

MARIA LUIZA MACHADO FERNANDES

**HIDRÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS E SÍNTESE  
DE ÉSTER DE ÁCIDO GRAXO EM SISTEMA  
DE MICELAS REVERSAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Química,  
Curso de Pós-Graduação em Química - Área de  
Concentração em Química Orgânica, Setor de  
Ciências Exatas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nadia Krieger  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2002

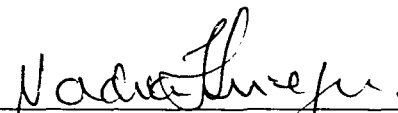
TERMO DE APROVAÇÃO

**HIDRÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS E SÍNTESE DE ÉSTER DE ÁCIDO GRAXO  
EM SISTEMA DE MICELAS REVERSAS**


por

**MARIA LUIZA MACHADO FERNANDES**

Dissertação aprovada como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,  
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:   
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Krieger  
Dept<sup>o</sup> de Química – UFPR

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Nascimento  
Dept<sup>o</sup> de Química - UFSC

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Lacava Lordello  
Dept<sup>o</sup> de Química – UFPR

Curitiba, 15 de abril de 2002.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Nadia Krieger, por sua orientação, amizade, confiança e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Luiz Pereira Ramos, do Departamento de Química da UFPR, por sua Co-orientação neste trabalho.

Ao professor Patrício Peralta Zamora, do Departamento de Química da UFPR e ao professor David Mitchell, do Departamento de Bioquímica da UFPR, por suas colaborações.

Aos meus amigos de laboratório, Valéria, Alessandra, Farah Diba, Fernanda, Marcelo, Leonardo, pela amizade, paciência e força que muito me ajudaram.

Aos colegas da Pós-Graduação do Departamento de Química, especialmente a Danyella, Maria Cristina e Viviane, pelo apoio e amizade.

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

A CAPES e a Fundação Araucária, pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A Novozyme, pelo fornecimento da enzima.

A todos os meus familiares, pelo carinho e apoio, e especialmente aos meus pais, que tanto contribuíram com a minha formação.

Ao Ricardo, pelo carinho e por me ajudar e me compreender nos momentos difíceis.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>SUMÁRIO</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIações</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>2.1. LIPASES-ASPECTOS GERAIS</b> .....	4
2.1.1. Introdução e Definição .....	4
2.1.2. Aspectos Estruturais das Lipases: a Estrutura $\alpha/\beta$ , a Triade Catalítica e a "Tampa Hidrofóbica" .....	6
2.1.3. O Mecanismo catalítico .....	8
2.1.4. Características Cinéticas e Físico-Químicas das Lipases Fúngicas .....	9
2.1.5. Especificidade .....	10
2.1.6. Lipases de <i>Thermomyces (Humicola) lanuginosa</i> .....	13
2.1.7. Métodos para a Determinação da Atividade Lipolítica .....	14
2.1.8. Aplicações das Lipases .....	16
2.1.8.1. Lipases como Hidrolases .....	18
2.1.8.2. Lipases como sintetases .....	21
<b>2.2. CATÁLISE ENZIMÁTICA EM SOLVENTES ORGÂNICOS</b> .....	24
2.2.1. Escolha do solvente orgânico .....	24
2.2.2. Sistemas reacionais com solvente orgânico .....	26
2.2.3. Sistema de micelas reversas .....	28
2.2.3.1. Surfactantes .....	28
2.2.3.2. Definição .....	31
2.2.4. Biocatalisadores em Micelas Reversas .....	32
2.2.5. Solubilização de Biomoléculas em Micelas Reversas .....	34
2.2.5.1. Técnicas .....	34
2.2.5.2. Mecanismo Molecular de Encapsulamento de Proteínas .....	36
<b>2.3. ENZIMOLOGIA MICELAR</b> .....	37
2.3.1. $W_o$ versus $a_w$ .....	37
2.3.2. Efeito do pH .....	39
2.3.3. Efeito da Temperatura e Estabilidade Térmica de Lipases em Meio Micelar .....	40
2.3.4. Efeito da concentração do substrato .....	40

<b>3. OBJETIVOS</b> .....	43
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
4.1. INTRODUÇÃO .....	45
4.2. REAGENTES .....	45
4.3. ENZIMA.....	45
4.4. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA LIPASE DE <i>Thermomyces lanuginosa</i> EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE.....	46
4.4.1. Efeito do Parâmetro $W_o$ .....	46
4.4.2. Efeito da Concentração de Proteína.....	47
4.4.3. Efeito do pH da Fase Aquosa.....	47
4.4.4. Efeito da Concentração dos Substratos .....	47
4.4.5. Efeito da Temperatura.....	48
4.4.6. Estabilidade à Temperatura .....	48
4.5. ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES .....	48
4.5.1. Estudos Prévios.....	48
4.5.2. Estudo da Síntese do Laurato de Etila por Delineamento Fatorial .....	49
4.5.3. Cinética da Reação de Biossíntese do Laurato de Etila.....	51
4.5.3.1. Biossíntese e purificação do éster .....	51
4.5.3.2. Determinação da perda de produto durante o processo de purificação da amostra.....	52
4.6. SÍNTESE QUÍMICA DO PADRÃO LAURATO DE ETILA.....	52
4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	53
4.7.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	53
4.7.2. Espectroscopia no Infravermelho .....	53
4.8. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	53
4.8.1. Determinação de Proteínas.....	54
4.8.2. Determinação da Atividade Lipolítica .....	55
4.8.2.1. Dosagem de atividade em meio aquoso .....	55
4.8.2.2. Dosagem de atividade em sistema micelar .....	57

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA: ATIVIDADE EM MEIO AQUOSO E SISTEMA MICELAR.....	59
5.2. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA LIPASE DE <i>Thermomyces lanuginosa</i> EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE.....	60
5.2.1. Efeito do Parâmetro $W_o$ .....	60
5.2.2. Efeito da Concentração da Proteína.....	62
5.2.3. Efeito do pH da Fase Aquosa.....	63
5.2.4. Efeito da Concentração dos Substratos .....	65
5.2.5. Efeito da Temperatura e Estabilidade à Temperatura .....	67
5.3. ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES .....	69
5.3.2. Otimização das Condições de Síntese do Laurato de Etila .....	70
5.4. CINÉTICA DA REAÇÃO DE BIOSÍNTESE DO LAURATO DE ETILA.....	77
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	79
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	82
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.

**Figura 2.** Representação da estrutura terciária tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase da lipase de *Rhizomucor miehei*. As estruturas do tipo  $\beta$  conformação são mostradas como setas e numeradas de 0 a 8, as estruturas em  $\alpha$ -hélice são representadas por cilindros e numeradas de 1 a 5.

**Figura 3.** Mecanismo catalítico de lipases.

**Figura 4.** Reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP).

**Figura 5.** Estrutura do ibuprofeno.

**Figura 6.** Representação esquemática da estrutura micelar: a) normal, em meio aquoso; b) invertida, em presença de solvente apolar; c) microemulsão água/óleo e d) microemulsão óleo/água.

**Figura 7.** Diagrama esquemático da molécula de AOT.

**Figura 8.** Modelos para microencapsulamento de proteínas (P) em micelas reversas: 1) modelo da camada de água, 2) modelo do ajuste-induzido; 3) modelo do tamanho fixado.

**Figura 9.** Curva de Calibração do Laurato de Etila por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

**Figura 10.** Efeito do parâmetro  $W_o$  na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT (100 mM) em isooctano. Condições do ensaio: concentração de trioleína: 166 mM; tampão fosfato 50 mM pH 7,0; 30 °C de temperatura; [enzima] = 77,04  $\mu\text{g/mL}$  de solução micelar.

**Figura 11.** Efeito da concentração da enzima na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT (100 mM) em isooctano. Condições do ensaio: concentração de trioleína: 166 mM; tampão fosfato 50 mM pH 7,0; e 30 °C de temperatura;  $W_o = 15$ .

**Figura 12.** Efeito do pH sobre a atividade lipolítica da lipase de *Thermomyces lanuginosa*. Condições do ensaio: Concentração de trioleína: 166 mM, temperatura de 30 °C; [enzima] = 38,5  $\mu\text{g/mL}$  de solução micelar; tampões 50 mM: (-■-) acetato (4,0, 5,0); (-●-) fosfato (5,5, 6,0, 7,0, 8,0); (-▲-) Tris-HCl (8,0, 9,0) e (-▼-) glicina (10,0).

**Figura 13.** (A) Efeito da concentração da trioleína e (B) efeito da concentração da tributirina na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT (100 mM) em isooctano. Condições do ensaio: temperatura de 30 °C; tampão fosfato 50 mM pH 8,0; [enzima] = 38,5 µg/mL da solução micelar e  $W_o = 15$ .

**Figura 14.** (A) Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT (100 mM) em isooctano e (B) representação de Arrhenius para a determinação da energia de ativação  $E_a$ . Condições do ensaio: Concentração de trioleína: 150 mM; tampão fosfato 50 mM pH 8,0; [enzima] = 38,5 µg/mL de solução micelar e  $W_o = 15$ .

**Figura 15.** Efeito da temperatura entre 30 e 60 °C sobre a atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT em 100 mM de Isooctano. Condições do ensaio: Concentração de trioleína: 150 mM; temperaturas 30 °C (-■-), 37 °C (-●-), 50 °C (-▲-), 60 °C (-▼-); tampão fosfato 50 mM pH 8,0; [enzima] = 38,5 µg/mL de solução micelar e  $W_o$  de 15.

**Figura 16.** Reação de formação do éster laurato de etila.

**Figura 17.** Efeito da temperatura entre 30 °C (nível -) e 45 °C (nível +) e pH entre 5,0 (nível -) e 10,0 (nível +) no rendimento da síntese do laurato de etila catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosa* em sistema de micelas reversas AOT/Isooctano. Condições: 60 minutos de reação.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características físico-químicas de algumas lipases microbianas.
- Tabela 2.** Especificidade de algumas lipases de microrganismos frente a diferentes substratos.
- Tabela 3.** Aplicações das lipases.
- Tabela 4.** Lipases microbianas disponíveis comercialmente.
- Tabela 5.** Solventes orgânicos e seus respectivos log P.
- Tabela 6.** Classificação dos surfactantes de acordo com o seu caráter iônico.
- Tabela 7.** Reações catalisadas por lipases microencapsuladas em diferentes sistemas de micelas reversas.
- Tabela 8a.** Níveis máximos e mínimos escolhidos para o planejamento fatorial  $2^{4+1}$ .
- Tabela 8b.** Valores dos efeitos das variáveis do planejamento fatorial  $2^{4+1}$
- Tabela 9.** Atividade da lipase de *T. lanuginosa* (Lipolase 100 L) frente a diferentes substratos e métodos.
- Tabela 10.** Resultados experimentais do delineamento fatorial aplicado no estudo da síntese do éster laurato de etila.
- Tabela 11.** Valores dos efeitos das variáveis importantes do planejamento fatorial sobre a atividade da *T. lanuginosa* e o rendimento do laurato de etila.
- Tabela 12.** Resultados experimentais do segundo delineamento fatorial aplicado no estudo da síntese do éster laurato de etila, mantendo-se constantes  $W_0$  10 e razão molar 5,0.
- Tabela 13.** Valores dos efeitos das variáveis importantes do planejamento fatorial sobre a atividade da *T. lanuginosa* e o rendimento do laurato de etila.
- Tabela 14.** Reações de síntese catalisadas por lipases em diferentes sistemas.
- Tabela 15.** Rendimentos da cinética de reação de síntese do laurato de etila com amostras analisadas pelo Método de Lowry-Tinsley e por CLAE.

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIações

AOT	Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio
BSA	Soroalbumina bovina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
[E]	Concentração da enzima (mg/mL ou $\mu\text{g/mL}$ )
$E_a$	Energia de ativação
Log P	Logaritmo de partição do solvente
pI	Ponto isoelétrico
pNPP	Palmitato de p-nitrofenila
$r_m$	Raio micelar (Å)
T	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ou K)
U	Unidade de atividade enzimática ( $\mu\text{mol/min}$ )
U/mL	Unidades por mililitro
U/mg	Unidades por miligrama de proteína

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de estudar os principais parâmetros que regem a cinética e a estabilidade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase 100 L, Novozyme) em reações de hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de cadeia longa, em sistema de micelas reversas de AOT [2-etil-hexil-sulfossuccinato de sódio, 100 mM] em isooctano. Em reações de hidrólise, foram determinados os efeitos dos parâmetros  $W_o$  ( $[H_2O]/[AOT]$ ), concentração de enzima, pH, temperatura e concentração do substrato. Verificou-se que a lipase de *Thermomyces lanuginosa* apresentou um perfil de atividade tipicamente na forma de sino, com atividade máxima (1092,4 U/mg) em  $W_o$  de 15. As demais condições ótimas para a atividade da enzima foram pH 8,0 e 37 °C, com atividade máxima de 2163,6 U/mg. O estudo do efeito da concentração dos substratos tributirina (10 a 170 mM) e trioleína (10 a 250 mM) mostrou que a enzima não apresenta um comportamento cinético de Michaelis-Menten, sendo inibida por excesso dos substratos. A atividade máxima de 1854,6 U/mg foi obtida a 120 mM de tributirina e de 2144,5 U/mg a 150 mM de trioleína. Nos ensaios de estabilidade da enzima frente à temperatura (30-60 °C), verificou-se que esta sofreu ativação quando incubada a 30 °C durante 30 minutos,, obtendo-se para as demais temperaturas tempos de meia-vida de 30, 20 e 10 min respectivamente a 37, 50 e 60 °C. Os efeitos dos parâmetros da reação e do sistema, como temperatura  $t$ , °C, pH,  $W_o$ , e razão molar (R.M), foram estudados através de um delineamento fatorial  $2^{4-1}$ . As variáveis mais importantes foram o pH e a temperatura e a interação entre elas. As melhores condições para síntese do laurato de etila foram 30°C, pH 5,6;  $W_o$  10; e R.M 5,0 com rendimento de 90% (60 min) e atividade específica de 220 U/mg.

## ABSTRACT

This thesis aimed to study the principal parameters that control the kinetics and stability of the lipase from *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase 100 L, Novozyme) in reactions of triglycerides hydrolysis and esters synthesis with long-chain fatty acids, within reverse micelles of 100 mM AOT [bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate] in isooctane. The effects of the level of water in the system ( $W_o$ ), enzyme concentration, pH, temperature and substrate concentration were determined for the hydrolysis reaction. The activity of *Thermomyces lanuginosa* lipase showed a typical bell curve against water content, with a maximum activity of 1092 U/mg at  $W_o$  of 15. Other conditions for maximum activity were pH 8.0 and 37 °C, under which conditions the activity was 2164 U/mg. Against substrate concentrations of 10 to 170 mM tributyrin and 10 to 250 mM triolein the enzyme did not show Michaelis-Menten kinetics, with apparent substrate inhibition at high substrate concentrations. The maximum activities were 1855 U/mg at 120 mM tributyrin and 2144 U/mg at 150 mM triolein. In the tests of enzyme temperature stability over the range 30-60 °C, showed that the enzyme was activated when incubated for 30 minutes at 30 °C, but lost half of its activity within 30, 20 and 10 minutes for the temperatures of 40, 50 and 60 °C, respectively. The effects of temperature, pH,  $W_o$  and molar ratio were studied using a  $2^{4-1}$  factorial design. The most important variables were the pH and the temperature and the interaction between them. The best conditions for ethyl laurate synthesis were 30 °C, pH 5.6, a  $W_o$  of 10 and a molar ratio of 5.0 with a reaction extent of 90% in 60 min with a specific activity of 220 U/mg.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática e a biocatálise compõem hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Nos países desenvolvidos, os projetos nesta área normalmente estão entre os prioritários e englobam grupos de pesquisa com alto potencial de produção de conhecimento e geração de tecnologias de ponta. Dentre as principais enzimas utilizadas destacam-se as lipases, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua quimio-regio e enantioselectividade.

A utilização de sistemas reacionais não convencionais, em solventes orgânicos, para as reações catalisadas por enzimas, apresenta algumas vantagens, especialmente relacionadas com o deslocamento do equilíbrio termodinâmico da reação em favor da síntese e com a maior solubilidade dos produtos de interesse. Dentre eles, o sistema de micelas reversas, apresenta vantagens adicionais, pois permite a incorporação de certa quantidade de água necessária à manutenção da atividade enzimática, provendo um ambiente similar à situação "in vivo" destes biocatalisadores. Os sistemas micelares, dada a grande área interfacial que proporcionam, são particularmente adequados à atividade catalítica das enzimas como as lipases, que apresentam a sua ação condicionada pela existência da interface. Deste modo, a encapsulação de uma lipase em micelas reversas apresenta-se como um sistema modelo, ideal para o estudo dos parâmetros que regem a cinética estabilidade da enzima em reações de hidrólise e síntese.

Apesar de todas as vantagens enumeradas da biocatálise em sistemas aquo-restritos, o conhecimento da atuação de enzimas nestes sistemas ainda é pequeno, o que limita a sua aplicação em escala industrial, justificando assim o estudo apresentado neste trabalho; o comportamento de uma lipase em reações de hidrólise de triglicérides e de síntese de ésteres em sistema micelar AOT/Isooctano.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1. LIPASES-ASPECTOS GERAIS

### 2.1.1. Introdução e Definição

As lipases (triacilglicerol hidrolases; E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que "in vivo" catalisam a hidrólise de triglicerídeos aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (Figura 1) na interface água e óleo (Ul-Haq *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2001, Cajal *et al.*, 2000b; Carvalho *et al.*, 2000a; Del Río *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2000; Costa e Amorim, 1999; Russel *et al.*, 1998; Selmi *et al.*, 1998; Jesus *et al.*, 1997; Macedo e Pastore, 1997). "In vitro", as lipases podem atuar também como catalisadores em reações de esterificação ou transesterificação, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Krishna *et al.*, 2000; Leblanc *et al.*, 1998; Nagayama *et al.*, 1998; Russel *et al.*, 1998; Selmi *et al.*, 1998; Macedo e Pastore, 1997).

