min). Isto pode ter ocorrido devido às perdas durante o processo de isolamento e purificação da amostra antes da injeção no CG.

5.4.1.11 Efeito da Presença do Cossolvente no Rendimento da Reação

Um aspecto importante estudado foi a eliminação do cossolvente *n*-heptano do meio reacional. A realização de esterificação na ausência do cossolvente teve como objetivo verificar o comportamento da enzima e a possibilidade deste tipo de reação ser utilizada em experimentos futuros. Os ensaios foram realizados nas melhores condições encontradas a partir das Figuras 33, 36 e 37, ou seja, para o controle foram utilizados 1,98 g de ácido oleico ($0,7 \text{ mol.L}^{-1}$), 1,248 mL de etanol ($2,112 \text{ mol.L}^{-1}$) e 10 mL de *n*-heptano (68 mmol). Utilizando esta mesma quantidade de substratos (1, 248 mL e 1,98 g de ácido oleico) foi realizada uma reação com 37% de redução do cossolvente, ou seja, 5 mL de *n*-heptano, portanto as concentrações de ácido oleico e etanol foram $1,4 \text{ mol.L}^{-1}$ e $4,224 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente. Para as reações livre de solvente, novamente as mesmas quantidades de substratos foram adicionadas no meio reacional (1, 248 mL e 1,98 g de ácido oleico); assim as concentrações de ácido oleico e etanol utilizadas foram 7,8 mmol e 23,4 mmol, respectivamente. Resumindo, houve a remoção gradual do cossolvente, aumentando-se a concentração dos substratos e mantendo-se a RM ácido:etanol em 1:3.

Pode-se observar que as porcentagens máximas de esterificação (Figura 39) e produtividades (Figura 40) obtidas nas reações com redução do cossolvente foram menores que aquelas na presença de *n*-heptano.

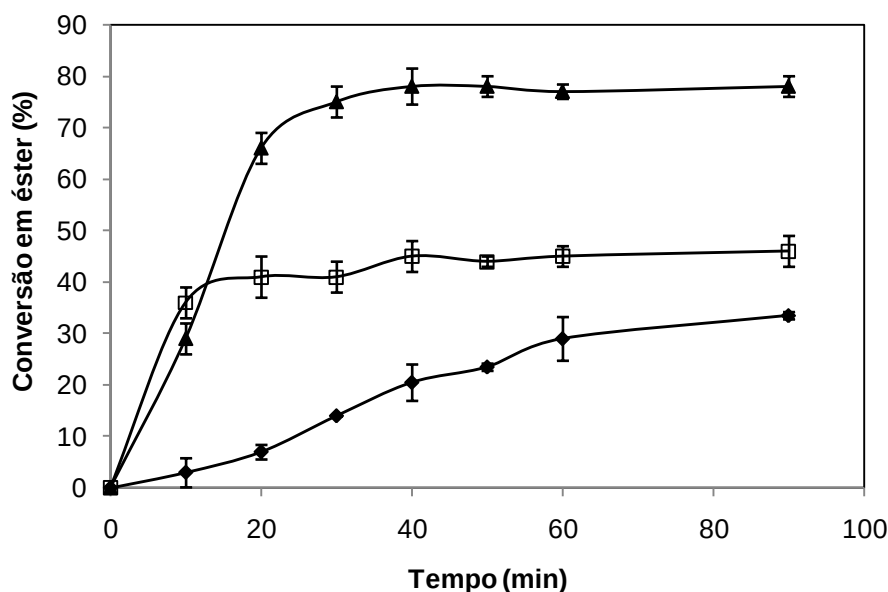


FIGURA 39 - INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE COSSOLVENTE NA CINÉTICA DE ESTERIFICAÇÃO DO OLEATO DE ETILA EM *N*-HEPTANO PELA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

Reação de esterificação – Condições: 150 U de catalisador, 40°C e 300 rpm. (▲) 74 % de *n*-heptano (0,7 mol.L⁻¹ de ácido oleico e 2,112 mol.L⁻¹ de etanol em etapas) (□) 37% *n*-heptano (1,4 mol.L⁻¹ de ácido oleico e 4,224 mol.L⁻¹ de etanol em etapas) (●) 0% *n*-heptano (7,8 mmol de ácido oleico e 23,8 mmol de etanol em etapas).

Na reação em que foi utilizado 37% de cossolvente (5 mL), o rendimento foi de 43% em 40 min de reação (5315 mg.h⁻¹.g_{cat}⁻¹), e naquela livre de solvente o rendimento chegou a 34% em 90 min (1435 mg.h⁻¹.g_{cat}⁻¹), sendo que na presença do cossolvente estes valores ficam em 79% de conversão em 30 min (10135 mg.h⁻¹.g_{cat}⁻¹). Novamente, a desnaturação da enzima pelo etanol pode ter sido o principal motivo da redução da conversão em éster nas reações com redução ou livres de cossolvente. Isto pode estar relacionado ao fato que o solvente polar (etanol), nestas condições, ter uma maior interação com a enzima, e alterar sua conformação nativa pela ruptura das ligações de hidrogênio (LIMA et al, 2004; SIMON et al, 1998). A elevada concentração de substratos também é responsável pela baixa estabilidade de lipases em meios livres de solventes, pois a baixa solubilidade do álcool em óleo ou nos ácidos graxos, leva à formação de duas fases, com conseqüente decréscimo no rendimento em éster (OGNJANOVIC, BEZBRADICA E KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009).