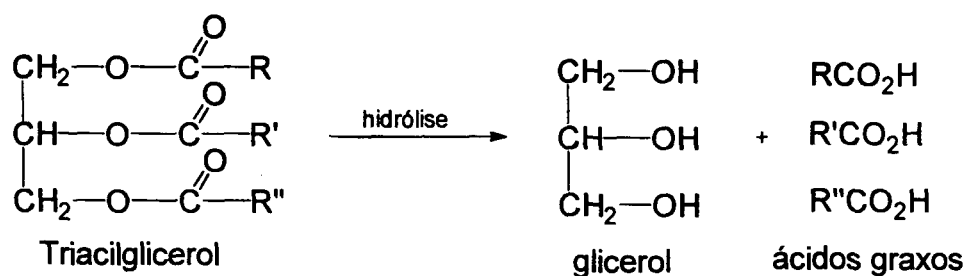


Figura 1. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.

As lipases constituem uma classe especial de esterases (E.C.3.1.1.1) (Egloff *et al.*, 1995). As esterases são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases, catalisando a clivagem e formação das ligações éster em substratos solúveis em água (Bornscheuer, 2002; Bornscheuer e Kazlauskas, 1999; Phytian, 1998). Ambas as enzimas são produzidas por praticamente todos os organismos vivos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias (Bornscheuer, 2002; Villeneuve *et al.*, 2000; Essamri *et al.*, 1998).

A diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente

definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir lipases a partir de suas características cinéticas, utilizando como critério a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo a sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água. O fenômeno da ativação interfacial foi melhor explicado quando foram determinadas as estruturas tridimensionais de algumas lipases como a de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (Shrag *et al.*, 1991) e a lipase pancreática humana (Winkler *et al.*, 1990). O sítio ativo da maioria das enzimas lipolíticas é recoberto por uma tampa hidrofóbica ou lid, que se move apenas quando encontra uma outra molécula hidrofóbica na interface, como um lipídeo e sofre uma mudança conformacional, expondo o seu sítio ativo. As lipases de *Pseudomonas glumae* (Deever, 1992), *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1994), *Rhizomucor miehei* (Cajal *et al.*, 2000 a,b; Brady *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991), *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* (Cajal *et al.*, 2000 a,b; Ollis *et al.*, 1992) apresentam a tampa em suas estruturas e sofrem ativação interfacial, enquanto que as lipases de *P. aeruginosa* (Jaeger e Reetz, 1998; Jaeger *et al.*, 1994), *Burkholderia (Pseudomonas) glumae* e *C. antarctica B* (Jaeger e Reetz, 1998), apresentam a tampa em suas estruturas e não sofrem ativação interfacial. E por sua vez, as cutinases, que são as menores lipases de estrutura conhecida, não apresentam a tampa catalítica e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (Cygler e Schrag, 1997; Yao e Koller, 1994; Fett *et al.*, 1992; Sweigard *et al.*, 1992).

Portanto, nem o critério de ativação interfacial, nem o da existência da tampa são suficientes para a diferenciação entre lipases e esterases. Assim, as lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, como enzimas que hidrolisam triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as esterases são enzimas que hidrolisam acilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta, com cadeia com menos de dez átomos de carbono (Bornscheuer, 2002; Nini *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1999; Ferrato *et al.*, 1997; Verger, 1997; Egloff *et al.*, 1995; Jaeger *et al.*, 1994).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela especificidade preferencial das duas enzimas. Os substratos naturais para as lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, com ligações éster tríplices, enquanto que esterases atuam sobre ligações ésteres únicas, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular (Bier, 1955; Brockman, 1984). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos das esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger *et al.*, 1999).

### 2.1.2. Aspectos Estruturais das Lipases: a Estrutura $\alpha/\beta$ , a Tríade Catalítica e a "Tampa Hidrofóbica"

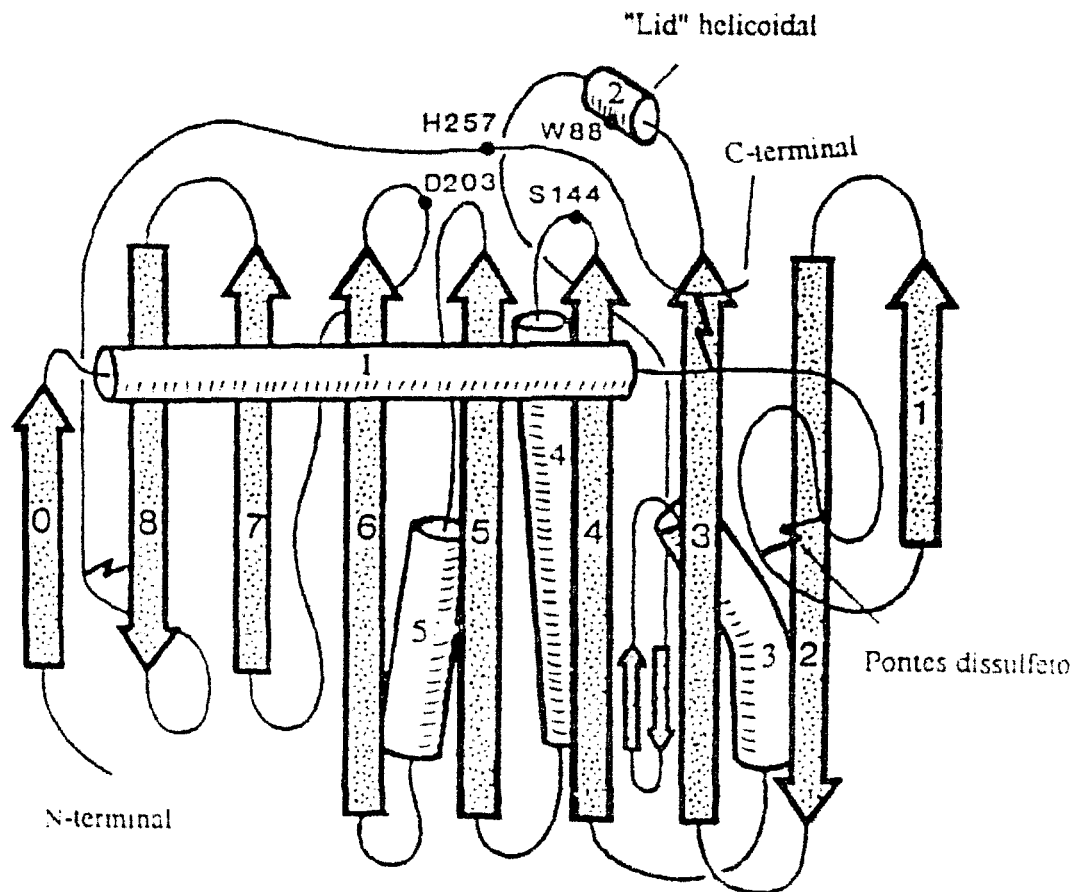
Um grande número de estruturas de lipases tem sido determinado e, apesar de pouca similaridade entre suas seqüências aminoacídicas, todas têm estruturas terciárias relacionadas à família das  $\alpha/\beta$  hidrolases (Bornscheuer, 2002; Cajal *et al.*, 2000 a,b; Schrag e Cygler, 1997) e possuem no seu sítio catalítico uma tríade catalítica (Ser, Asp/ Glu e His), semelhante à observada primeiramente em serina-proteases (Jaeger e Reetz, 1998; Schrag e Cygler, 1997; Egloff *et al.*, 1995; Jaeger *et al.*, 1994).

O sítio ativo das lipases é composto por três resíduos de aminoácidos: um resíduo serina, responsável pela catálise, unido por ligações de hidrogênio a um resíduo histidina, e um resíduo carboxilado ligado ao mesmo resíduo de histidina, que pode ser um aspartato ou glutamato (Egloff *et al.*, 1995; Jaeger *et al.*, 1994).

As proteínas com estrutura semelhante à das  $\alpha/\beta$  hidrolases possuem um núcleo central composto por fitas  $\beta$  paralelas (Figura 2). As fitas  $\beta$  têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente  $90^\circ$  entre si. O sítio catalítico está localizado no lado C-terminal das fitas  $\beta$  e o nucleófilo catalítico, em um pentapeptídeo altamente conservado (Jaeger *et al.*, 1999; Jaeger e Reetz, 1998; Schrag e Cygler, 1997; Egloff *et al.*, 1995; Jaeger *et al.*, 1994).

As lipases apresentam os seguintes aspectos estruturais: (1) uma seqüência nucleófilo-ácido-histidina como constituintes da tríade catalítica; (2) o nucleófilo está

localizado em um "ângulo nucleofílico"; (3) o conjunto de fitas  $\beta$  centrais tem pelo menos cinco fitas consecutivas paralelas; (4) a fita  $\beta_6$  é mais curta que a fita  $\beta_7$  e é seguida por uma mudança na direção da hélice; (5) a posição da tríade é oposta à observada nas famílias das proteases subtilisina e tripsina; (6) cada lipase tem uma  $\alpha$  hélice localizada na cadeia que passa ao redor do conjunto de fitas  $\beta$ ; (7) o ácido catalítico encontra-se geralmente seguindo a fita  $\beta_7$  (Schrag e Cygler, 1997).



**Figura 2.** Representação da estrutura terciária tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase da lipase de *Rhizomucor miehei*. As estruturas do tipo  $\beta$  conformação são mostradas como setas e numeradas de 0 a 8, as estruturas em  $\alpha$ -hélice são representadas por cilindros e numeradas de 1 a 5 (Fonte: Lawson et al., 1994).

A lipase de *R. miehei* (Figura 2) é representativa de um grupo de lipases fúngicas relacionadas, o qual inclui as lipases de *R. delemar* (Brady et al., 1990), *H. lanuginosa* (Derewenda, 1994 a), a lipase de *Penicillium camembertii* (Derewenda, 1994 b) e a lipase de *Penicillium sp. UZML4* (Gulomova et al., 1996). O conjunto central destas lipases contém nove fitas  $\beta$ . As sete fitas ao redor de  $\beta_5$  são

equivalentes em posição e direção às fitas  $\beta 1$ - $\beta 7$  do dobramento padrão de  $\alpha/\beta$  hidrolases. A cadeia que teria uma posição equivalente à  $\beta 8$ , na estrutura padrão de  $\alpha/\beta$  hidrolases, carrega a histidina catalítica em lipases, prolongando-se sobre o conjunto central de fitas  $\beta$  e sobre o sítio catalítico, formando uma "tampa hidrofóbica". A "tampa hidrofóbica" sofre uma mudança conformacional ao interagir com a interface lipídeo/água, expondo o sítio catalítico e favorecendo a ligação com o substrato (Schrag e Cygler, 1997).

### 2.1.3. O Mecanismo catalítico

O mecanismo catalítico de hidrólise ou formação de ésteres é semelhante para as lipases e proteases, devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo destas enzimas. O mecanismo é composto por quatro etapas e segue o modelo proposto para a quimotripsina (Figura 3).

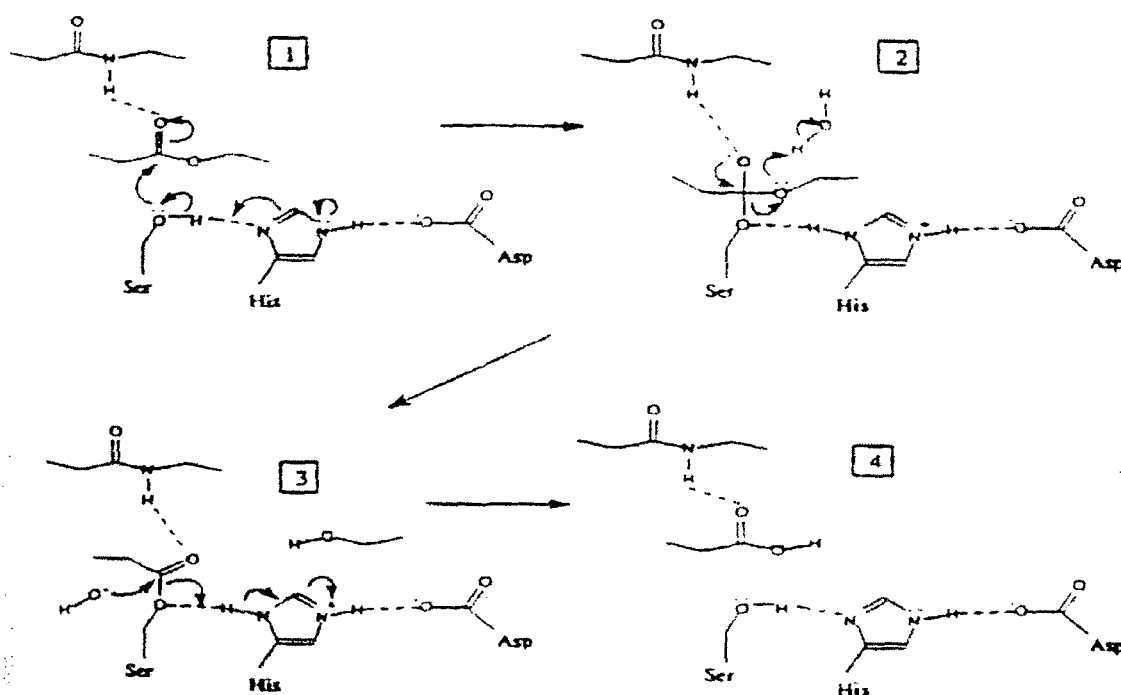


Figura 3. Mecanismo catalítico de lipases (Fonte: Jaeger *et al.*, 1999).

O substrato liga-se ao aminoácido serina presente no sítio ativo. Ocorre, então, um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelos resíduos catalíticos de His e Asp. Uma molécula de álcool é liberada, formando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila da água, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (Bornscheuer, 2002; Bornscheuer e Kazlauskas, 1999).

#### 2.1.4. Características Cinéticas e Físico-Químicas das Lipases Fúngicas

As lipases fúngicas apresentam uma grande diversidade de propriedades moleculares (pesos moleculares e pontos isoelétricos) e físico-químicas, como o pH e temperaturas ótimos para a atividade, estabilidade frente ao pH e à temperatura e especificidade frente a vários substratos. A maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e temperatura ótima para atividade entre 30 e 40 °C. Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. Estas variações também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando a comparação difícil. Este fato ilustra o grande potencial de enzimas fúngicas na indústria, uma vez que enzimas com propriedades diferenciadas de interesse industrial, podem ser selecionadas de uma variedade de microrganismos (Sharma *et al.*, 2001; Frost e Moss, 1987; Iwai e Tsujisaka, 1984).

As lipases produzidas pela Novozyme não são utilizadas apenas nas indústrias de detergentes, mas também na indústria de óleos e gorduras; em bebidas, como cerveja, vinhos e sucos de frutas; na indústria da panificação; na indústria têxtil; no tratamento do couro; no processamento de carne, frango e peixe e na indústria farmacêutica.

As lipases possuem peso molecular geralmente variando entre 20 e 60 kDa. Seu ponto isoelétrico (pI) varia em uma faixa de 3,6 a 7,6, sendo majoritariamente ácidas, com pI entre 4 e 5 (Hiol *et al.*, 1999; Gao e Breuil, 1998), conforme mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Características físico-químicas de algumas lipases microbianas.

<b>Microorganismo</b>	<b>Ponto isoeletrico</b>	<b>Peso Molecular (kDa)</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus nidulans</i>	4,85	29	Mayordomo <i>et al.</i> , 2000
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	39	Toida <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	25-29	Toida <i>et al.</i> , 1998
<i>Aspergillus terreus</i>	-	41	Yadav <i>et al.</i> , 1998
<i>Aspergillus ustus</i>	7,1	34,6 e 66,7	Olama <i>et al.</i> , 1998
<i>Candida rugosa</i>	-	60	Gordillo <i>et al.</i> , 1995
<i>Fusarium sp</i>	-	12	Mase <i>et al.</i> , 1995
<i>Geotrichum candidum</i>	4,4 e 4,1	61,6	Hedrich <i>et al.</i> , 1991
<i>Glomus versiforme</i>	-	30	Gaspar <i>et al.</i> , 1997
<i>Humicola lanuginosa</i>	6,6	39	Omar <i>et al.</i> , 1987
<i>Mucor hiemalis</i>	4,6	49	Hiol <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium citrinum</i>	4,8 e 5,0	31,5 e 33,5	Krieger, 1995
<i>Pseudomonas sp</i>	-	30	Yamamoto e Fujiwara, 1998
<i>Pseudomonas cepacia</i>	-	33	Dünhaupt <i>et al.</i> , 1992
<i>Rhizomucor miehei</i>	3,8	31,8	Yan <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizomucor miehei</i>	-	29	Uvarani <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhizopus arrizus</i>	-	67	Chattopadhyay <i>et al.</i> , 1999
<i>Rhizopus oryzae</i>	7,6	32	Hiol <i>et al.</i> , 2000

#### 2.1.5. Especificidade

A especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (Jensen *et al.*, 1983). Há vários tipos de especificidade encontrados (Jensen *et al.*, 1990; Jensen *et al.*, 1983):

- 1) classe de lipídeo
- 2) posicional (ou regioseletividade)
- 3) ácido graxo
- 4) estereosseletividade
- 5) combinações destas

A especificidade relativa à classe de lipídeo refere-se a diferentes taxas de hidrólise entre triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis por uma mesma enzima.

A especificidade posicional (ou regioseletividade) classifica as lipases segundo a sua capacidade para hidrolisar ligações ésteres de triglicerídeos de acordo com a sua posição na molécula. Ao contrário das lipases seletivas posicionalmente (seletividade sn-1,3 e sn 1,2), as lipases não seletivas posicionalmente hidrolisam aleatoriamente qualquer uma das três ligações do triglicerídeo. A seletividade do tipo sn-1,3, encontra-se associada à liberação preferencial das moléculas de ácidos graxos nas posições terminais da molécula de triglicerídeo, enquanto que a seletividade do tipo sn-2 refere-se associada à liberação preferencial do ácido graxo central. As lipases seletivas do tipo sn-1,3 geralmente são microbianas extracelulares, e as enzimas deste tipo são produzidas por *Aspergillus niger*, *P. fluorescens*, *T. lanuginosa*, *C. viscosum* e várias espécies de *Rhizopus* e *Mucor*. Hara *et al.* (1997), estudando a especificidade de diferentes microorganismos ou de pâncreas, como a Lipozyme IM20 de *Mucor miehei*, a SP 435 de *Candida antarctica* e a Paratase A de *Aspergillus sp* (todos da Novozyme), observaram que a maioria delas apresentava especificidade para a posição 1,3 de triacilgliceróis. Hou (1997), caracterizando 25 lipases de leveduras do gênero *Candida*, *Geotrichum* e *Pichia*, observou especificidade para as posições 1,3 e algumas exceções, sem especificidade. Nenhuma das enzimas analisadas apresentou especificidade para a posição 2. As lipases de leveduras do gênero *Candida* (Hara *et al.*, 1997) e as lipases de bactérias *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* pertencem ao grupo de lipases que não são seletivas posicionalmente (Castro e Anderson, 1995).

A especificidade em relação ao ácido graxo refere-se à capacidade particular que as lipases têm de promover preferencialmente a liberação de ácidos graxos com comprimentos de cadeia e graus de insaturação bem definidos. Este tipo de seletividade é encontrado em reações de hidrólise e esterificação. A velocidade de hidrólise de triglicerídeos, que contém resíduos ácidos com o mesmo comprimento de cadeia, parece aumentar com o grau de insaturação do ácido graxo (Malcata, 1991).

A existência de estereosseletividade por parte de várias lipases refere-se à

degradação preferencial da ligação éster de triacilgliceróis de uma das posições primárias (sn-1 versus sn-3) (Akesson *et al.*, 1983). Este tipo de seletividade tem sido explorado em síntese orgânica na preparação de ésteres e álcoois opticamente ativos por intermédio da resolução racêmica de substratos (não triglicéridos) catalisada por lipases estereoespecíficas (Lattman *et al.*, 1990; Mukherjee *et al.*, 1990). Finalmente, é possível encontrar a combinação de todos os tipos citados.

A especificidade de algumas lipases microbianas está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Especificidade de algumas lipases de microrganismos frente a diferentes substratos.

Microorganismo	Especificidade	Referência
<i>Aspergillus nidulans</i>	Ésteres de cadeia acil curta e média	Mayordomo <i>et al.</i> , 2000
<i>Aspergillus oryzae</i>	Mono e diacilgliceróis, não hidrolisa triacilgliceróis	Toida <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus oryzae</i>	Mono, di e triacilgliceróis. Preferência por cadeias médias. Especificidade posicional 1,3	Toida <i>et al.</i> , 1998
<i>Aspergillus Terreus</i>	Posição 1,3	Yadav <i>et al.</i> , 1998
<i>Burkholderia cepacia</i>	Livre: pNPC2; imobilizada: pNPC 16*	Pencreac'h e Barati, 1999
<i>Fusarium sp</i>	Mono e diacilgliceróis	Mase <i>et al.</i> , 1995
<i>Geotrichum sp</i>	(A) Posições 1,3; (C) posição 2	Asahara <i>et al.</i> , 1993
<i>Geotrichum candidum</i>	Triacilgliceróis com cadeias C8-10	Sugihara <i>et al.</i> , 1990
<i>Geotrichum candidum</i>	(I) Substratos insaturados de cadeia longa; (II) substratos saturados de cadeia curta	Bertolini <i>et al.</i> , 1995
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Trioleína, em relação a trihexanóico, trioctanoína e tripalmitina.	Ogundero, 1987
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Triacilgliceróis com cadeias de 12 carbonos	Omar <i>et al.</i> , 1987
<i>Pseudomonas sp</i>	Hidrolisam igual: óleos de oliva, amendoim, milho, algodão, coco	Yamamoto e Fujiwara, 1988
<i>Rhizopus oryzae</i>	Triacilgliceróis, sem preferência por tamanho de cadeia.	Razak <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizopus oryzae</i>	Substratos saturados (C8), posição 1,3	Hiol <i>et al.</i> , 2000

### 2.1.6. Lipases de *Thermomyces (Humicola) lanuginosa*

Em 1994, a Novo Nordisk introduziu a primeira lipase comercial recombinante, a Lipolase<sup>®</sup> (Novozyme A/S-Bagsvaerd-Denmark). A Lipolase<sup>®</sup> é o nome de uma preparação comercial que contém a lipase extracelular de *T. lanuginosa* (classificada anteriormente como *H. lanuginosa*) produzida através de técnicas de engenharia genética, por expressão em *A. niger* geneticamente modificado. Esta enzima, hidrolisa gordura clivando a ligação éster nas posições 1 e 3 nas moléculas de triglicerídeos. Os produtos de hidrólise são mono- e diglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres. A enzima tem uma grande especificidade pelo substrato, promovendo a hidrólise de diferentes óleos e gorduras (Boletim Novozyme A/S-Bagsvaerd-Denmark). Sua produção se dá em larga escala e está sendo empregada principalmente na indústria de detergentes, para remoção de gorduras aderidas aos tecidos (Sharma *et al.*, 2001; Jaeger e Reetz, 1998; Wolf e Showell, 1997; Boel *et al.*, 1996). Estudos sobre mutagênese sítio dirigida desta lipase têm demonstrado que a atividade em diferentes solventes e substratos pode ser significativamente modificada através da substituição de aminoácidos nas regiões próximas da tampa (Svendsen *et al.*, 1997; Martinelle *et al.*, 1996).

As lipases produzidas pela Novozyme não são utilizadas apenas nas indústrias de detergentes, mas também na indústria de óleos e gorduras; em bebidas, como cerveja, vinhos e sucos de frutas; na indústria da panificação; na indústria têxtil; no tratamento do couro; no processamento de carne, frango e peixe e na indústria farmacêutica.

Com relação às características físico-químicas, a lipase de *T. lanuginosa* apresenta um pI de 6,6 e massa molecular de 39 kDa (Omar *et al.*, 1987). Com relação às suas características cinéticas em relação à hidrólise da tributirina em meio aquoso, a enzima é ativa na faixa de pH 7 a 11 e estável na temperatura de 55 a 60 °C, atuando muito bem entre 30 e 40 °C (Boletim Novozyme A/S-Bagsvaerd-Denmark). Estas características bem como, o seu baixo custo e alta atividade (100.000 LU/g) justificaram a investigação de seu potencial como biocatalisador em reações de hidrólise de triglicerídeos e síntese de ésteres em ambientes micelares.

### 2.1.7. Métodos para a Determinação da Atividade Lipolítica

Determinar a atividade enzimática de uma lipase é uma tarefa árdua, pois a enzima atua em substratos não solúveis em água e sua atividade está mais relacionada com a área interfacial da emulsão do que com a concentração do substrato. Os métodos em geral baseiam-se na quantificação dos ácidos graxos liberados por hidrólise enzimática de um triacilglicerol ou de um substrato artificial.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para acompanhar a atividade lipolítica em reação de hidrólise, sendo os mais citados o titulométrico, usando triacilgliceróis, principalmente trioleína, como substrato e os espectrofotométricos, que utilizam substratos sintéticos. A trioleína é o substrato natural e ideal para lipases, porque é líquida nas temperaturas requeridas nos ensaios, facilitando a emulsificação (Thomson, 1999). O óleo de oliva é um substrato que pode substituir a trioleína, pois é mais barato (Jensen, 1983).

O método titulométrico, embora seja pouco sensível, é o método oficial para a determinação da atividade lipolítica. Baseia-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima com um volume de NaOH ou KOH. O volume de base utilizada, em função do tempo de reação, está relacionado com a quantidade de ácidos graxos liberada e conseqüentemente com a atividade enzimática. Neste método, são utilizados como substratos o óleo de oliva, a trioleína e tributirina, em meio emulsionado (Krieger, 1995; Stuer *et al.*, 1986). Uma variação do método titulométrico é o método do pH-stat, no qual o pH da emulsão é acompanhado durante a hidrólise e quantidades de álcali são adicionadas automaticamente, mantendo o pH sempre constante (Thomson, 1999).

Os ácidos graxos liberados durante a incubação da enzima em uma emulsão de trioleína também podem ser quantificados pelo método de Lowry-Tinsley (1976), que é um método colorimétrico no qual os ácidos graxos liberados são extraídos do meio emulsionado com solvente orgânico e complexados com Cu (II). A formação do complexo origina uma coloração azul seletiva, que pode ser medida a 715 nm. Inúmeros trabalhos utilizam este método (Krieger *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 1999; Carneiro da Cunha *et al.*, 1994; Cabral *et al.*, 1993) em meio aquoso e em meio de solvente orgânico. Este método, também pode ser utilizado para avaliar a capacidade de síntese da lipase, e neste caso determina-se

o desaparecimento do ácido graxo do meio reacional, pela formação do éster.

Os métodos espectrofotométricos baseiam-se na hidrólise de substratos sintéticos, principalmente ésteres de p-nitrofenila, com cadeias de ácidos graxos variando de 12 a 18 carbonos. A atividade enzimática é determinada a 410 nm, pelo desenvolvimento de coloração amarela devida à liberação do p-nitrofenol (Krieger et al., 1999; Krieger et al., 1995; Pimentel et al., 1994; Stuer et al., 1986).

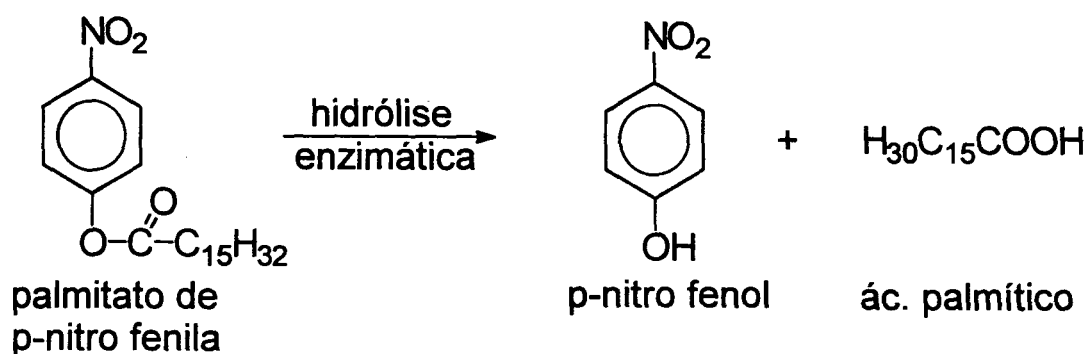


Figura 4. Reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP).

Os ácidos graxos liberados durante a lipólise e os ésteres formados durante a síntese podem ainda ser quantificados por métodos cromatográficos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Thomson et al., 1999; Balcão et al., 1998; Sánchez et al., 1998; Shih et al., 1997; Rees et al., 1990; Veeragavan, 1990), Cromatografia Gasosa (GC) (Chance et al., 1998; Kulkarni et al., 1998) e por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Thomson et al., 1999; Stahmann et al., 1997).

Um método mais recente, além do cromatográfico, inclui o método fluorimétrico, que baseia-se nas propriedades fluorescentes dos produtos de hidrólise. Os substratos fluorogênicos utilizados são ácidos graxos esterificados a umbeliferona (Thomson et al., 1999; Hendrickson, 1994; Shelley et al., 1987).

### 2.1.8. Aplicações das Lipases

O interesse em pesquisas com lipases tem crescido muito nas últimas décadas. Uma das razões está relacionada com a sua relevância medicinal, principalmente em doenças como a arteriosclerose e hiperlipidímia e sua importância na regulação e metabolismo. Os produtos da lipólise como ácidos graxos livres e diacilgliceróis desempenham muitos papéis importantes, especialmente como mediadores na ativação celular e na transdução de sinais (Villeneuve *et al.*, 2000). A outra razão, mais importante do ponto de vista de desenvolvimento de aplicações, está relacionada com a diversidade de sua função catalítica. As lipases possuem a capacidade de atuar sobre substratos insolúveis em água, como os óleos e gorduras, cujas propriedades físicas e valores comerciais dependem da estrutura do glicerol, bem como, do tipo de ácido graxo esterificado. Dependendo da polaridade e da solubilidade, o substrato poderá ser dissolvido na fase aquosa ou na que contém o óleo (Balcão, 1998).

As lipases são ferramentas poderosas não apenas nas reações de hidrólise, mas também em reações como esterificação, transesterificação, interesterificação e lactonização, em solventes orgânicos (Chowdary *et al.*, 2001; Hamsaveni *et al.*, 2001; Kiran *et al.*, 2001; Kiyota *et al.*, 2001; Krishna *et al.*, 2001a; Krishna e Karanth, 2001b; Rao e Divakar, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Krishna *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2000; Russel *et al.*, 1998; Selmi *et al.*, 1998). Como biocatalisadores, apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos. Efetivamente, suas características de especificidade, regioseletividade e enantioseletividade permitem a catálise de reações com um número reduzido de subprodutos, com baixa geração de resíduos e condições brandas de temperatura e pressão. Conseqüentemente, uma considerável atenção vem sendo dada ao uso das lipases (Del Río *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2000). Devido à capacidade de preservar sua atividade catalítica em solventes orgânicos e à diversidade de sua ação catalítica, a utilização de lipases como catalisadores tem sido investigada na resolução de misturas racêmicas, na síntese de fármacos, na formulação de detergentes e síntese de biosurfactantes, na indústria oleoquímica (bioconversão de óleos e gorduras), na indústria agroquímica, na manufatura do papel e na nutrição (Liese *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2000).

As Tabelas 3 e 4 apresentam algumas aplicações de lipases relatadas na literatura.

**Tabela 3.** Aplicações das lipases.

<b>Tipos de Reações</b>	<b>Áreas de Aplicação</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Produtos</b>	<b>Referências</b>
<i>Hidrólise</i>				
	Alimentos (laticínios)	Hidrólise da gordura do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados	Jaeger e Reetz, 1998; Patel <i>et al.</i> , 1996; Chen e Chang, 1993; Godtfredsen, 1990
	Química Óleo	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios)	Undurraga <i>et al.</i> , 2001; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000; Carvalho <i>et al.</i> , 2000; Godtfredsen, 1990
	Química Detergente	Remover manchas de óleo	Detergentes para lavanderias e uso doméstico	Liese <i>et al.</i> , 2000; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000; Pandey <i>et al.</i> , 1999; Jaeger e Reetz, 1998
<i>Esterificação</i>				
	Química Fina	Síntese de ésteres	Intermediários quirais Ésteres, emulsificantes	Liese <i>et al.</i> , 2000; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000
	Química Alimentos	Esterificação ou Transesterificação	Óleos ou gorduras, Flavorizantes e aromatizantes.	Osório <i>et al.</i> , 2001; Undurraga <i>et al.</i> , 2001; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000; Carvalho <i>et al.</i> , 2000; Pabai <i>et al.</i> , 1995 a,b
	Química farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos- preparação de intermediários homoquirais	Drogas antiinflamatórias como naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen.	Van Dyck <i>et al.</i> , 2001; Xin <i>et al.</i> , 2001; Xin <i>et al.</i> , 2000; Pandey <i>et al.</i> , 1999; Park <i>et al.</i> , 1999; Tsai <i>et al.</i> , 1999; Tsai e Huang, 1999; Ducret <i>et al.</i> , 1998; Xie <i>et al.</i> , 1998.

### 2.1.8.1. Lipases como Hidrolases

#### a. Lipases na indústria de detergentes

Devido à sua habilidade de hidrolisar gorduras, as lipases encontram uma maior aplicação comercial como aditivos em máquinas industriais e detergentes de lavar roupa. Para a sua adição em detergentes, entretanto, a lipase deve ser termoestável (entre 30 e 60 °C), permanecer ativa em ambiente alcalino (pH entre 10-11), que é o ambiente de uma máquina de lavar roupa e deve manter-se ativa na presença de outros componentes da formulação (Jaeger e Reetz, 1998). As lipases com estas propriedades são obtidas através de uma combinação de "screening" contínuo (Cardenas *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1995) e proteínas "engenheiradas" (Kazlauskas e Bomscheuer, 1998).

A hidrólise química dos triacilgliceróis, em escala industrial, é realizada em condições drásticas, através de tratamento com vapor a altas temperaturas e pressões. Mediante estas condições, os ácidos graxos insaturados se decompõem e se polimerizam, formando muitas vezes produtos indesejados. Quando se realiza a hidrólise catalisada por lipases, o processo fica isento de tais problemas, pois as lipases permitem a catálise de reações em condições brandas de temperatura e pressão (Sharma *et al.*, 2001).