Estudos em meios livres de solventes exógenos têm mostrado que, com a adição do etanol em mais etapas, geralmente 3, o rendimento da reação é superior às reações em que o etanol é adicionado em uma única etapa (SHIMADA et al., 2002; WATANABE et al., 2001, 2002). No presente trabalho, a adição do etanol ocorreu em 12 etapas, e, mesmo assim, o rendimento em éster foi 44% menor que o obtido em presença do cossolvente.

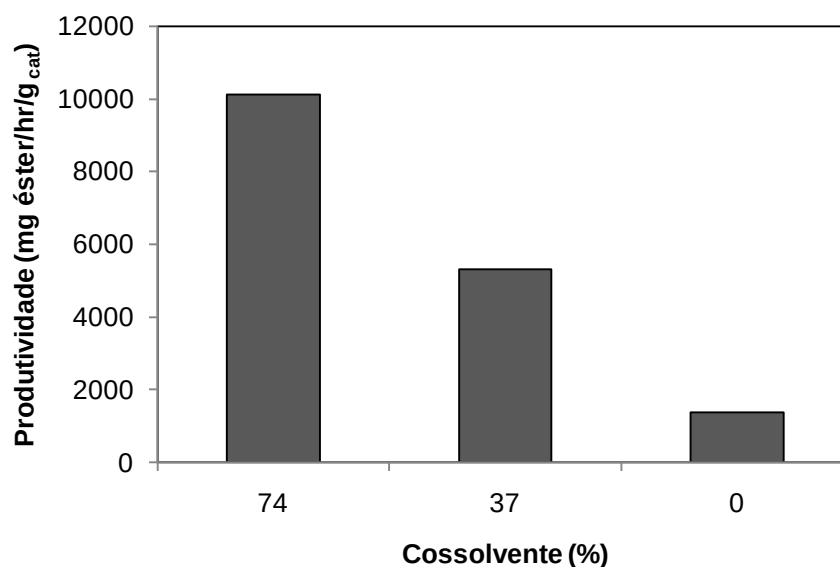


FIGURA 40 - INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE COSSOLVENTE NA PRODUTIVIDADE DO OLEATO DE ETILA EM *N*-HEPTANO PELA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae*

Dados de estudos recentes sobre a síntese de ésteres tanto por esterificação como por transesterificação em meios livres de solvente, empregando lipases de diversas origens e preparações, estão apresentados na Tabela 9. Nela se observa que, comparativamente, a lipase ROL imobilizada deste trabalho apresentou os maiores valores de produtividade. A maioria alcançou conversões altas, no entanto, pequenos valores de produtividade também foram observados, e isto é relacionado aos elevados tempos das reações. Este é o caso dos resultados reportados por Salum et al. (2010), Rivera et al. (2009), Salis et al. (2008) e Marchetti e Errazu (2008), em que foram obtidas altas conversões em éster, no entanto os tempos de reações descritos foram de 46 a 72 h. Consequentemente, as produtividades

alcançadas por esses trabalhos chegaram no máximo até $320 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, contra $1435 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ encontrada neste trabalho.

Já nos trabalhos de Chen, Du e Liu (2008), Qin et al. (2008) e Hernandez-Martín e Otero (2008), foram relatados tempos menores de reação (4 a 8 h), mas, ainda assim, as produtividades em éster não passaram de $500 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$. Assim sendo, observa-se que com a ROL recombinante imobilizada utilizada neste trabalho apresenta como grande vantagem a eficiência catalítica, pois catalisa reações livres de solvente em apenas 1 h com elevadas produtividades em éster. No entanto, a baixa estabilidade da enzima frente a altas quantidades de etanol no meio reacional faz com que a reação entre em equilíbrio com apenas 32% de conversão dos substratos.

Os resultados do presente trabalho mostram que a ROL recombinante apresentou maior estabilidade e, portanto maior eficiência em reações de esterificação na presença do cossolvente. Após os estudos sobre o aumento da concentração de substratos, adição do etanol em etapas, quantidade de catalisador no meio reacional e temperatura na reação de esterificação, encontrou-se as melhores condições para a síntese do oleato de etila que são: 1) concentração de substratos de $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido oléico e $2,112 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol, com uma razão molar de substratos de 1:3; 2) Adição do etanol em 12 etapas; 3) 150 U (0,23 g) de atividade enzimática adicionadas no meio reacional, em torno de 10% da quantidade de ácido oléico utilizada; 4) temperatura de 30°C . Nestas condições, houve 80% de conversão em éster em 30 min de reação, com uma produtividade de $10165 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, valor não encontrado em nenhum outro estudo sobre a síntese de ésteres catalisada por lipases em meio orgânico.