As lipases de *T. lanuginosa*, *P. mendocina* e *P. alcaligenes* têm sido comercializadas por grandes empresas para a adição em detergentes.

**Tabela 4.** Lipases microbianas disponíveis comercialmente.

<b>Tipo</b>	<b>Fonte</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Fabricante</b>
Fungos	<i>Candida rugosa</i>	Síntese Orgânica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica</i>	Síntese Orgânica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosusa</i>	Aditivo em detergentes	Boehringer Mannheim, Novozyme
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Alimentos	Novozyme, Amano, Biocatalysts,
Bactérias	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntese Orgânica	Amano, Boehringer Mannheim, Fluka
	<i>Pseudomonas</i>	Aditivo em detergentes	Genecor
	<i>alcaligenes</i>		
	<i>Pseudomonas</i>	Aditivo em detergentes	Genecor
	<i>mendocina</i>		
<i>Chromobacterium</i> <i>viscosum</i>	Síntese Orgânica	Asahi, Biocatalysts	

Fonte: Jaeger e Reetz, 1998.

#### b. Lipases na indústria de alimentos

A aplicação de lipases microbianas na hidrólise de triacilgliceróis que contém ácidos graxos insaturados apresenta grande importância na área da nutrição (Osório *et al.*, 2001; Haraldsson e Almarsson, 1991; Godtfredesen, 1990).

Os óleos e gorduras são constituintes importantes dos alimentos. O valor nutricional e sensorial e as propriedades de um triglicerídeo são influenciados pela posição do ácido graxo na cadeia do glicerol, pelo comprimento da cadeia do ácido graxo e seu grau de insaturação. As lipases podem modificar as propriedades dos

lipídeos, alternando a localização da cadeia do ácido graxo no glicerídeo ou trocando um ou mais ácidos graxos por outro ácido graxo. Desta maneira, um lipídeo relativamente barato e menos desejável pode ser modificado a uma gordura de maior valor comercial (Undurraga *et al.*, 2001; Pabai *et al.*, 1995 a,b).

As lipases desempenham um importante papel no processamento do ácido  $\gamma$ -linolênico, um ácido graxo poliinsaturado (PUFA); na modificação de óleos vegetais na posição 2 do triglicerídeo, para obter gordura semelhante a gordura do leite humano para uso na alimentação de bebês; na interesterificação de glicerídeos mais baratos para glicerídeos com maior valor comercial (Undurraga *et al.*, 2001).

### c. Lipases na indústria oleoquímica

Durante a última década, a indústria oleoquímica tem substituído os catalisadores químicos pelas lipases, pelas vantagens citadas anteriormente (Osório *et al.*, 2001; Khor *et al.*, 1986).

A hidrólise parcial de óleos, catalisada por lipases para a produção de mono e di-acilgliceróis (Holmberg e Österberger, 1988), que são usados como emulsificantes, é uma das aplicações da hidrólise enzimática de gorduras para a preparação de produtos com valor comercial.

A extração de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ( $\omega$ -3), presentes em óleos de peixe refinados, pela ação de lipases, é de grande potencial comercial nas indústrias de óleos e gorduras no Japão, devido à propriedade destes ácidos graxos em reduzir a incidência de trombose e doenças cardíacas (Yamane, 1987).

### d. Lipases na indústria de papel e polpa de celulose

As lipases podem ser utilizadas na indústria madeireira para a remoção do "pitch", que é o termo utilizado para descrever todo o tipo de material hidrofóbico da madeira, principalmente os triglicerídeos e ceras, que são indesejáveis na manufatura do papel (Jaeger e Reetz, 1998). As indústrias de papel no Japão desenvolveram um método para controlar o "pitch". Este método utiliza a lipase de *C. rugosa* para hidrolisar acima de 90 % dos triglicerídeos presentes na madeira

(Sharma *et al.*, 2001).

## 2.1.8.2. Lipases como sintetases

### a. Lipases na síntese orgânica

As lipases são bastante utilizadas na síntese orgânica para catalisar uma variedade de transformações regio e estereoseletivas (Berglund e Hutt, 2000; Kazlauskas e Bornscheuer, 1998; Rubin e Dennis, 1997a,b). A maioria das lipases utilizadas em síntese orgânica são de origem microbiana. Estas enzimas agem na interface hidrofílica-lipofílica e toleram solventes orgânicos presente no meio reacional (Tabela 3).

### b. Lipases na resolução de ácidos e álcoois racêmicos

A estereoseletividade de lipases tem sido utilizada para resolver misturas de ácidos orgânicos racêmicos em sistemas bifásicos imiscíveis. Os álcoois racêmicos também podem ser resolvidos em formas enantiomericamente puras através da transesterificação catalisada por lipases (Klibanov, 1990).

Os *profens* (ácidos 2-anil propiônico) são grupos de drogas antiinflamatórias farmacologicamente ativas, principalmente na forma do enantiômero (S) (Hutt e Caldwell, 1984).

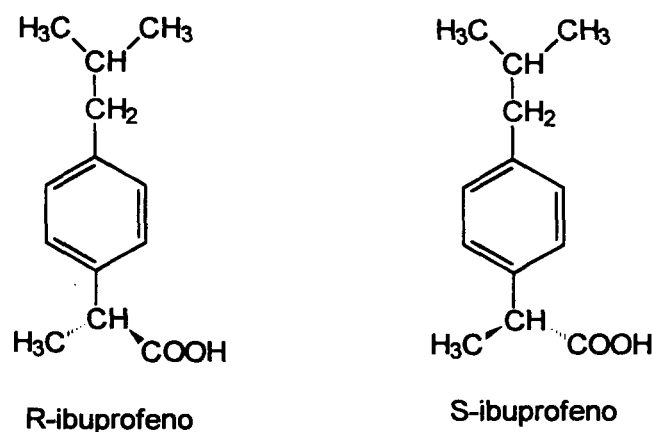


Figura 5. Estrutura do ibuprofeno.

O (S)-ibuprofeno puro pode ser obtido utilizando-se resolução cinética catalisada por lipase via reação de hidrólise ou esterificação e por separação cromatográfica quiral (Van Dyck *et al.*, 2001; Xin *et al.*, 2001; Ducret *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1998).

#### b. Lipases na síntese de ésteres

Os ésteres são compostos derivados de ácidos e álcoois e podem ser obtidos de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados ou por processos químicos e mais recentemente por biocatálise (Krishna *et al.*, 2001 a,b; Alvarez-Macarie e Baratti, 2000; Chowdary *et al.*, 2000; Del Río *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2000; Marques e Pastore, 1999). Possuem diversas aplicações, como na produção de aromas, na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos, na fabricação de plásticos e fibras sintéticas, na síntese de sedativos e outros fármacos e como surfactantes, entre outras. Uma variedade de agentes ativos na superfície (surfactantes) tem sido sintetizada utilizando-se lipases (Akoh, 1994; Nakano *et al.*, 1994; Akoh e Mutua, 1994). Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes no campo da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. Um outro exemplo é o palmitato de isopropila, usado em preparações medicinais para cosméticos, nas quais é necessária uma boa absorção do produto através da pele (Garcia *et al.*, 1999).

Outra categoria importante de ésteres são os aromas. Durante muito tempo, as plantas foram a única fonte destes compostos, sendo a maioria isolada de óleos essenciais. Entretanto, nas plantas, os componentes ativos sensorialmente estão freqüentemente presentes em pequenas quantidades ou ligados a outras substâncias, o que acarreta uma baixa produção e custos elevados com o isolamento e purificação do aroma. Outra desvantagem da extração de plantas é a forte dependência de fatores que dificultam o controle do produto, tais como a influência do tempo e o risco de doenças e pragas em tais plantas. Todos estes fatores influem diretamente na variabilidade, quantidade e qualidade do produto final (Marques e Pastore, 1999).

O aroma é um dos mais importantes atributos dos alimentos e bebidas.

Segundo a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os aditivos aromatizantes ou aromas são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e sápidas, capazes de conferir ou intensificar o "flavour" dos alimentos. Muitos compostos responsáveis por odores de frutas e fragrâncias de alimentos são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como os acetatos (C<sub>2</sub>), propionatos (C<sub>3</sub>) e butiratos (C<sub>4</sub>). Pode-se citar como exemplos os ésteres butirato de etila, acetato de isoamila, acetato de benzila, acetato de isopentila, propionato de isobutila, butirato de metila e o butirato de etila, que estão presentes respectivamente nos aromas de morango, banana, pêssigo, suco de frutas, rum, e maçã (Krishna *et al.*, 2001 a,b; Krishna *et al.*, 2000; Macedo e Pastore, 1997; Pavia *et al.*, 1997).

Os aromas gerados por via biotecnológica são classificados como "naturais", o que representa uma grande vantagem junto ao mercado consumidor. Atualmente, os consumidores estão dando preferência aos alimentos que apresentem ingredientes naturais, que estão cada vez mais substituindo os aditivos químicos. Para atender a esta crescente demanda do mercado consumidor, os processos biotecnológicos estão sendo usados para produzir diversos aditivos para a indústria de alimentos (Krishna *et al.*, 2001 a,b; Alvarez-Macarie e Baratti, 2000; Chowdary *et al.*, 2000; Del Río *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2000; Marques e Pastore, 1999). Os processos enzimáticos apresentam algumas vantagens em relação aos processos químicos industriais que utilizam catalisadores inorgânicos a altas temperaturas, que formam subprodutos indesejáveis, coloridos e que interferem no aroma. Isto requer procedimentos de purificação de elevado custo. O uso de permite a síntese de ésteres de alta pureza, com procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluentes (Del Río *et al.*, 2000; Paiva e Malcata, 1997).

## 2.2. CATÁLISE ENZIMÁTICA EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Na década de 70 iniciou-se um grande desenvolvimento na pesquisa da catálise enzimática em solventes orgânicos (Luisi *et al.*, 1977; Martinek *et al.*, 1977). A partir desta década, uma variedade de proteínas, enzimas e suas atividades catalíticas tem sido estudada em solventes orgânicos e em misturas de água com solventes orgânicos.

Um ambiente aquoso é claramente não adequado para a catálise de ésteres por lipases, pois propicia o deslocamento do equilíbrio termodinâmico no sentido da hidrólise. Portanto, em reações onde os substratos são pouco solúveis em água e onde a água é um produto, o rendimento da reação em sistemas aquosos é geralmente baixo. Iwai *et al.* estudaram a esterificação entre vários ácidos graxos e álcoois terpênicos com lipases de diferentes origens. Houve apenas uma conversão catalisada pela lipase de *A. niger*, e mesmo assim, o rendimento foi baixo (48 %). Outro aspecto importante consiste na redução da inibição exercida por reagentes e produtos, através da escolha de um solvente orgânico adequado, que mantenha uma baixa concentração destes reagentes no microambiente da enzima (Alvarez-Macarie e Barati, 2000; Russel *et al.*, 1998; Amaya *et al.*, 1995).

Outras vantagens da catálise enzimática em meios aquo-restritos relatadas em literatura e de importância para lipases são a maior solubilidade dos substratos e produtos hidrofóbicos em solventes orgânicos; a redução de reações hidrolíticas secundárias, devido à reduzida quantidade de água no sistema; e o aumento da estabilidade do biocatalisador, pois a enzima fica relativamente inerte nos solventes apolares e que, além disso, não desorvem a água ligada a enzima, mantendo a sua conformação cataliticamente ativa (Alvarez-Macarie e Barati, 2000; Carvalho *et al.*, 2000a; Sellek e Chaudhuri, 1999).

### 2.2.1. Escolha do solvente orgânico

As propriedades de catálise das enzimas resultam de interações não covalentes com a água que permitem a manutenção de uma conformação cataliticamente ativa. A substituição da água por um solvente orgânico, dependendo

do tipo do solvente, pode causar distorção na estrutura da proteína, diminuindo a atividade enzimática. Na realidade, solventes orgânicos completamente anidros são incapazes propiciar a atividade catalítica, sendo necessária a presença de água no microambiente da enzima (Alvarez-Macarie e Barati, 2000; Carvalho *et al.*, 2000a; Jesus *et al.*, 1997).

Uma hipótese corrente propõe que uma molécula de enzima requer um pequena camada de água de hidratação, que atua como um componente primário do seu microambiente, servindo de tampão, entre a superfície enzimática e o meio reacional. Partindo deste princípio, é possível retirar toda a água do sistema substituindo-a por solventes orgânicos, desde que seja mantida essa camada de água essencial à manutenção da atividade catalítica (Lima e Angnes, 1999; Dordick, 1989).

A ação dos solventes orgânicos na catálise enzimática dá-se essencialmente em três níveis: a) por interação direta do solvente com a enzima, alterando a sua conformação nativa por ruptura das ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, b) por interação com substratos e produtos da reação, afetando a sua solubilidade e difusão ou participando diretamente na reação, c) por interação com a camada de água de hidratação da enzima e sua remoção (Van Erp *et al.*, 1991; Dordick, 1989).

A escolha do solvente orgânico a ser utilizado em catálise faz-se de acordo com uma classificação proposta por Laane *et al.* (1987a,b), a qual se baseia no coeficiente de partição ( $\log P$ ), para o sistema bifásico octanol/água, que pode ser calculado segundo a equação 1:

$$\log P = \log \frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{água}}} \quad (1)$$

O  $\log P$  corresponde ao logaritmo do coeficiente de partição de um determinado soluto num sistema bifásico octanol em água, sendo determinado a partir das concentrações de equilíbrio do soluto de ambas as fases. Tem sido utilizado como uma medida da polaridade dos solventes e está relacionado com outros parâmetros, tais como a constante dielétrica, o momento dipolar ou a capacidade de formação de ligações hidrogênio, uma vez que estes parâmetros se

tratam de uma medida direta da polaridade do solvente.

Geralmente, a atividade enzimática é baixa em solventes relativamente hidrofílicos ( $\log P < 2$ ), pois estes podem desnaturar as enzimas por penetrarem nos núcleos hidrofóbicos das proteínas modificando a sua estrutura natural; é moderada em solventes com  $\log P$  entre 2 e 4 e é alta em solventes apolares, onde  $\log P > 4$  (Jesus *et al.*, 1997).

A Tabela 5 mostra diferentes orgânicos e seus respectivos  $\log P$ .

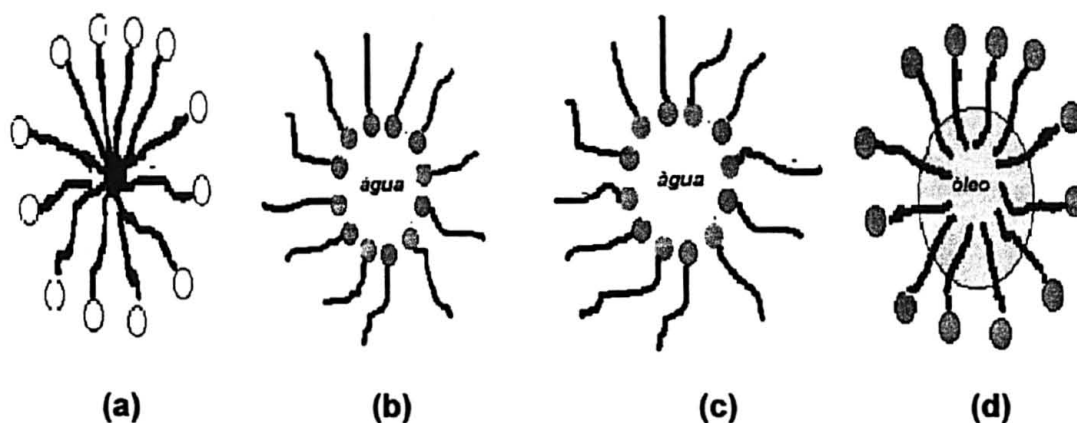
**Tabela 5.** Solventes orgânicos e seus respectivos  $\log P$ .

<b>Solvente Orgânico</b>	<b>Coefficiente de Partição (<math>\log P</math>)</b>
n-octano	4,5
Isooctano	4,51
Heptano	4,0
Ciclohexano	3,20
Hexano	3,50
Tolueno	2,50
Tetracloroeto de Carbono	3,0
Benzeno	2,0
Éter etílico	0,85
Clorofórmio	2,0
Xileno	3,10

Fonte: Laane *et al.* (1987)

### 2.2.2. Sistemas reacionais com solvente orgânico

Os sistemas mais utilizados em catálise enzimática em meios aquo-restritos são: (i) sistema bifásico (mistura bifásica de água e solvente orgânico não-polar), (ii) sistema microaquoso monofásico ou microemulsão e (iii) micelas reversas. No sistema bifásico e de micelas reversas, a enzima está solubilizada em água, ao passo que no sistema microaquoso a enzima está em suspensão. A atividade da lipase depende diretamente do tipo de sistema usado como meio reacional (Savelli *et al.*, 2000; Russel *et al.*, 1998; Amaya *et al.*, 1995).



**Figura 6.** Representação esquemática da estrutura micelar: a) normal, em meio aquoso; b) invertida, em presença de solvente apolar; c) microemulsão água/óleo e d) microemulsão óleo/água (Fonte: Maniasso, 2001).

As microemulsões são sistemas que contém pelo menos três componentes: água, um óleo não polar e um surfactante (Orlich e Schomäcker, 2001). Uma microemulsão é uma dispersão isotrópica e opticamente transparente de água em óleo (water/oil) ou óleo em água (oil/water), onde o óleo é um solvente orgânico não polar. O nome "microemulsão" deriva do fato de que as gotas de óleo no sistema (oil/water), ou gotas de água no sistema (water/oil), possuem um diâmetro que varia de 50 a 500 Å. As micelas normais (em meio aquoso) são microemulsões que possuem um diâmetro de 30-60 Å e as micelas reversas (em solvente apolar) de 40-80 Å. A estabilidade das microemulsões, seja micelas normais ou em micelas reversas, depende da razão da concentração de água pelo surfactante adicionado ao meio, representado pelo parâmetro  $W_0$  ( $[H_2O]/[surfactante]$ ) (Maniasso 2001; Jesus *et al.*, 1997).

O sistema de micelas reversas apresenta vantagens em relação aos outros, pois proporciona um ambiente adequado para a enzima, protegendo-a da desnaturação pelos solventes orgânicos, e possibilita a existência de um teor mínimo de água no interior da micela, necessário ao funcionamento do biocatalisador (Carvalho *et al.*, 2000a, Krieger *et al.*, 1999; Krieger *et al.*, 1997). Além disso, possibilita o controle do teor de água no sistema, e assim, o controle do deslocamento do equilíbrio termodinâmico da reação de hidrólise no sentido da esterificação (Carvalho *et al.*, 2000a; Costa e Amorim, 1999; Russel *et al.*, 1998).

### 2.2.3. Sistema de micelas reversas

#### 2.2.3.1. Surfactantes

Os surfactantes ou tensioativos são compostos anfipáticos ou anfifílicas, orgânicos ou organometálicos que formam colóides ou micelas em solução. Substâncias anfipáticas ou anfifílicas são moléculas possuidoras de uma região não-polar e outra polar. São moléculas ativas na superfície, capazes de interagir com interfaces. O termo "interface" indica o limite entre duas fases imiscíveis, e o termo "superfície" indica uma interface onde uma fase é líquida e a outra é gasosa, geralmente o ar. A quantidade mínima de trabalho para criar a interface é chamada de energia interfacial livre, medida por unidade de área, quando a tensão superficial entre as duas fases é determinada. Quando o surfactante é dissolvido em um solvente orgânico, a presença do grupo hidrofóbico no interior do solvente causa uma distorção da estrutura líquida do solvente, aumentando a energia livre do sistema (Maniasso, 2001; Carvalho *et al.*, 2000a).

A estrutura geral de um surfactante é representada pela fórmula R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarboneto variando de 8-18 átomos (geralmente alifática) e X é o grupo polar (ou iônico). Dependendo de X, os tensioativos podem ser classificados em não-iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros (Maniasso, 2001; Carvalho *et al.*, 2000a), conforme está apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6.** Classificação dos surfactantes de acordo com o seu caráter iônico.

<b>Tipo</b>	<b>Agente tensoativo</b>	<b>Referências</b>
Catiônicos	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) Cloreto de cetiltrimetil amônio (CTAC) Cloreto de dodeciltrimetil amônio (DTAC)	Maniasso, 2001; Suarez e Lang, 1995; Wang <i>et al.</i> , 1994; Petit <i>et al.</i> , 1992.
Aniônicos	Dodecil sulfato sódico (SDS) Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato (AOT) Dihexadecil fosfato (DHF)	Maniasso, 2001; Hornfeck <i>et al.</i> , 1998.
Anfóteros	3- (dodecildimetil amônio) propano 1- sulfato (SB-12) 4- (dodecildimetil amônio) butirato (DAB)	Maniasso, 2001
Não-iônicos	Polioxietileno p-tercetil fenol (Triton X-100) Polioxietileno dodecanol (Brij 35)	Maniasso, 2001

O tipo de surfactante utilizado para formar a micela reversa pode influenciar na atividade da enzima (Patel *et al.*, 1996). Rees et al. (1995) comparou a atividade de cinco lipases microbianas em diferentes microemulsões de água em óleo (w/o) e verificou que a atividade de lactonização foi maior para sistemas que utilizaram surfactantes aniônicos (AOT), do que para sistemas que utilizaram surfactantes catiônicos (CTBA). Yamada *et al.* (1993) adicionou surfactantes não-iônicos (Tween, Triton e Span) ao sistema AOT/Isooctano, formando micelas mistas. A atividade hidrolítica da lipase *C. viscosum* aumentou na presença de surfactantes não-iônicos, provavelmente devido à falta de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a lipase e o AOT.

As micelas formadas por surfactantes catiônicos, como por exemplo o CTAB, são relativamente pequenas para acomodar uma proteína enzimática, sendo necessária a adição de um co-surfactante, normalmente um álcool alifático. O co-surfactante divide-se entre a interface e a fase orgânica, possibilitando a

solubilização de uma maior quantidade de água e aumentando o tamanho da micela. Os surfactantes aniônicos, como AOT [bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio] não necessitam de co-surfactantes, pois formam agregados micelares capazes de solubilizar grandes volumes de água e assim formam micelas maiores. Por este motivo, o AOT (Figura 7) é um dos surfactantes aniônicos mais utilizados para microencapsular lipases em sistemas de micelas reversas (Krieger *et al.*, 1997; Crooks *et al.*, 1995 a,b; Koichiro *et al.*, 1995; Melo *et al.*, 1995 a,b; Prazeres *et al.*, 1992; Tsai e Chang, 1991; Brown *et al.*, 1993; Creagh *et al.*, 1993; Han e Rhee 1986).

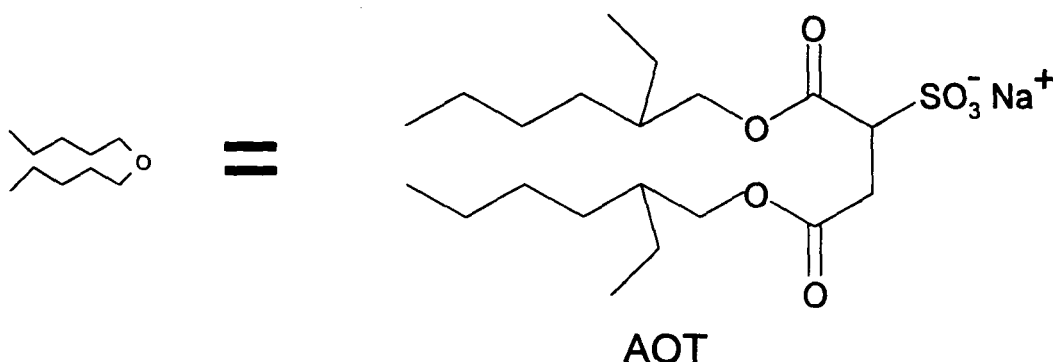


Figura 7. Diagrama esquemático da molécula de AOT (adaptado de Eastoe *et al.*, 1991).

Um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a atividade do surfactante é a concentração micelar crítica (CMC), que é a concentração mínima de surfactante necessária para alcançar a menor tensão superficial. Abaixo da CMC, o tensioativo está na forma de monômeros; quando a concentração está abaixo, mas próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas. Em concentração acima da CMC, as micelas possuem um diâmetro entre 3-6  $\mu\text{m}$  o que representa a existência de 30-200 monômeros de tensioativo por micela. A CMC depende da estrutura do surfactante (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, contra-ions, temperatura). As micelas são termodinamicamente estáveis, mas são destruídas pela diluição com água, quando a concentração do surfactante ficar abaixo da CMC (Carvalho *et al.*, 2000a; Maniasso, 2001). A faixa de concentração 100 a 200 mM e as condições utilizadas nos trabalhos com as lipases e outras enzimas (Kamyshny *et al.*, 2002; Garcia-

Moreno *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2000a; Carvalho *et al.*, 2000b; Krieger *et al.*, 1997) está normalmente muito acima da CMC.

#### 2.2.3.2. Definição

As micelas reversas ou reversas consistem de três fases: moléculas anfífilas (surfactante), água e solvente orgânico não-polar (Marhuenda-Ergea *et al.*, 2000) e são sistemas não aquosos, onde o solvente é altamente apolar e os grupos polares das moléculas do surfactante encontram-se orientados para o interior dos agregados, aproximadamente esféricos, rodeando as moléculas de água. A parte hidrofóbica encontra-se voltada para o solvente orgânico. As enzimas e substratos hidrofílicos podem, por isso, ser facilmente solubilizadas no interior das micelas (Carvalho *et al.*, 2000a), mantendo sua atividade biológica e permanecendo estáveis por um longo período de tempo (Shah *et al.*, 2000). O sistema é semelhante ao microambiente que as enzimas encontram nas células, pois as propriedades da água na micela reversa assemelha-se ao da água presente nas células (Marhuenda-Ergea *et al.*, 2000).

Existe uma controvérsia com relação a localização das enzimas no sistema de micelas reversas. Segundo Levashov *et al.* (1984) e Luisi e Magid (1986), após o encapsulamento, a localização das proteínas no interior das micelas depende da natureza da proteína e do tensioativo. As enzimas com características predominantemente hidrofílicas estariam localizadas no centro micelar, enquanto que as enzimas com características de ativação interfacial (lipases), estariam associadas à interface. Certas enzimas com alto caráter hidrofóbico, poderiam estar em contato com o solvente orgânico.

As biomoléculas como as enzimas são anfipáticas, possuindo regiões superficiais polares (ou carregadas) e não-polares. Em ambientes aquosos, a região hidrofílica interage favoravelmente com a água, enquanto que a região hidrofóbica tem a tendência de evitar o contato com a água. Assim, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos agregam-se para apresentar à água a menor área hidrofóbica possível (ficam confinados no interior da molécula protéica) e as regiões polares são arranjadas para maximizar as interações com o solvente aquoso (Lima e Angnes, 1999).

O sistema de micelas reversas, além de proporcionar um ambiente adequado para a enzima, proporciona a existência de uma grande área interfacial, tornando possível a solubilização de substratos hidrofóbicos e hidrofílicos, não havendo a limitação da área interfacial. Este sistema é, portanto, adequado à atividade catalítica das enzimas lipolíticas que dependem da área interfacial (Krieger *et al.*, 1999; Krieger *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 1997; Han e Rhee, 1986; Luisi e Magid, 1986).

#### 2.2.4. Biocatalisadores em Micelas Reversas

Apesar das enzimas serem bastante utilizadas em meio aquoso, as microemulsões com quantidades de água reduzida são utilizadas quando o substrato ou o produto são hidrofóbicos. Isto aplica-se especialmente as lipases, considerando que a solubilidade dos triacilgliceróis é aumentada em solventes hidrofóbicos (Carvalho *et al.*, 2000a).

A Tabela 7 mostra alguns exemplos de sistemas de micelas reversas e utilização de lipases em reação de hidrólise e síntese.

**Tabela 7.** Reações catalisadas por lipases microencapsuladas em diferentes sistemas de micelas reversas.

Fontes de Lipases	Surfactantes	Solventes Orgânicos	Reações	Referências
<i>Aspergillus orizae</i>	AOT	isooctano	hidrólise de triglicerídeos	Manoj e Swaminathan, 1997
<i>Candida cylindracea</i> ou <i>rugosa</i>	AOT	n-heptano	esterificação de ácido palmítico	Rao <i>et al.</i> , 1991
	AOT	isooctano	hidrólise do óleo de oliva	Tsai e Chiang, 1991; Han e Luisi, 1990
	AOT	isooctano	síntese do ibuprofeno	Hedström <i>et al.</i> , 1993
	AOT	isooctano	hidrólise de triglicerídeos	Manoj e Swaminathan, 1997
	AOT	n-heptano	lactonização do HHA*	Rees <i>et al.</i> , 1995
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CTAB	n-heptano/ clorofórmio	lactonização do HHA*	Rees <i>et al.</i> , 1995
	AOT	isooctano	hidrólise da trioleína	Prazeres <i>et al.</i> , 1992
	AOT	isooctano	glicerólise da trioleína	Chang e Rhee, 1990
	AOT	isooctano	hidrólise do pNPA**	Yamada <i>et al.</i> , 1993
	CTAB	clorofórmio/n-heptano	esterificação do ácido decanóico	Rees e Robinson, 1995
	AOT		síntese/ hidrólise do decanoato de octila	Carlile <i>et al.</i> , 1996
<i>Fusarium solani pisi</i> (cutinase)	AOT	isooctano	transesterificação do acetato de butila	Carvalho <i>et al.</i> , 1999; 1997
	AOT	isooctano	hidrólise da trioleína	Melo <i>et al.</i> , 1995 a
	CTAB fosfatidilcolina	isooctano/ hexanol isooctano	transesterificação e esterificação esterificação do ácido butírico	Cunnah <i>et al.</i> , 1996 Pinto-Sousa <i>et al.</i> , 1994
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	AOT	n-heptano	síntese do decanoato de etila	Carlie <i>et al.</i> , 1996; Crooks <i>et al.</i> , 1995 a

**Tabela 7.** Reações catalisadas lipases microencapsuladas em diferentes sistemas de micelas reversas (continuação).

Fontes de Lipases	Surfactantes	Solventes Orgânicos	Reações	Referências
<i>Penicillium camemberti</i>	AOT	isooctano	hidrólise de triglicerídeos	Manoj e Swaminathan, 1997
<i>Penicillium citrinum</i>	AOT	isooctano	Hidrólise da trioleína	Krieger <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas cepacia/fragi</i>	AOT	isooctano	esterificação de ácidos graxos naturais	Stamatis <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhizomucor miehei</i>	AOT	n-heptano	síntese do decanoato de etila	Carlie <i>et al.</i> , 1996; Crooks <i>et al.</i> , 1995 a
	AOT	isooctano	síntese do propionato de oleíla	Schlatmann <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhizopus arrhizus</i>	AOT	isooctano	hidrólise de ésteres	Brown <i>et al.</i> , 1993
	AOT	isooctano	hidrólise do óleo de noz	Kim e Chung, 1989
<i>Rhizopus delemar</i>	AOT	isooctano	hidrólise de triglicerídeos	Kim e Chung, 1989
	lecitina/AOT	isooctano	esterificação do ácido oléico	Nagayama <i>et al.</i> , 1998
	lecitina	hexano	Interesterificação do óleo de palma	Mojovic <i>et al.</i> , 1993
	soybean lecitina	isooctano	hidrólise/síntese da tricaprilina	Schimidli e Luisi, 1990

\*HHA, ácido 16-hidroxihexadecanóico

\*\*pNPA, para-nitrofenil acetatos

## 2.2.5. Solubilização de Biomoléculas em Micelas Reversas

### 2.2.5.1. Técnicas

As lipases e outras enzimas têm sido solubilizadas em micelas reversas por três técnicas distintas, que são escolhidas de acordo com o objetivo do trabalho: transferência de fases (extração), injeção de proteínas em fase aquosa e dissolução (Carvalho *et al.*, 2000a).

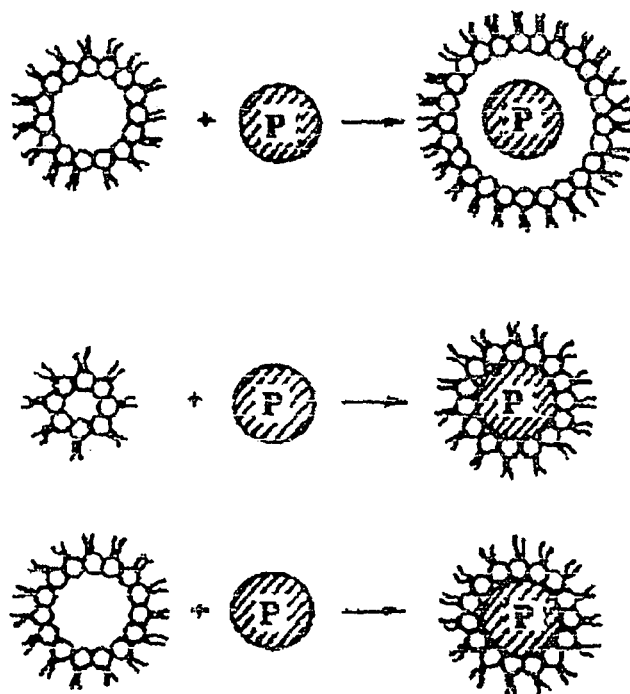
Na técnica de extração, ocorre a transferência de uma fase aquosa para uma fase micelar. Esta técnica é utilizada para isolar seletivamente uma proteína ou enzima, ou seja, como uma técnica de purificação. O procedimento utilizado é o contato direto de uma solução micelar com uma solução aquosa contendo a proteína de interesse, sob agitação. A transferência de fase é dependente de alguns fatores como a distribuição de carga da proteína, da carga do surfactante e do pH e força iônica da fase aquosa, entre outros (Castro e Cabral, 1988). Nesta técnica, além de ser difícil controlar a razão molar água/surfactante ( $W_o$ ), o tempo necessário para solubilizar a proteína pode ser longo (Carvalho *et al.*, 2000a).

A técnica de injeção é a mais utilizada para solubilizar biomoléculas como as proteínas em micelas reversas, pois apresenta o procedimento mais simples. A solução enzimática é adicionada na micela invertida (Carvalho *et al.*, 2000a). Esta técnica é utilizada quando se tem por objetivo a utilização do sistema micelar para estudar as propriedades da proteína, como a caracterização cinética de uma enzima. Nesta técnica, as proteínas estão presentes em solução tamponada, que é injetada na solução micelar, seguida de agitação. A formação de micelas pode ser verificada visualmente, pois a solução micelar final torna-se transparente. Com este método é possível ter um controle da quantidade de água presente no sistema, entretanto, este não é seletivo em relação à proteína a ser encapsulada, e por isso não permite a separação de uma mistura protéica (Castro e Cabral, 1988; Levashof *et al.*, 1984).