TABELA 9- Estudos de síntese de ésteres em meios livres de solventes catalisada por lipases

Lipase	Tipo de enzima / suporte	Éster	Temperatura (°C)	Adição álcool (etapas)	Conversão (%)	Tempo (h)	Produtividade (mg.h ⁻¹ .g _{cat} ⁻¹)*	Referência
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Bagaço de cana e farinha de girassol (sólido fermentado)	Óleo de Soja/ Etanol	50	3	95	46	145	SALUM et al. (2010)
<i>Candida Antarctica</i> (N435)	Suporte Hidrofóbico	Gordura animal/ Etanol	45	1	80	48	200	RIVERA, VILLANUEVA e SANDOVAL (2009)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Accurel® MP1004	Óleo de soja Metanol	30	1	96	49	320	SALIS et al. (2008)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzima livre	Oleato de metila	45	1	80	4	** nc	CHEN et al. (2008)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Células inteiras liofilizadas	Oleato de metila	30	1	>96	8	500	QIN et al. (2008)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Resina acrílica	Óleo de soja Etanol	25	3	84	7	140	HERNANDEZ-MARTÍN e OTERO (2008)
Lipozyme CALB (Novozyme)	Enzima livre	Oleato de Etila	55	1	95	72	* nc	MARCHETTI e ERRAZU (2008)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Accurel MP-1000	Oleato de etila	30	12	32	1	1435	Este trabalho

* Produtividade = massa de éster (mg) produzido em 1 h de reação, por 1 g de catalisador.

** Dados não citados pelo autor.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, que envolveu a caracterização de uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae*, nas suas formas livre e imobilizada e sua aplicação na síntese do éster oleato de etila, permitiram as seguintes conclusões:

(I) Caracterização da Enzima Livre

- A ROL apresentou maior atividade de hidrólise em meio aquoso contra os substratos naturais tricaprilina, trioleína e tributirina do que contra lipídio sintético *p*NPP e mostrou maior preferência pelos triglicerídeos tricaprilina e trioleína;
- Os valores de pH e temperatura para a atividade máxima de ROL foram 8,25 e 35°C, respectivamente; a enzima apresentou estabilidade em uma faixa de pH entre 7,0 e 8,5, mas é pouco estável quando incubada por 24 h nas temperaturas de 20 a 50°C
- A enzima livre não mostrou atividade nem estabilidade nos solventes orgânicos hidrofóbicos (*n*-hexano e *n*-heptano) e hidrofílicos (etanol) estudados neste trabalho.

(II) Caracterização da Enzima Imobilizada

- O tempo ideal de imobilização da enzima no suporte hidrofóbico Accurel MP-1000 foi de 24 h e a quantidade de proteína oferecida para imobilização ideal foi de 15 mg.g⁻¹ de suporte. Nestas condições, a eficiência de imobilização foi de 96% e a lipase imobilizada apresentou a maior atividade de hidrólise em meio orgânico (220 ± 42 U. g⁻¹ de suporte, método do *p*NPP);
- A lipase ROL imobilizada apresentou maior estabilidade tanto à temperatura quanto a solventes orgânicos em relação à forma livre, sendo mais estável em

n-heptano na temperatura de 40°C, onde houve retenção de 77% da atividade após incubação por 24 h;

(III) Síntese do Oleato de Etila com a Enzima Imobilizada

- Foi possível utilizar a lipase imobilizada na síntese do éster oleato de etila por esterificação em meio orgânico em presença do cossolvente *n*-heptano. Em ensaios preliminares, obtiveram-se conversões de 93% em éster e produtividade de $1815 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$.
- Quando se estudou a quantidade de catalisador na reação de esterificação, verificou-se que não houve diferença na taxa de conversão em éster entre as quantidades de 90, 100 e 120 mg de enzima imobilizada. Quanto ao efeito da razão molar ácido:álcool, a conversão em éster foi maior (93%) para a razão molar (ácido:álcool) de 1:3.
- O aumento da concentração de substratos e a adição do etanol em etapas proporcionou o aumento da produtividade em éster para $3537 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ (5 x mais substratos) e $7200 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$ (10 x mais substratos), 4 vezes mais em relação à produtividade encontrada nos ensaios preliminares.
- Após reavaliar a quantidade de catalisador e a temperatura ideais para a reação de esterificação, houve uma considerável melhora tanto em termos de rendimento em éster (79%) como na produtividade, que ficou em torno de $10163 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_{\text{cat}}^{-1}$, o equivalente a 5,5 vezes mais do que nos ensaios preliminares;
- A reação de esterificação do oleato de etila foi catalisada pela ROL mesmo quando houve a redução ou eliminação do cossolvente *n*-heptano do meio reacional, mas com conversões e produtividades menores.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a eficiência catalítica da lipase de *Rhizopus oryzae* recombinante no processo de síntese de ésteres, abrindo perspectivas de utilização desta enzima em processos biocatalíticos. Portanto, sugerem-se como estudos futuros:

- Estudos que objetivem o aumento da estabilidade da ROL recombinante imobilizada em Accurel ou em outros suportes, e que assim possibilitem sua reutilização em reações de síntese de ésteres.
- Utilização da lipase imobilizada em reator de leito fixo com o estudo dos seguintes parâmetros: a) custo do catalisador frente ao custo total do processo; b) estabilidade da enzima ao longo do processo frente ao etanol e à temperatura; c) estudo da concentração dos substratos com a retirada do cossolvente, a fim de permitir operar em concentrações não inibitórias.
- Produção de outros ésteres de interesse comercial como, por exemplo, ésteres de aromas, lipídios estruturados, antioxidantes oriundos da modificação do ácido ascórbico (vitamina C) ou de flavonóides, entre outros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 589-595, 2003.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. **Process Biochemistry**, v.39, p. 1347– 61, 2004.

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U.T.; BEDNARSKI, W. Synthesis of ascorbyl oleate by immobilized *Candida Antarctica* lipases. **Process Biochemistry**, v.40, n. 10, p. 3177-180, 2005.

ADNANI, A.; BASRI, M.; MALEK, E.A.; SALLEH, A.B.; RAHMAN, M.B.A.; CHAIBAKHSHA, N.; RAHMANB, R.N.Z.R.A. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of xylitol ester by Taguchi robust design method. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p.350–356, 2010.

AHMED, E.H; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3628–3634, 2010.

AKOH, C.C.; CHANG, S.W.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995–9005, 2007.

AL-DURI, B.; YONG, Y.P. Lipase immobilization: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/ hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p.207 – 215, 2000.

ALI, Y.; CHAHINIAN, H.; PETRY, S.; MULLER, G.; CARRIÉRE, F.; VERGER, R.; ABDELKARIM, A. Might the kinetic behavior of hormone-sensitive lipase reflect the of the lid domain? **Biochemistry**, v. 43, n. 29, p. 9298-9306, 2004.

ALMEIDA, R.V.; ALQUÉRES, S.M.C.; LARENTIS, A.L.; RÖSSLE, S.C.; ALMEIDA, W.I.; CARDOSO, A.M.; BISCH, P.M.; ALVES, T.L.M.; MARTINS, O.B. Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1128–1136, 2006.

ALMEIDA, R.V.; BRANCO, R.V.; PEIXOTO, B.; LIMA, C.S.; ALQUERES, S.M.C.; MARTINS, O.B.; ANTUNES, O.A.C.; FREIRE, D.M.G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p.531–537, 2008.

ALOULO, A.; RODRIGUEZ, J.A.; PUCCINELLI, D.; MOUZ, N.; JULIEN LECLAIRE, J.; YVES LEBLOND, Y.; CARRIÈRE, F. Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, p. 228–237, 2007.

AL-ZUHAIR, S.; LIG, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v.42, p. 951-960, 2007.

ARAI, S.; NAKASHIMA, K.; TANINO, T.; OGINO, C.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 51-55, 2010.

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. **Journal of Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 161-172, 2000.

BARON, A.M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Curitiba, 2008. 154 p. Tese (Doutorado em Química)–Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORI, 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. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p. 25–32, 2005.

BASRI, M.; AMPON, K.; WAN YUNUS, W.M.Z.; RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B. Immobilization of hydrophobic lipase derivation on to organic polymer beads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 59, p.37, 1994.

BEER, H.D.; MC CARTHY, J.E.G.; BORNSCHEUER, U.T.; SCHMID, R.D. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. **Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression**, v. 1399, p. 173-180, 1998.

BEER, H.D; WOHLFAHRT, G.; SCHMID, R.D.; MCCARTHY, J.E.G. The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a pro-sequence. **Biochemical Journal**, v. 319, p. 351–59, 1996.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133 – 153, 2000.

BENAIGES, M.D.; ALARCÓN, M.; FUCIÑOS, P.; FERRER, P.; RUA, M.; VALERO, F. Recombinant *Candida rugosa* Lipase 2 from *Pichia pastoris*: Immobilization and use as biocatalyst in a stereoselective reaction. **Biotechnology Progress**, v. 26, n.5, 2010.

BORNSCHEUER, U.T. Alteration of lipase properties by protein engineering methods, **Oléagineux Corps Gras Lipides**, v.15, p.184-188, 2008.

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

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. **Analytical Biochemistry**, 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.

BUNTERNGSOOK, B.; KANOKRATANA, P.; THONGARAM, T.; TANAPONGPIPAT, S.; UENGWETWANIT, T.; RACHDAWONG, S.; VICHITSOONHONKUL, T.; EURWILAICHITR, L. Identification and characterization of lipolytic enzymes from a peat-swamp forest soil metagenome. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n.9, p. 1848-1854, 2010.

CADIRCI, B.H.; YASA, I. An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.64, p.155–161, 2010.

CEREGHINO, J.L, CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CHAHINIAN, H.; ALI, Y. B.; ABOUSALHAM, A.; PETRY, S.; MANDRICH, L.; MANCO, G.; CANAAN, S.; SARDA, L. Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. **Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression**, v. 1738, p. 29 – 36, 2005.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. Effect of several factors on soluble lipase-mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2097–2102, 2008.