O terceiro método, por dissolução, apresenta características similares ao método de injeção. Consiste na introdução da proteína na forma de pó (proteína liofilizada) diretamente à solução micelar, cujo conteúdo de água seria adequado previamente para atingir-se o  $W_o$  requerido, sob agitação contínua. Este método é o menos utilizado, pois além de consumir mais tempo para solubilizar a proteína do que o método de injeção, contribui para a desnaturação da enzima (Carvalho *et al.*, 2000a; Castro e Cabral, 1988; Levashof *et al.*, 1984). Matzke *et al.* (1992) compararam os métodos de microencapsulamento de enzimas e verificaram que a capacidade de solubilização da enzima na micela reversa depende do método utilizado. No método de dissolução só ocorreu microencapsulação quando o diâmetro micelar era semelhante ou maior do que o da proteína, já no método de injeção, a dependência com o tamanho micelar não foi tão evidente.

### 2.2.5.2. Mecanismo Molecular de Encapsulamento de Proteínas

Martinek *et al.* (1989) propuseram três modelos de encapsulamento de proteínas em micelas reversas (Figura 8): i) modelo da camada de água; ii) modelo do ajuste-induzido; iii) modelo do tamanho fixado.



**Figura 8.** Modelos para microencapsulamento de proteínas (P) em micelas reversas: 1) modelo da camada de água, 2) modelo do ajuste-induzido; 3) modelo do tamanho fixado (Adaptado de Martinek *et al.*, 1989).

O modelo da camada de água permite considerar um aumento do tamanho micelar quando a enzima é encapsulada, tendo em vista que a quantidade de água dentro da micela seja a mesma na ausência ou presença da proteína. Este modelo foi proposto também por Meir *et al.* (1984), baseado em alguns estudos estruturais e é utilizado algumas vezes para indicar a existência de uma camada de hidratação.

O modelo do ajuste-induzido considera um aumento das micelas somente quando suas dimensões são menores do que a proteína, enquanto que o modelo do tamanho fixo, considera que ocorre a microencapsulação quando a micela tem o tamanho correspondente ao da proteína (Carvalho *et al.*, 2000a).

## 2.3. ENZIMOLOGIA MICELAR

### 2.3.1. $W_o$ versus $a_w$

O  $W_o$  e a atividade de água ( $a_w$ ) são duas maneiras diferentes de expressar a quantidade de água presente no sistema de micelas reversas. Enquanto o  $W_o$  pode ser facilmente calculado (equação 2), o  $a_w$  depende de muitos fatores e não é facilmente medido (Carvalho *et al.*, 2000a), de maneira que geralmente se utiliza o parâmetro  $W_o$  para definir a quantidade de água no sistema.

A água desempenha um papel fundamental na atividade de uma enzima, pois mantém a conformação nativa através de várias interações não-covalentes, do tipo ligações de hidrogênio. A proteína enzimática necessita de uma monocamada de moléculas de água à sua volta. Assim, se esta camada de água "essencial" se encontrar à superfície da enzima e aí se mantiver, a água do microambiente poderá ser substituída por solventes orgânicos, sem consequências adversas para a enzima (Lima e Angnes, 1999).

Em enzimologia micelar, o parâmetro que define o teor de água do sistema ( $W_o$ ) é definido como a razão entre a concentração molar de água e a concentração molar do surfactante, segundo a equação 2.

$$W_o = [H_2O] / [\text{surfactante}] \quad (2)$$

Este parâmetro determina a maioria das propriedades físicas e estruturais das micelas, assim como o número de moléculas de surfactante por micela e o raio micelar, ou seja, o seu tamanho. O valor ótimo de  $W_o$  para a catálise depende de muitos aspectos. Um deles é o tamanho da enzima em relação ao da micela, uma vez que o espaço disponível para acomodar a proteína influencia na conformação adquirida dentro da micela. Um comportamento comumente verificado é que o  $W_o$  ótimo corresponde ao tamanho micelar comparável ao tamanho da proteína (Carvalho *et al.*, 2000a). O raio da micela pode ser calculado pela equação 3 (Luisi *et al.*, 1988):

$$r (\text{Å}) = 1,64 W_o \quad (3)$$

Esta equação aplica-se com boa aproximação ao sistema AOT/Issoctano, e foi confirmada por estudos de Raios-X, por dispersão da luz, por ultracentrifugação e por ressonância nuclear magnética (RMN) (Castro e Cabral, 1988). A água intramicelar pode ter propriedades físico-químicas distintas da água pura, assemelhando-se a água presente nas membranas e interfaces biológicas. Goto *et al.* (1995) estudaram a solubilização da água no sistema de micelas reversas AOT/solvente, classificando a água intramicelar como água imobilizada, água de hidratação e água livre. Abaixo de  $Wo$  2, existe apenas água imobilizada, ao passo que na faixa de 4-10, a água hidrata os grupos polares do AOT e finalmente a presença de água livre é verificada para valores de  $Wo$  acima de 10. A maioria das enzimas, especialmente as lipases, tem atividade ótima em reações de hidrólise em  $Wo$  entre 10 a 15 (Chang e Rhee, 1990; Han e Rhee, 1986; Pandey *et al.*, 1999; Vulfson, 1994). Para reações de síntese, entretanto, este valor de  $Wo$  pode ser consideravelmente menor. Aires-Barros (1990) obteve uma atividade máxima em reação de esterificação entre  $Wo$  5,6 e 6,7 para a lipase de *C. viscosum*, solubilizada em micelas reversas AOT/Issoctano, enquanto que a lipase de *M. miehei* exibiu um máximo de atividade a  $Wo$  4. Crooks *et al.* (1995 a) obtiveram atividade de esterificação máxima em  $Wo$  10 para a lipase de *R. miehei* no sistema de microemulsão AOT. Nagayama *et al.* (1998) estudou a reação de esterificação do ácido oleico com octanol catalisada pela lipase de *R. delamar* em sistema de microemulsão e obtiveram atividade máxima em  $Wo$  4,5 no sistema de lecitina e  $Wo$  7,5 no sistema contendo AOT.

A concentração do surfactante influencia no parâmetro  $Wo$ . O conceito de  $Wo$  geralmente é associado somente com o nível de hidratação, embora dependa de outras variáveis, como a concentração do surfactante. Um aumento da concentração do surfactante, mantendo-se a mesma concentração de água, causa um decréscimo no tamanho micelar, enquanto que adicionando-se uma maior quantidade de água e mantendo-se a mesma concentração de surfactante, tem-se um aumento do tamanho micelar (Carvalho *et al.*, 2000a).

### 2.3.2. Efeito do pH

A exemplo da atividade catalítica em soluções aquosas, a atividade das enzimas em sistema de micelas reversas é dependente do pH intramicelar. Em sistemas de micelas reversas normalmente assume-se que o pH no interior da micela corresponde ao pH da fase aquosa inicial (Carvalho *et al.*, 2000a; Smith e Luisi, 1980). Entretanto, as alterações da água presente na micela, e já referidas no item 2.3.1, podem causar variações de pH, portanto, o pH intramicelar está relacionado com o parâmetro  $W_o$ . Além disso, os grupos ionizáveis da enzima são afetados pelo microambiente micelar e o estado de ionização destes grupos influencia na interação da enzima com substratos e produtos (Petersen *et al.*, 1998).

O pH da fase aquosa inicial tem uma importância significativa na promoção das interações eletrostáticas entre os componentes micelares e os biopolímeros, pois determina a carga elétrica da proteína em solução. No caso da técnica de extração, a solubilização na fase micelar normalmente ocorre quando a proteína e os grupos polares do surfactante têm cargas opostas (Cabral e Aires-Barros, 1993). Assim, para tensioativos catiônicos, a solubilização é favorecida em valores de pH superiores ao do ponto isoelétrico da proteína, enquanto que, para os surfactantes aniônicos, a transferência ocorre em valores de pH inferiores ao ponto isoelétrico da proteína (Decker *et al.*, 1989). Em alguns casos, entretanto, este efeito não ocorre, ou é apenas parcial, ou seja, não há transferência da proteína pela variação do pH. Neste caso, os autores sugerem que a transferência dos biopolímeros para a fase micelar seja regida por interações hidrofóbicas (Castro e Cabral, 1988).

Segundo Smith e Luisi (1980), o efeito da alteração do pH no interior das micelas é mais verificado quando os valores de  $W_o$  são baixos (menor do que 10), uma vez que não há água livre no sistema. Pelo aumento de  $W_o$ , aumentaria o teor de água livre e o pH assemelhar-se-ia ao da fase aquosa inicial. Para tensioativos aniônicos como o AOT, é relatada uma diminuição de pH intramicelar, provavelmente causada por interações eletrostáticas entre a água e os demais componentes micelares, como o surfactante, a enzima e os sais presentes no interior das micelas (Castro e Cabral, 1988; Luisi e Magid, 1986).

### 2.3.3. Efeito da Temperatura e Estabilidade Térmica de Lipases em Meio Micelar

A influência da temperatura sobre os biocatalisadores no sistema de micelas reversas é semelhante à do meio aquoso (Carvalho *et al.*, 2000a; Melo *et al.*, 1995; Prazeres *et al.*, 1992; Han e Rhee 1986). Muitas reações químicas ocorrem a uma velocidade maior com o aumento da temperatura. As reações catalisadas por enzimas têm o mesmo tipo de comportamento, até um limite, onde o aumento da temperatura causa um aumento no número de choques, que é suficiente para desnaturar a proteína, pela modificação da sua estrutura catalítica. Neste ponto, o efeito de desnaturação sobrepõe-se ao aumento da atividade, causando uma diminuição da velocidade de reação. Os resultados relatados em literatura sugerem uma menor estabilidade das lipases em meio micelar, se comparada à estabilidade em meio aquoso; é o caso das lipases de *C. rugosa* (Kim e Chung, 1989), de *R. arrhizus* (Han e Rhee, 1986), e da cutinase recombinante de *Fusarium solani* pisi (Carvalho *et al.*, 2000).

### 2.3.4. Efeito da concentração do substrato

Ao lado do comportamento cinético da enzima relativo ao pH, temperatura e teor de água do meio, o estudo do efeito da concentração do substrato sobre a atividade enzimática é de grande valia, pois pode gerar dados sobre a especificidade da enzima frente ao substrato, e também, explicar mecanisticamente o comportamento cinético da enzima.

A maioria das lipases apresentam um comportamento frente ao substrato dito de "Michaelis-Menten" (uma hipérbole retangular quando a velocidade inicial da reação é plotada contra a concentração inicial de substrato) em sistemas micelares, possibilitando o cálculo das constantes cinéticas ( $K_{map}$  e  $V_{maxap}$ ).

A abordagem de Michaelis-Menten, entretanto, apresenta limitações no que se refere a análise completa do curso da reação, uma vez que não se consegue prever a formação real de produtos ao longo do tempo em alguns casos (Prazeres, 1992). Uma das características das reações hidrolíticas catalisadas por algumas lipases em sistemas de micelas reversas, é o decréscimo da atividade ao longo do

tempo. As causas deste comportamento ainda não estão esclarecidas, sendo consideradas como prováveis a inibição pelo produto, os efeitos de equilíbrio químico e a desativação enzimática. O primeiro destes efeitos foi identificado relativamente aos ácidos graxos liberados em meio aquoso e em sistema de micelas reversas (Tsai e Chiang, 1992).

O problema maior no estudo das propriedades cinéticas das lipases em micelas reversas, e também em emulsões, é a existência de diferentes fases no sistema, e muitas questões estão ainda por esclarecer, sendo que as mais importantes dizem respeito às relações entre a estrutura e o comportamento das enzimas, e ao papel dos sistemas onde estas enzimas se encontram (emulsões ou micelar) (Levashof *et al.*, 1984).

### **3. OBJETIVOS**

---

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral estudar a ação catalítica da lipase de *Thermomyces lanuginosa* no sistema de micelas reversas AOT-isoctano em reações de hidrólise de triglicerídeos e síntese de ésteres.

Para alcançar este objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

#### *a) Em reações de hidrólise de triglicerídeo*

- Determinar o efeito na atividade enzimática das principais variáveis do sistema micelar: teor de água no sistema ( $W_o$ ), concentração de enzima, temperatura e concentração dos substratos trioleína e tributirina.
- Determinar a estabilidade da enzima frente à temperatura.

#### *b) Em reações de síntese de ésteres*

- Escolher, após estudos prévios, uma reação modelo de síntese.
- Estudar os principais parâmetros que influenciam a catálise enzimática e a produção do éster; o teor de água ( $W_o$ ), pH, temperatura e razão molar álcool/ácido.
- Desenvolver e aplicar metodologia de purificação por cromatografia preparativa e análise de ésteres por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Validar os resultados da síntese por CLAE.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. INTRODUÇÃO**

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Departamento de Química, nos Laboratórios de Tecnologia Enzimática e Química e Fitobiomassa, respectivamente, da Universidade Federal do Paraná.

Procurou-se descrever detalhadamente os materiais e métodos experimentais referentes à cada etapa. Os métodos analíticos foram, entretanto, englobados em um único item, por terem sido, na sua maioria, comuns a todas etapas. Para evitar a repetição dos termos v/v (volume por volume) e m/v (massa por volume), convencionou-se para sólidos dissolvidos em líquidos, m/v e para líquidos, v/v.

### **4.2. REAGENTES**

Neste trabalho foram utilizados reagentes com o grau analítico e grau de pureza requerido nos experimentos.

### **4.3. ENZIMA**

Foi utilizado o extrato comercial da enzima Lipolase<sup>®</sup> 100 L (Novozyme A/S-Bagsvaerd-Denmark) na forma de uma solução aquosa. Esta preparação enzimática apresenta uma atividade de 100 unidades de lipase (KLU/g), utilizando tributirina como substrato (declarada pelo fabricante) e foi utilizada sem purificação prévia.

Esta atividade foi confirmada em nosso laboratório, para o meio aquoso, com os métodos de hidrólise do pNPP (palmitato de p-nitrofenila), titulométrico e Lowry-Tinsley (ver itens 4.8.2.1 e 4.8.2.2).

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosa* EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE

Os estudos dos parâmetros cinéticos da lipase de *T. lanuginosa*, em reações de hidrólise de triglicerídeos foram realizados com o objetivo de conhecer o comportamento da enzima no sistema de micelas reversas, através da determinação de seus parâmetros cinéticos.

A enzima foi microencapsulada pelo método de injeção, utilizando-se um sistema de micelas invertidas com a quantidade de água requerida no experimento. Os ensaios foram realizados em reator termostaticado, onde foram adicionados 8 mL de uma solução 100 mM de AOT em isooctano, que foram deixados sob agitação, por aproximadamente dois minutos. Em seguida, injetaram-se volumes adequados de solução enzimática, até que a solução se tornasse translúcida. A reação foi iniciada pela adição de trioleína ou tributirina, na concentração requerida no experimento.

As amostras, retiradas em tempos determinados, foram submetidas à dosagem de ácidos graxos livres, conforme descrito no item 4.8.2.3. Foram estudados os efeitos dos parâmetros  $W_o$  (5 a 20), pH (4,0 a 10,0), concentração de proteína (38,5 a 160,5  $\mu\text{g/mL}$  de proteína no meio reacional), concentração dos substratos trioleína (10 a 250 mM) e tributirina (10 a 170 mM), temperatura (23 a 58 °C) na atividade enzimática e também a estabilidade térmica (30 a 60 °C) da enzima no sistema. Todos os experimentos a seguir foram feitos determinando-se a atividade da enzima contra a trioleína, pelo método de Lowry-Tynsley, como descrito no item 4.8.2.3.

Nos experimentos onde não se estudou o efeito da concentração da proteína na atividade enzimática, a mesma foi mantida constante no volume total de reação (8 mL).

##### 4.4.1. Efeito do Parâmetro $W_o$

Para determinação do efeito  $W_o$  na atividade lipolítica, foram ensaiados valores de  $W_o$  entre 5 e 20, variando-se a concentração de  $\text{H}_2\text{O}$  do sistema micelar

para uma mesma concentração de tensoativo (100 mM AOT/Isooctano). A fase aquosa consistiu da enzima diluída em tampão fosfato, 50 mM, pH 7,0.

O teor de água no sistema (quantidade de água a ser adicionada) foi calculado a partir da equação 2.

#### 4.4.2. Efeito da Concentração de Proteína

O efeito da concentração de proteína na atividade lipolítica foi estudado variando-se a concentração de 38,5 até 160  $\mu\text{g/mL}$  em 8 mL do meio reacional, mantendo-se constantes o pH (7,0), a temperatura (30 °C) e o  $W_o$  (15).

#### 4.4.3. Efeito do pH da Fase Aquosa

Para a determinação do efeito do pH na atividade, a enzima foi diluída nos respectivos tampões, com força iônica de 50 mM, conforme a melhor concentração de proteínas obtida no experimento anterior. Foi estudada uma faixa de pH de 4,0 até 10,0, utilizando-se os tampões acetato (pH 4,0; 5,0); fosfato (pH 5,5-8,0); Tris-HCl (pH 8,0;9,0) e glicina (pH 10,0). A enzima foi diluída nestes tampões e os valores de pH foram verificados em potenciômetros para soluções de mesma diluição.

Foram injetados volumes da solução enzimática no requerido pH em 8 mL da solução 100 mM de AOT em isooctano para atingir-se um valor de  $W_o$  de 15, normalmente 216  $\mu\text{L}$ . O ensaio foi realizado a 30 °C,  $W_o$  15 e concentração de proteínas de 38,5  $\mu\text{g/mL}$  do meio reacional.

#### 4.4.4. Efeito da Concentração dos Substratos

O efeito da concentração dos substratos na atividade foi estudado variando-se a concentração dos substratos trioleína (10 a 250 mM) e tributirina (10 a 170 mM). A enzima foi diluída no tampão fosfato pH 8,0 com força iônica de 50 mM,

conforme a melhor concentração enzimática obtida no experimento anterior.

Procedeu-se como acima, mantendo-se constantes:  $W_0$  (15), a temperatura do ensaio, 30°C e a concentração de proteínas no sistema 38,5 µg/mL do meio reacional.

#### 4.4. 5. Efeito da Temperatura

Para a determinação do efeito da temperatura na atividade, a determinação da atividade lipolítica foi feita em diferentes temperaturas (23 a 58 °C). Foram mantidos constantes os parâmetros otimizados nos itens anteriores ( $W_0$  de 15, concentração de proteínas de 38,5 µg/mL do meio reacional e pH de 8,0).

#### 4.4.6. Estabilidade à Temperatura

Para a determinação do efeito da estabilidade à temperatura na atividade, foram incubados 8 tubos de ensaio contendo a enzima previamente diluída em tampão fosfato pH 8,0 com força iônica de 50 mM ( $W_0$  15, concentração de proteínas de 38,5 µg/mL do meio micelar), nos intervalos de tempos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 min, nas temperaturas de 30, 37, 50 e 60 °C.

Após o tempo de incubação, a atividade lipolítica foi determinada a 37 °C pelo método de Lowry-Tinsley (4.8.2.2).

### 4.5. ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES

#### 4.5.1. Estudos Prévios

Inicialmente foram realizados estudos prévios de verificação da capacidade de síntese da lipase. Foram testados como substratos álcoois de diferentes comprimentos de cadeia [etanol ( $C_2$ ); 1-propanol ( $C_3$ ); butanol ( $C_4$ ); pentanol ( $C_5$ ); hexanol ( $C_6$ )] e ácidos acético ou etanóico ( $C_2$ ); propiônico ( $C_3$ ); butírico ( $C_4$ ); pentanóico ( $C_5$ ), hexanóico ( $C_6$ ) dodecanóico ou láurico ( $C_{12}$ ). As reações foram realizadas a 37 °C,  $W_0$  de 5 e pH 8,0.

#### 4.5.2. Estudo da Síntese do Laurato de Etila por Delineamento Fatorial

A partir dos resultados da etapa anterior, a síntese do laurato de etila foi escolhida como a reação modelo para estudo do comportamento da enzima no sistema micelar.

A síntese foi realizada mantendo-se constante a concentração de proteína em 72 µg de proteína em 8 mL de solução 100 mM de AOT em isooctano. A enzima foi diluída no tampão requerido com força iônica de 50 mM. Foram injetados volumes adequados da solução enzimática em 8 mL da solução 100 mM de AOT em isooctano para atingir-se um valor de  $W_0$  requerido. Em seguida, foram adicionados o álcool e o ácido para promover a esterificação.

A atividade lipolítica de síntese foi determinada pelo método de Lowry e Tinsley (1976), pelo desaparecimento do ácido graxo do meio reacional, conforme descrito no item 4.8.2.3. e a reação monitorada durante 1 h com amostras coletadas a cada 5 min.

Os estudos de síntese do éster foram realizados através de um delineamento fatorial para otimização das condições da reação, pois permite não só estudar o efeito de diversas variáveis, como também, estudar a inter-relação entre elas, com um número reduzido de experimentos. Em um planejamento fatorial deve-se inicialmente determinar quais são os fatores e as respostas para o sistema que se deseja estudar. Como são quatro o número de variáveis selecionadas para o estudo da síntese do laurato de etila, o delineamento estatístico de  $2^{4-1}$  foi utilizado para a obtenção de resultados satisfatórios suficientes para a determinação da melhor condição reacional (Neto e Bruns, 1995).

Foram avaliados os principais parâmetros que influenciam na cinética da reação da formação do éster: como:  $W_0$ , pH, temperatura e a razão molar álcool/ácido. Estes estão apresentados na Tabela 8a. Os valores mínimos e máximos descritos na Tabela 8b foram representados ou codificados, respectivamente, pelos símbolos (-) e (+). Os valores dos efeitos das variáveis do planejamento fatorial  $2^{4-1}$  sobre a atividade foram calculados a partir da Tabela 8b.

**Tabela 8a.** Níveis máximos e mínimos escolhidos para o planejamento fatorial  $2^{4-1}$ .

Variáveis	Níveis	
	-	+
Wo (1)	5	10
pH (2)	6	10
T (3)	30	45
R.M* Álcool: Ácido (4)	3	5

R.M\* = Razão Molar

**Tabela 8b.** Valores dos efeitos das variáveis do planejamento fatorial  $2^{4-1}$

Experimento	Wo	pH	Temperatura	R. M.* álcool:ácido
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6 (triplicata)	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

R.M\* = Razão Molar

A partir dos resultados obtidos para este planejamento fatorial de  $2^{4-1}$ , foi possível ter uma visão mais adequada do sistema e, portanto, calcular, o desvio padrão relativo (DPR).

### 4.5. 3. Cinética da Reação de Biossíntese do Laurato de Etila

Com o objetivo de validar os resultados obtidos no item anterior (4.5), onde as amostras foram analisadas pelo método de Lowry-Tinsley (item 4.8.2.2), o éster foi produzido nas condições reacionais otimizadas (item 4.5.2):  $W_0$  de 10, pH 5,6, temperatura de 30 °C e a razão molar álcool/ácido 1:5. e 72 µg de proteína em 8 mL meio reacional e a cinética da reação foi avaliada. As amostras foram purificadas e analisadas por CLAE, contra um padrão sintetizado quimicamente (item 4.6).

#### 4.5.3.1. Biossíntese e purificação do éster

Foram realizados seis experimentos (8 mL cada) de síntese nos intervalos de tempo 0, 10, 20, 40, 50 e 60 min, sendo que cada reação foi parada com 72 mL de acetona. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga de bancada (Sigma) por 10 min a 5000 xg, com objetivo de precipitar a proteína presente no meio reacional. Após centrifugação, cada amostra foi evaporada em um rotoevaporador a 50 °C e purificada em uma coluna de 4 cm de diâmetro por 11 cm de altura, contendo um volume de 75 cm<sup>3</sup> de sílica gel 60 ativada (Merck), com granulometria de 0,063-0,200 mm. Foi utilizado o eluente hexano:éter etílico (99:1) para purificar as amostras. Para cada amostra eluída, foram coletadas 8 frações de 2 mL e a eluição do produto foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), conforme descrito no item 4.7.1 (Métodos Analíticos). O solvente foi removido em rotoevaporador e as amostras foram re-solubilizadas na fase móvel acetonitrila:acetona (9:1) e analisadas por CLAE (item 4.7.1).

Um ensaio-padrão (branco), substituindo-se a solução enzimática por tampão, foi feito nas mesmas condições, para excluir a possibilidade de haverem interferentes e para confirmação da catálise exclusivamente enzimática.

#### 4.5.3.2. Determinação da perda de produto durante o processo de purificação da amostra

Foi realizado um experimento, aqui designado de padrão quantitativo, com o objetivo de verificar a perda de produto durante o processo de purificação. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas anteriormente, mas na ausência da enzima e dos substratos e colocando-se em 8 mL meio reacional, 131 mg do padrão laurato de etila (massa equivalente à conversão total de 115 mg de ácido) sintetizado conforme descrito no item 4.6. O meio reacional foi deixado em agitação por 60 min e as amostras foram purificadas e analisadas conforme descrito acima (4.5.4). As amostras foram analisadas por Lowry-Tynsley e por CLAE para estabelecer-se uma comparação entre os dois métodos de análise.

#### 4.6. SÍNTESE QUÍMICA DO PADRÃO LAURATO DE ETILA

O padrão do éster de ácido carboxílico foi preparado através do método do Cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2$ ) (Vogel, 1998), com algumas modificações, conforme descrito a seguir.

##### Procedimento:

Foram adicionados em um balão de 50 mL 1 g de ácido láurico 5 mM (Sigma, 99 %) e 5 mL de cloreto de tionila. O balão foi fechado hermeticamente e aquecido a 65 °C por 90 min. Em seguida, foram adicionados 10 mL de etanol (Carlo Erba) em banho de gelo e deixou-se a mistura em repouso por 1 h. Adicionou-se água gelada (10 mL) e hexano (10 mL) e transferiu-se a mistura para um funil de separação de 50 mL. Descartou-se a fase aquosa e evaporou-se a fase orgânica em um rotoevaporador. Foram obtidos 90 mg do padrão laurato de etila, com rendimento de 70 %. O padrão do éster foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (item 4.8) e por Infravermelho (item 4.7.2).

## 4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.7.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Cada amostra eluída da coluna de sílica (item 4.5.3.1 e 4.5.3.2) foi aplicada em uma cromatoplaça contendo fluoreseceína (Merck), com auxílio de um tubo capilar. Após, as cromatoplaças foram transferidas para uma cuba de vidro hermeticamente fechada contendo hexano: éter etílico (9:1) como fase móvel. As cromatoplaças foram retiradas da cuba de vidro e evaporadas a temperatura ambiente para posterior visualização das manchas.

As placas foram primeiramente visualizadas em câmera UV a 254 nm. Em seguida, foram reveladas borrifando-se uma solução de ácido sulfúrico a 5 % em metanol e aquecendo-se cuidadosamente a cromatoplaça sobre uma chapa de aquecimento. As manchas apareceram gradativamente em decorrência da carbonização do componente das amostras.

### 4.7.2. Espectroscopia no Infravermelho

O éster, sintetizado conforme item 4.6, foi deixado sob vácuo para retirar o solvente e ar presentes na amostra e foi analisado por espectroscopia no infravermelho (espectrofotômetro modelo Brommem MB-100). Um filme fino da amostra foi aplicado sobre uma cela que contém KBr, com auxílio de um capilar. Os dados obtidos do infravermelho foram analisados através do Programa Win Brommen Easy, do próprio equipamento.

## 4.8. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As amostras contendo o éster laurato de etila (item 4.5.3.1 e 4.5.3.2) foram analisadas por CLAE em um sistema Shimadzu, modelo LC 10 AD, provido de um amostrador automático SIL 10 A com detector de índice de refração, modelo RID 10 A. Utilizou-se uma coluna C18 Micropak MCH 10, com fase móvel

acetonitrila:acetona (9:1), vazão de 0,9 mL/min, e 40 °C. Os dados cromatográficos foram analisados por software CLASS 10 (Shimadzu), através do qual se fez os respectivos cálculos de áreas.

O laurato de etila foi quantificado por padronização externa, com base na curva de calibração do éster padrão sintetizado conforme descrito no item 4.6, em concentrações variando de 0,05 mg/mL a 2,0 mg/mL (Figura 9). Todas as injeções foram realizadas por amostragem automática e o volume de injeção correspondeu a 20 µL.

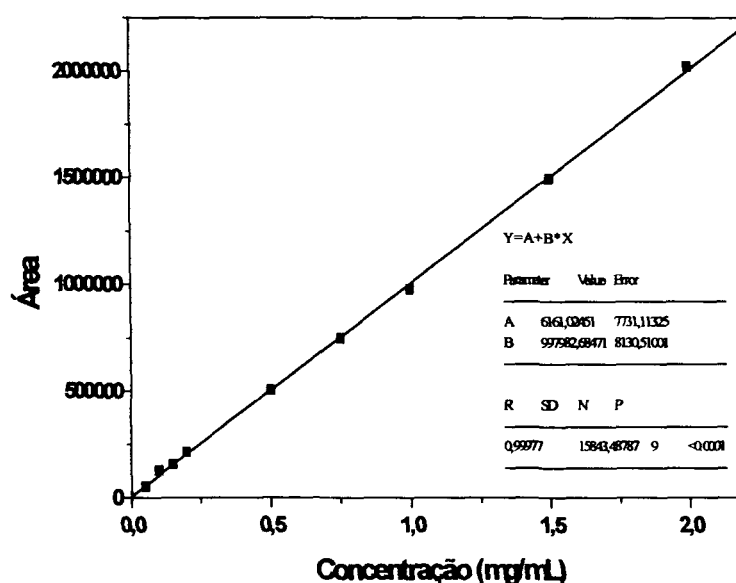


Figura 9. Curva de Calibração do Laurato de Etila por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

#### 4.8.1. Determinação de Proteínas

A dosagem de proteínas no extrato enzimático em meio aquoso foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), sendo a concentração de proteínas calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA, Sigma).

#### 4.8.2. Determinação da Atividade Lipolítica

A determinação da atividade lipolítica do extrato enzimático aquoso foi feita por três diferentes métodos descritos a seguir, de acordo com o meio reacional e o tipo de reação a ser estudada.

##### 4.8.2.1. Dosagem de atividade em meio aquoso

###### a) Método da Hidrólise do pNPP

Este método espectrofotométrico, utilizado ao longo de todo trabalho, foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado por Lima (2000). Este, baseia-se na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactante a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do p-nitrofenol, de coloração amarela, é monitorada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 mMol/min de p-nitrofenol. O coeficiente de extinção molar do pNPP, calculado a partir de uma curva de calibração com p-nitrofenol ( $1,29 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura.

###### Soluções Utilizadas:

- Solução A: palmitato de p-nitrofenila (pNPP) em isopropanol, em uma concentração de 3 mg/mL.
- Solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em tampão fosfato pH 8,0, 50 mM.

###### Procedimento:

Foram misturados 1 mL da solução A com 10 mL da solução B, lentamente e sob contínua agitação. A mistura foi feita imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é instável quando em meio aquoso. Desta solução foram colocados 2,7 mL em uma cubeta. Estabilizada a temperatura a 37 °C, foi adicionada a solução de enzima (0,3 mL) ou de tampão, quando se preparou o branco. A reação foi feita em cubeta de 3,0 mL, e a leitura feita sempre contra um branco

contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a 37 °C e pH 8,0. Utilizou-se o tampão fosfato 50 mM, a não ser quando indicado no próprio experimento. A reação foi acompanhada por 1 min.

#### b) Método Titulométrico

A determinação de lipases por titulometria foi baseada no método proposto por Stuer *et al.* (1986), e modificado por Lima (2000). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase sobre os triacilgliceróis presentes no substrato.

#### Reagentes:

- Tampão fosfato 50 mM pH 8,0
- Trietanolamina
- Trioleína
- NaOH 50 mM
- Etanol-acetona 1:1 (v/v)

#### Procedimento:

Preparou-se uma emulsão com 20 % (m/v) de trioleína, 6 % (m/v) de trietanolamina e 74 % (v/v) de tampão fosfato pH 8,0, 50 mM, mantendo em agitação por 30 min. A 5 mL da emulsão adiciona-se 0,5 mL de água destilada e mantém-se a 37 °C por 10 min. A seguir, a emulsão assim preparada é incubada com 0,5 mL de amostra por 20 min a 37 °C. Decorrido o tempo de incubação, adiciona-se 16 mL de uma solução de etanol-acetona (v/v) e titula-se com NaOH 50 mM. A atividade enzimática (U/mL) foi calculada de acordo com a equação 4:

$$U/mL = \Delta V/20 \times 50 \times 2 \times fc \quad (4)$$

Sendo  $\Delta V$  = volume de NaOH gasto na titulação, 20 = tempo de reação em minutos, 50 = concentração de NaOH (mM), 2 = correção de volume de amostra de 0,5 mL para 1,0 mL,  $fc$  = fator de correção da solução de NaOH.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a concentração de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto e por mL de solução enzimática.

#### 4.8.2.2. Dosagem de atividade em sistema micelar

##### a) Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry-Tinsley (1976) é um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons cobre II e os ácidos graxos livres, solúveis em fase orgânica. Este método foi utilizado para quantificar os ácidos graxos produzidos em reações de hidrólise e em reações de síntese. Neste último caso, determinou-se o desaparecimento do ácido graxo do meio reacional através de seu teor residual, durante a síntese do ésteres catalisada pela enzima.

O ensaio-padrão de atividade foi realizado em um reator com um banho de aquecimento (30 °C), utilizando-se 8 mL do meio micelar com o  $W_o$  requerido no experimento, solução tampão 50 mM (branco) ou solução tampão com enzima, e 2 mL de trioleína.

##### Procedimento:

Foram adicionados 0,2 mL da amostra a ser analisada em tubos de ensaio contendo 2,3 mL de tolueno. Após agitação em vórtex por 20 seg, adicionou-se o reativo de cor (0,5 mL), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5 %), cujo pH (6,0-6,2) foi acertado previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex por 20 seg e centrifugada por 10 min a 3000 g para separação das fases. A absorvância da fase orgânica foi lida a 715 nm, sendo a reação seguida por 5 min, tirando-se as amostras a cada minuto. Os cálculos de concentração tiveram por base a curva de calibração do ácido graxo (ácido oléico ou butírico, Sigma, 100 % de pureza), que foi feita nas mesmas condições dos ensaios de atividade, ou seja, em soluções micelares (100 mM AOT/isooctano) contendo tampão e o ácido graxo. Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) em reações de hidrólise foi definida como 1  $\mu$ mol de ácido graxo produzido por minuto e por mL da solução enzimática, nas condições do ensaio. Nas reações de síntese, a atividade foi definida como 1  $\mu$ mol de ácido graxo consumido por minuto e por mL da solução enzimática, nas condições do ensaio. Os cálculos de concentração foram feitos a partir de curva de calibração do ácido láurico (Sigma, 99 % de pureza).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA: ATIVIDADE EM MEIO AQUOSO E SISTEMA MICELAR

A atividade lipolítica do extrato enzimático aquoso foi determinada segundo três métodos: método da hidrólise do pNPP; método titulométrico e de método de Lowry-Tinsley, os resultados são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase 100 L) frente a diferentes substratos e métodos.