CHEN J.W; WU, W.T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p.466–9, 2003.

CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, 163–171, 2010.

COS, O.; RESINA, D.; FERRER, P.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 86–94, 2005.

COTTRELL, M.T.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitinases from uncultured marine microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2553-2557, 1999.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C.M.; BALL, M.; FRANCOU, F.X.; NORMAND, P.; HELYNK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S.J.; OSBURNE, M.S.; AUGUST, P.R.; NALIN, R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J.L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 49-55, 2003.

CYGLER M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 3-27, 1997

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L. A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38. n.3, p.345-354, 2002.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G, SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DANDAVATE, V.; JINJALA, J.; KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3374–3381, 2009.

DANIEL, R.M.; DUNN, R.V.; FINNEY, J.C.; SIMITH, J.C. The role of dynamics in enzyme activity. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 69-92, 2003.

DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; WEI, Y.; GREEN, R.; KOBOS, P.M.; JOERGER, R.; HAAS, M.J.; DEREWENDA, Z.S. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil–water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus deleamar*. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n.3, p.524–34, 1984.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 241-246, 1999.

DIAZ, J. C. M. **Novos instrumentos para a biocatálise: rastreamento, purificação e caracterização de lipases fúngicas termofílicas**. Tese de doutorado apresentada à Universidade de la Mediterranee Aix-Marseille II. 190 p, 2005.

DI LORENZO, M.; HIDALGO, A.; HAAS, M.; BORNESHEUER, U.T. Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 123, n.12, p. 8974– 77, 2005.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D.Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v.100, p.1983–1991, 2009.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v.48, p.270–282, 2010.

DU, W., XU, Y., LIU, D., ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.30, p.125–9, 2004.

ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 97-103, 1998.

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

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 30, n. 1, p. 43-49, 2004.

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. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILHO, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Molecular modeling of the mechanism of ethyl fatty ester synthesis catalyzed by lipases. Effects of structural water and ethanol initial co-adsorption with the fatty acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.61, p. 289–295, 2009.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida Antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107-108, p. 23-30, 2005.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils: review. **Journal of the Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p.405-416, 2001.

GANDHI, N.N.; PATIL, N.S.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B.; WANGIKAR, P.P.; MUKESH, D. Lipase-catalyzed esterification. **Catalysis Reviews-Science and Engineering**, v.42, n.4, p.439-480, 2000.

GANGADHARA, P.; KUMAR, P. R.; PRAKASH, V. The stabilizing effects of polyols and sugars on Porcine Pancreatic Lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 86, n.8, p. 773–781, 2009.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO_3 : A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p. 34-41, 2007.

GIOELLI, L.A. Lipídios estruturados. In: CURI, R.; POMPEIA C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J., eds. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, p. 457-465, 2002.

GIRALDO, L. J. L.; LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; BAROUH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6-7, p. 721-726, 2007.

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 819, p. 3-16, 2005.

GONÇALVES, A.P.V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade**. Lisboa, 246f. Tese (Doutorado em biotecnologia). Universidade Técnica de Lisboa, 1999.

HA, S.H.; LAN, M.N.; LEE, S.H. HWANG, S.M.; KOO, Y.M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n.4, p.480–3, 2007.

HALLING, P.J. High affinity bindings of water by proteins is similar in air and in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1040, p.225, 1990.

HALLING, P. J. Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 513–516, 1984.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328–33, 2006.

HEMILA, H.; KOIVULA, T.T.; PALVA, I. Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: identification of a superfamily of esterases and lipases. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1210, p. 249– 253, 1994.

HENNE, A.; SCHIMITZ, R.A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p. 3113-3116, 2000.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277- 286, 2008.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUES, B.; CÓRDOVA, J.; BÁRZANA, E.; FAVELA-FLORES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by

thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, n.3-4, p. 136-42, 2009.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421-430, 2000.

HITA, E.; ROBLES, A.; CAMACHO, B.; GONZÁLEZ, P.A; ESTEBAN, L.; JIMÉNEZ, M.J.; MUÑO, M.M.; MOLINA, E. Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 257–264, 2009.

HITA, E.; ROBLES, A.; CAMACHO, B.; RAMÍREZ, A.; ESTEBAN, L.; JIMÉNEZ, M.J.; MUÑO, M.M.; GONZÁLEZ, P.A; MOLINA, E. Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. **Process Biochemistry**, v.42, p. 415–422, 2007.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M. et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p. 53–8, 2001.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**., v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n.9, p. 396-403, 1998.

JEGANNATHAN, K.R.; ABANG S.; PONCELET, D. et al. Production of biodiesel using immobilized lipase — a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, n.4 p.253–64, 2008.

JIA, C.; ZHAO, J.; FENG, B.; ZHANG, X.; XIA, W. A simple approach for the selective enzymatic synthesis of dilauroyl maltose in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 265–269, 2010.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v.40, p. 1525–1530, 2005.

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. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 12- 15, 2001.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T. et al. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n.6, p. 627–31, 1999.

KANWAR, S.S.; GEHLOT, S.; VERMA, M. L.; GUPTA, R.; KUMAR, Y.; CHAUHAN, G.S. Synthesis of geranyl butyrate with the poly(acrylic acid-co-hydroxy propyl methacrylate-cl-ethylene glycol dimethacrylate) hydrogel immobilized lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 2681–2692, 2008.

KARRA-CHAËBOUNI, M.; BOUAZIZ, I.; BOUFI, S.; REGO, A.M.B.R.; GARGOURI, Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.66, p.168-177, 2008.

KAWAKAMI, K.; TAKAHASHI, R.; SHAKERI, M.; SAKAI, S. Application of a lipase immobilized silica monolith bioreactor to the production of fatty acid methyl esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 194-97, 2009.

KHARE, S. K.; NAKAJIMA, M. Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on Celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil-factors influencing the choice of support for immobilized lipase. **Food Chemistry**, v. 68, n.2, p.153–157, 2000.

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. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 62–68, 2006.

KISS, M.A.; SEFANOVITS-BANYAI, E.; TOTH, A.; BOROSS, L. Extractive synthesis of ethyl-oleate using alginate gel co-entrapped yeast cells and lipase enzyme. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n.5, p. 460 - 464, 2004.

KLIBANOV, A.M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in Biotechnology**, v.15, n.3, p. 97-101, 1997.

KOHNO, M.; ENATSU, M.; YOSHIIZUMI, M.; KUGIMIYA, W. High-level expression of *Rhizopus niveus* lipase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme. **Protein Expression and Purification**, v.15, n.3, p.327–35, 1999.

KOHNO, M.; KUGIMIYA, W.; HASHIMOTO, Y.; MORITA, Y. Purification, characterization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n.6, p.1007–1012, 1994.

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

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 Technology and Biotechnology**, v.42, n.4, p. 279-286, 2004.

KUMAR, R.; MODAK, J.; MADRAS, G. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p.199-202, 2005.

LAANE, S.; BOEREN, K. VOS; C. VEEGER. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.30, p. 81–87, 1987.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAOSIRIPOJANA, N.; KIATKITTIPONG, W.; SUTTHISRIPOK, W.; ASSABUMRUNGRAT, S. Synthesis of methyl esters from relevant palm products in near-critical methanol with modified-zirconia catalysts. **Bioresource Technology**, v.101, p. 8416–8423, 2010.

LEE, K. T.; AKOH, C.C. Characterization of enzymatically syntetized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenóic e caprylic acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 75, n.4, p. 495-499, 1998.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Rhizopus oryzae* whole-cell-catalyzed biodiesel production from oleic acid in *tert*-butanol medium. **Energy e Fuels**, v. 22, p.155–158, 2008.

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 58–62, 2006.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; DE FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a

wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 31, n. 1-3, p. 53-61, 2004.

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. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65–71, 2004.

LIN CEREGHINO, J.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p.45–66, 2000.

LIU, Y.; ZHANG ,X.; TANC, H.; YAN, Y.; HAMEED, B.H. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. **Process Biochemistry**, v.45, p. 1176–1180, 2010.

LÓPEZ, E.; DEIVE, F.J.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, M.A. Lipolytic enzyme production by immobilized *Rhizopus oryzae*. **Chemical Engineering and Technology**, v.31, n.11, p. 1555–60, 2008.

LÓPEZ, N.; PERNAS, M.A.; PASTRANA, L.M.; SANCHEZ, A.; VALERO, F.; RUA, MARIA L. Reactivity of pure *candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 65, 2004.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

LU, J.; CHEN, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 56, p.122–5, 2009.

LV, D.; DU, W.; ZHANG, G.; LIU, D. Mechanism study on NS81006-mediated methanolysis of triglyceride in oil/water biphasic system for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v.45, p.446–450, 2010.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70:1–15, 1999.

MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B., HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast** v. 22, p. 249–270, 2005.

MACRAE, A.R. Lipase – catalyzed interesterificação of oils and fats. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 60, p. 243-246, 1983.

MAHAPATRA, P.; KUMARIA, A.; GARLAPATI, V.K.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p.57–63, 2009.

MALCATA, F.X.; HILL, C.G.; AMUNDSON, C.H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part II. Uniresponse kinetic studies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 984-1001, 1992.

MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F. Comparison of different heterogeneous catalysts and different alcohols for the esterification reaction of oleic acid. **Fuel**, v. 87, p. 3477-80, 2008.

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.11, p. 1300–1311, 2007.

MATASSOLI, A.L.F.; CORRÊA, I.N.S.; MÁRCIO F. PORTILHO, M.F.; CLÁUDIA O. VELOSO, C.O.; LANGONE, M.A.P. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, p.347–355, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and

selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40 p. 1451–1463, 2007.

MATORI, M.; ASAHARA, T.; OTA, Y. Positional specificity of microbial lipases, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, p. 397-398, 1991.

MELO, L. L.M.M.; PASTORE, G.M.; MACEDO, G. A. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3181–3185, 2005.

MINNIG, S.; DANNERT-SCHIMIDT, C.; SCHIMID, R.D. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 147-156, 1998.

MINNING, S.; SERRANO, A.; FERRER, P.; SOLA, C.; SCHIMD, R.D.; VALERO, F. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p.59–70, 2001.

NAKASHIMA, T., FUKUDA, H., KYOTANI, S., AND MORIKAWA, H. Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, p. 441-48, 1988.

NARANJO, J.C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V.S.; MORENO-PIRAJÁN, J.C. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66 p. 166–171, 2010.

NINI, L.; SARDA, L.; COMEAU, L.C.; BOITARD, E.; DUBÉS, J.P.; CHAHINIAN, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. **Biochimica et Biophysica 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 Technology**, v. 96, p.769–777, 2005.

ODA, M.; KAIEDA, M.; HAMA, S.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 45-51, 2005.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v.100, p. 5146–5154, 2009.

OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Positional specificities of four kinds of microbial lipases. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 655-60, 1976.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Process Biochemistry**, v.45, p. 1176–1180, 2010.

OZYILMAZ, G.; TUKEL, S.; ALPTEKIN, O. Activity and storage stability of immobilized glucose oxidase onto magnesium silicate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.35, n. 4-6, p.154-160, 2005.

PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 42-51, 1995.

PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, n. 3-5, p.187-204, 2000.

PAQUES, F.W.; PIO, T.F.; CARVALHO, P.O.; MACEDO, G.A. Characterization of the lipase from *Carica papaya* residues. **Brazilian journal of food technology**, v. 11, n. 1, p. 20-27, 2008.

PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptano by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.417-422, 1996.

PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M.M.R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 246–252, 2010.

QIN, H.; YAN, X; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, 41-46, 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. **Applied Clay Science**., v.29, n.2, p.111-116, 2005.

RAITA, M.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in *tert*-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 45, 829–834, 2010.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v.99, p. 3975–3981, 2008.

REES, H.; GRANT, S.; JONES, B.; GRANT, W.; HEAPHY, S. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, v.7, p. 415-421, 2003.

REETZ, M. T.; JAEGER, K.E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 3-14, 1998.

RESINA, D.; SERRANO, A.; VALERO, F.; FERRER, P. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase em *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 109, p.103-113, 2004.

REYES-DUARTE, D.; LÓPES-CORTÉS, N.; FERRER, M.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A. Parameters affecting productivity in the lipase catalyzed synthesis of sucrose palmitato. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.23, n.1, p.19-27, 2005.

RHEE, J.K.; AHN, D.G.; KIM, Y.G.; OH., J.W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormonesensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 817-25, 2005.

RIVERA, I.; VILLANUEVA, G.; SANDOVAL, G. Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 5, p. 470-476, 2009.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p.648–53, 2007.

RÜKOLD, S.; GROBECKER, K. H.; ISENGARD, H. D. The effects of drying on biological matrices and the consequences for reference materials. **Food Control**, v. 12, p. 401- 407, 2001.

SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with

hydrophobic groups. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1388, n. 2–10, p. 337– 348, 1998.

SALAH, B.A.; FENFRI, K.; GARGOURY, Y. The enzyme of *Rhizopus oryzae* production, purification and biochemical characteristics. **Revue Francaise Des Corps GRAS**, v.41, n. 5-6, p. 133-137, 1994.

SALAH, R. B.; GARGOURI, A.; VERGER R.; GARGOURI, Y.; HAFEDH MEJDOUB, H. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p.1375–84, 2009.

SALAH, R. B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience en Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-72, 2007.

SALAH, R.B.; MOSBAH, H.; FENDRI, A.; GARGOURI, A.; GARGOURI, Y.; MEJDOUB, H. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, p. 241–248, 2006.

SALAH, B., A.; SAYARI A.; VERGER, R.; GARGOURI, Y. Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique. **Biochimie**, v. 83, p. 463-469, 2001.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilized lipases on macroporus polypropylene toward biodiesel synthesis, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 19-26, 2008.

SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilized lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 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. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n.3, p.197 - 203, 2008.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE P.; BAREA B.; YAMAMOTO C. I.; CÔCCO L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-54, 2010.

SÁNCHEZ-OTERO, M.G.; QUINTANA-CASTRO, R.; MORA-GONZÁLEZ, P.C.; MARQUEZ-MOLINA, O.; VAERIO-ALFARO, G.; OLIART-ROS, R. Enzymatic reactions and synthesis of *n*-butyl caproate: esterification, transesterification and aminolysis using a recombinant lipase from *Geobacillus thermoleovorans* CCR11. **Environmental Technology**, v. 31, n.10, p. 1101–06, 2010.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; SHEBA, W.D. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.

SAYARI, A.; FRIKHA, F.; MILED, N.; MTIBAA, H.; BEN-ALI, Y.; VERGER, R.; GARGOURI, Y. N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. **FEBS Letters**, v. 579, n. 5, p. 976-982, 2005.

SCHEIB, H.; PLEISS, J.; STADLER, P.; KOVAC, A.; POTTHOFF, A.P.; HAALCK, L., SPENER, F.; PALTAUF, F.; SCHMID, R.D. Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triacylglycerols. **Protein Engineering**, v. 11, n.8, p.675–682, 1998.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199-210, 1998.

SELMİ, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F.; THOMAS, D. Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: Lipase regioespecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. **Biotechnology Techniques**, v.11, n. 8, p. 543-47, 1997.

SHAKERI, M.; KAWAKAMI, K. Enhancement of *Rhizopus oryzae* lipase activity immobilized on alkyl-functionalized spherical mesocellular foam: Influence of alkyl chain length. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, p. 115-120, 2009.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 7, p. 789- 793, 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.

SILVA, V.C.F.; CONTESINI, F.J.; CARVALHO, P.O. Enantioselective behavior of lipases from *Aspergillus niger* immobilized in different supports. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 949–954, 2009.

SIMON, L. M.; LÁSZLÓ, K.; VÉRTESI, A.; BAGI, K.; SZAJÁNI, B. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.4, n 1-2, p. 41-45, 1998.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200–216, 2010.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F., F.; ZANIN, G., M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-9, p. 745-57, 1999.

SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; BLANKENSHIP, D.T; TSAY, J.; SMITH, P.L; WIERSCHKE; SUBRAMANIAM, A.; BIRKENBERGER, L. A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, p. 55-62, 1997.

STRAATHOF, A. J. J.; ADLERCREUTZ, P. **Applied biocatalysis**. 2^a ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 295-316, 2000.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aureginosa*. **The Journal of Bacteriology**, v.168, p.1070-1074, 1986.

SUN, T.; DU, W.; LIU, D.; DAI, L. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1192–1195, 2010.

SURRIBAS, A.; STAHN, R.; MONTESINOS, J.L.; ENFORS, S.O.; VALERO, F.; JAHIC, M. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. **The Journal of Bacteriology**, v.130, p.291–99, 2007.

TALUKDER, M.M.R.; WU, J.C.; FEN, N.M.; MELISSA, Y.L.S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 207–212, 2010.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 628-34, 2010.

THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n.48, p. 40074-40083, 2005.

TIRAWONGSAROJ, P.; SRIPRANG, R.; HARNPICHARNCHAI, P.; THONGARAM, T.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. **The Journal of Bacteriology**, v. 133, p. 42-49, 2008.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of Arabic gum on interfacial lipases binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36-43, 2001.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 716–722, 2007.

TSUJITA, T.; SHIRAI, K.; SAITO, Y.; H. OKUDA, H. Isozymes: Structures, Function and Use in Biology and Medicine, **Wiley-Liss**, New York, pp. 915– 933, 1990.

UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S. Cocoa butter equivalent through enzymatic interesterification of palmoil midfraction. **Process Biochemistry**, v 36, p. 933–9, 2001.

VALERO, F. Universidade Autônoma de Barcelona (Espanha). **Comunicação pessoal**. 2009.

VALERO, F. Universidade Autônoma de Barcelona (Espanha). **Comunicação pessoal**. 2010.

VALIVETY, R.H.; HALLING, P.J.; PEILOW, A.D.; MACRAE, A.R. Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. **European Journal of Biochemistry**, v. 222, p.461-466, 1994.

VARMA, M.N.; MADRAS, G. Effect of chain length of alcohol on the lipase-catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.2342–2354, 2010.

VILLENEUVE, P.; MUDERRHWA, J.M.; GRAILLE, J., HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p. 113-148, 2000.

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.109, n.13, p. 6436-41, 2005.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 2, p. 373- 383, 2004.

YADAV, G.D.; DHOOT, S.B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 34-39, 2009.

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. **Microsporous Mesoporous Materials**, v.86, n.1-3, p. 215-222, 2005.

YIGITOGLU, M.; TEMOÇIN, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p.130–135, 2010.

YU, D.; WANG, Z.; ZHAO, L.; CHENG, Y.; CAO, S. Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas* sp. Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, p. 64–69, 2007.

WANG, L.; DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAÍ, N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 29–32, 2006.

WATANABE, Y.; SHIMADA, A., SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed reactor. **J Journal of the American Oil Chemists Society**, v.78, p.703–707, 2001.

WATANABE, Y., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.17, p.151–15, 2002.

WELSH, F.W.; WILLIAM, R.E.; DAWSON, K.H. Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor esters. **Journal of Food Science**, v. 55, p.1679–1682, 1990.

WINKLER, U.K. E STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **The Journal of Bacteriology**, v. 3, p. 663-670, 1979.

WU, J.C.; LEE, S.S.; MAHMOOD, M.M.B.; CHOW, Y.; TALUKDER, M.M.R.; CHOI, W.J. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45 p. 108–112, 2007.

ZAGO, E. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 2010. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química)– Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

ZAKS, A.; KLIBANOV, M.A. The effect of water on enzyme action in organic media. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 263, n. 17, n. 15, p. 8017-8021,1998.