Substrato	Método	Condições do ensaio	Atividade Volumétrica (U/mL)*	Atividade Específica (U/mg)
PNPP	Espectrofotométrico (Meio aquoso)	37 °C; pH 8,0; goma arábica e Triton X100	44,2	24,8
Trioleína	Titulométrico (Meio aquoso)	37 °C; pH 8,0; trietanolamina	230,0	126
Trioleína	Espectrofotométrico (Sistema micelar)	37 °C; pH 8,0; Wo 15; AOT/isoctano	2163,0	1717
Tributirina	Espectrofotométrico (Sistema micelar)	37 °C; pH 8,0; Wo 15; AOT/isoctano	1804,4	1500

\* U/mL da solução enzimática

Os melhores resultados foram obtidos no sistema micelar, para a hidrólise da trioleína, com uma atividade específica de 1717 U/mg e para a hidrólise da tributirina, com uma atividade específica de 1500 U/mg.

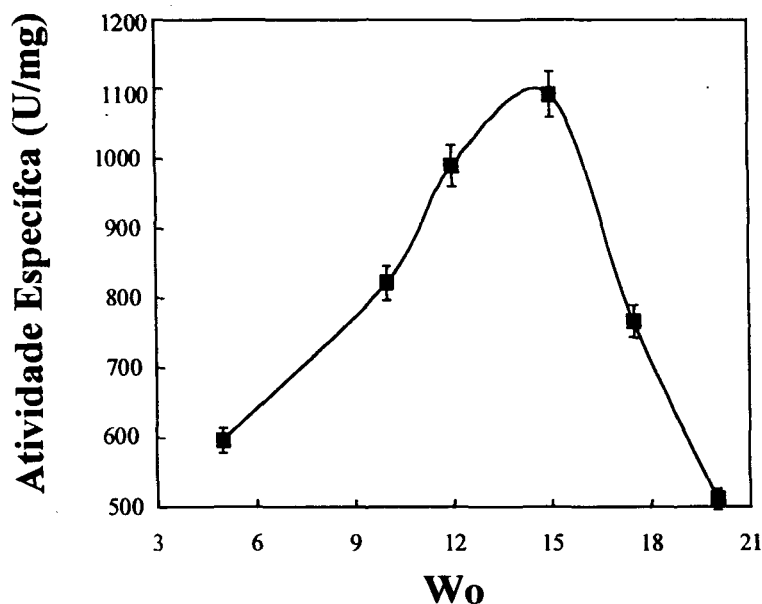
Embora a interpretação dos resultados seja dificultada pelas diferenças inerentes aos próprios métodos, pode-se dizer que estes resultados de atividade confirmam as vantagens dos sistemas micelares relativas à atividade lipolítica. A microencapsulação de lipases em micelas reversas, além de proporcionar um ambiente adequado para a enzima, proporciona a existência de uma grande área interfacial, e torna possível a solubilização de substratos hidrofóbico e hidrofílicos.

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosa* EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE

### 5.2.1. Efeito do Parâmetro $W_o$

O efeito do parâmetro  $W_o$  na velocidade de hidrólise da trioleína pela lipase de *T. lanuginosa* foi investigado numa faixa de 5 a 20, a pH 7,0 e 30 °C de temperatura. A concentração da enzima foi mantida constante relativamente ao volume total da solução micelar para os diferentes valores de  $W_o$  estudados. Os resultados estão apresentados na Figura 10.

A lipase de *T. lanuginosa* apresentou um perfil de atividade em função do  $W_o$  tipicamente na forma de sino, com atividade máxima em  $W_o$  de 15 (1092,4 U/mg). Era de se esperar uma atividade maior da enzima com o aumento do teor de água no sistema, mas a partir de  $W_o$  de 17,5, tornou-se difícil a formação de micelas, o que pode ter prejudicado a ação catalítica da enzima.



**Figura 10.** Efeito do parâmetro  $W_o$  na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT (100 mM) em isooctano. Condições do ensaio: concentração de trioleína: 166 mM; tampão fosfato 50 mM pH 7,0; 30 °C de temperatura; [enzima] = 77,04  $\mu$ g/mL de solução micelar.

Este perfil na forma de sino, com atividades máximas para valores de  $Wo$  entre 10 e 15, tem sido relatado em literatura para uma variedade de lipases produzidas por fungos filamentosos em sistema de micelas reversas e sistema bifásico. Entretanto, Crooks et al. (1995 a), estudando a mesma enzima deste trabalho, em sistema de AOT (200 mM) em n-heptano, encontraram um  $Wo$  ótimo de 5 para a hidrólise do pNPC<sub>4</sub> (butirato de p-nitrofenila). Esta diferença pode ser atribuída às diferentes condições utilizadas pelos autores.

O valor de  $Wo$  ótimo para a atividade catalítica pode ser atribuído a muitos fatores e está comumente relacionado na literatura com uma situação onde a cavidade interna da micela é compatível com o tamanho da enzima (Martinek et al., 1989).

Para verificar se o tamanho das micelas no  $Wo$  ótimo encontrado era compatível com o tamanho da proteína, foram calculados o raio da proteína e da micela. O raio da micela foi calculado a partir da equação (3), citada anteriormente e proposta por Luisi et al. (1988) e Ruckenstein e Karpe (1991):

$$r_m (\text{Å}) = 1,64 Wo \quad (3)$$

onde:  $r_m$  = raio micelar médio

O raio da proteína foi calculado a partir de sua massa molecular de 39 kDa (Omar et al., 1987), de acordo com a equação (4) empírica, proposta por Levashov (1987, citado por Kabanov et al., 1991):

$$r_p (\text{Å}) \approx 0,7 (M_p)^{1/3} \quad (4)$$

onde:  $r_p$  (Å) = raio da proteína;

$M_p$  = massa molecular da proteína, em Da.

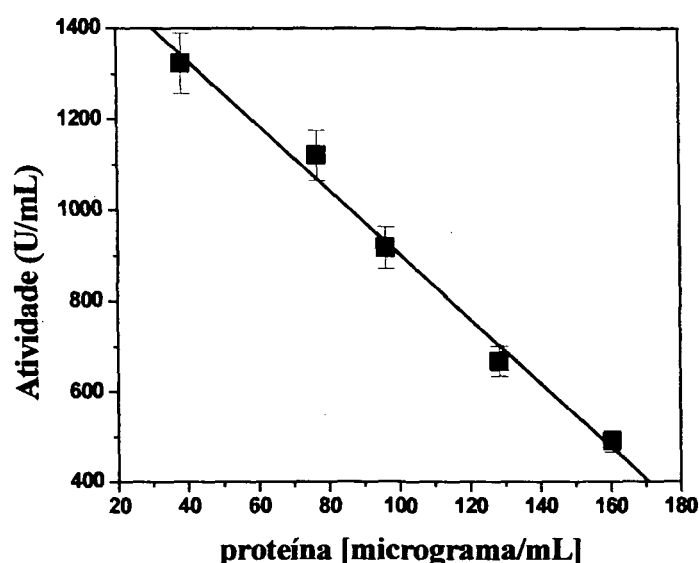
Neste caso, o raio micelar, calculado a partir da equação (3) foi de 24,6 Å e o raio desta proteína, calculado a partir da equação (4) foi de 23,7 Å e confirmando as conclusões de Martinek et al. (1989): o raio da enzima é ligeiramente menor do que o raio micelar, em  $Wo$  15, ótimo para atividade.

A existência de um  $Wo$  ótimo para a velocidade de reação também pode estar relacionada com as modificações conformacionais da enzima e modificações

no estado da água presente no interior das micelas, conforme relatado em literatura (Melo *et al.*, 1995; Creagh *et al.*, 1993; Prazeres *et al.*, 1992; Castro e Cabral, 1989; Han e Rhee, 1986). Além disso, efeitos difusionais também podem afetar  $W_o$  ótimo para a atividade conforme proposto por Castro e Cabral (1989). Se o substrato é hidrofílico, altos valores de  $W_o$  aumentam a camada de água que circunda a enzima no interior da micela, diminuindo o contato da enzima com o seu substrato e, conseqüentemente, a atividade catalítica. Presume-se, também que há um aumento da área interfacial com o  $W_o$  (Han e Rhee, 1986), o que significaria uma maior quantidade de substrato disponível para a enzima, com o aumento deste parâmetro, até um máximo, quando os efeitos negativos para a atividade enzimática passariam a sobrepor-se aos positivos.

### 5.2.2. Efeito da Concentração da Proteína

O estudo do efeito da concentração da proteína na atividade foi realizado variando-se a concentração de 38,5 até 160,5  $\mu\text{g/mL}$  de proteínas no sistema micelar.



**Figura 11.** Efeito da concentração da enzima na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT (100 mM) em isooctano. Condições do ensaio: concentração de trioleína: 166 mM; tampão fosfato 50 mM pH 7,0; e 30 °C de temperatura;  $W_o = 15$ .

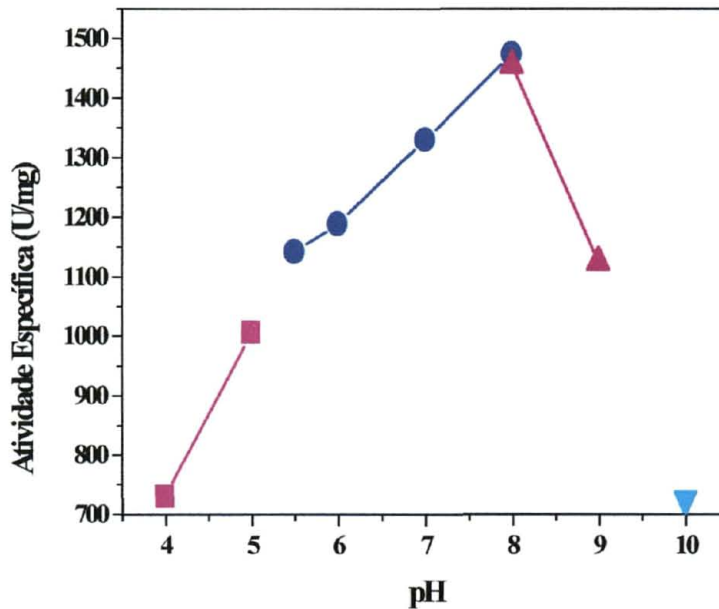
Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que, dentro da faixa de concentração estudada, houve um aumento da atividade volumétrica com a diminuição da concentração de proteínas no sistema. A atividade máxima (1350 U/mL) foi obtida com a menor concentração de enzima (38,5 µg/mL).

Este resultado é oposto ao encontrado para enzimas em fase aquosa, mas é constantemente relatado para as enzimas encapsuladas em micelas reversas. Em sistemas aquosos, a atividade volumétrica aumenta com o aumento da concentração de proteínas e a atividade específica permanece constante. As reações catalisadas por lipases dependem da formação do complexo enzima-substrato na interface do sistema. Assim, pressupõe-se que no sistema micelar a enzima esteja posicionada na interface da micela com o solvente orgânico, cuja área é limitada. Portanto, um aumento da concentração da proteína no sistema iria aumentar a concentração da enzima na “piscina” aquosa, sem necessariamente influir na catálise da reação, o que poderia explicar os resultados obtidos acima. Melo *et al.* (1995b) também verificaram, por espectrofotometria de fluorescência, que a diminuição da atividade de uma cutinase recombinante no sistema de micelas reversas AOT com atividade lipolítica com o aumento da concentração da enzima, era devida a alterações estruturais da enzima, causadas pela sua interação com o tensioativo AOT.

### 5.2.3. Efeito do pH da Fase Aquosa

O efeito do pH da fase aquosa na atividade da lipase de *T. lanuginosa* foi estudado na faixa de 4,0 até 10,0, usando diferentes soluções-tampão (acetato pH 4,0-5,0; fosfato pH 5,5-8,0; Tris-HCl, pH 8,0-9,0 e glicina, pH 10,0). Os resultados obtidos para este parâmetro estão apresentados na Figura 12.

A atividade máxima (1474 U/mg) foi obtida em tampão fosfato pH 8,0. Este resultado é um pouco diferente do perfil de atividade frente ao pH da enzima em meio aquoso, que apresenta atividade máxima numa faixa de pH entre 7-11, com o valor máximo em pH 11 (Boletim Novozyme A/S-Bagsvaerd-Denmark). É também diferente dos obtidos por Crooks *et al.* (1995 a), que estudando a mesma enzima em sistema AOT 200 mM em n-heptano, obtiveram pH ótimo de 9,3 para a hidrólise do pNPC<sub>4</sub>, e 10,4 para a hidrólise da tributirina em meio aquoso.



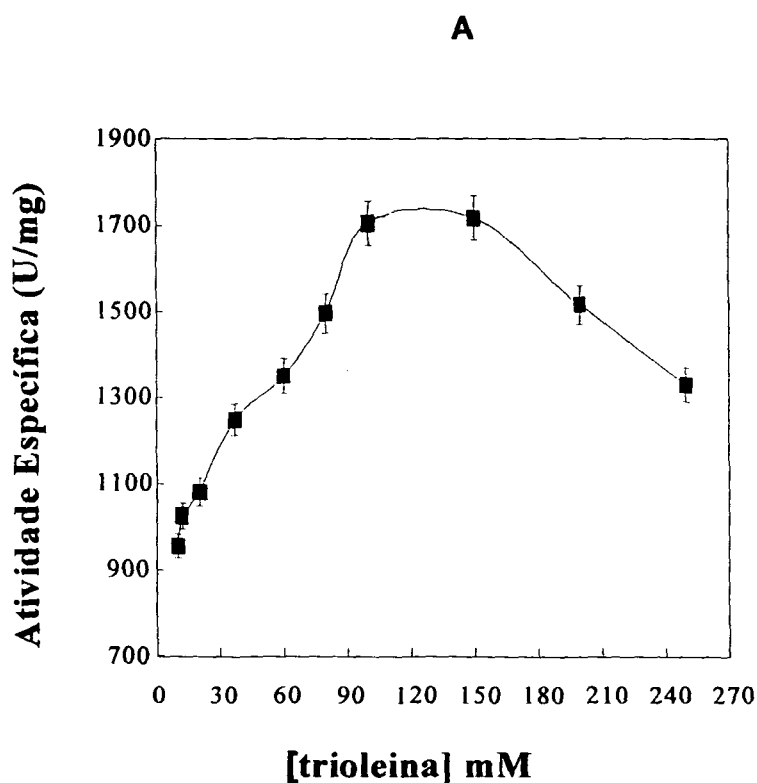
**Figura 12.** Efeito do pH sobre a atividade lipolítica da lipase de *Thermomyces lanuginosa*. Condições do ensaio: Concentração de trioleína 166 mM;  $W_o$  de 15; [enzima] = 38,5 $\mu$ g/mL de solução micelar;; temperatura de 30 °C; tampões 50 mM: (-■-) acetato (4,0, 5,0); (-●-) fosfato (5,5, 6,0, 7,0, 8,0); (-▲-) Tris-HCl (8,0, 9,0) e (-▼-) glicina (10,0).

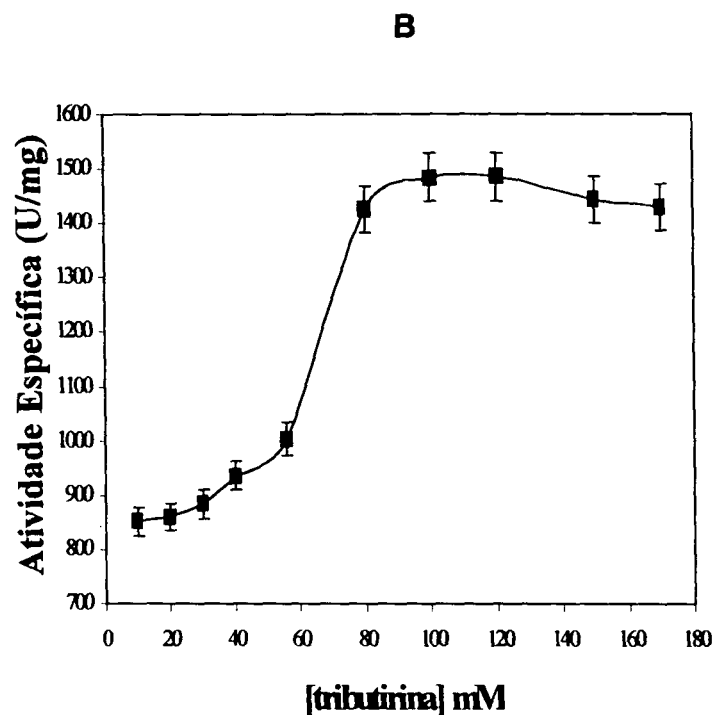
Muitas enzimas apresentam comportamentos similares em meio micelar e em meio aquoso (Luisi e Magid, 1986). Entretanto, a principal diferença entre os dois sistemas é referente ao efeito do parâmetro  $W_o$  inexistente para o sistema aquoso, de grande influência no sistema micelar, podendo causar comportamentos bastante diferenciados para as enzimas encapsuladas em micelas reversas (Melo *et al.*, 1995b). Nos estudos do efeito do pH, geralmente assume-se que o pH da piscina aquosa no sistema de micelas reversas corresponde ao pH da solução enzimática a partir da qual a micela foi preparada. Mas, o pH real dentro da micela pode ser diferente daquele esperado, devido aos efeitos de partição das espécies iônicas, o que poderia explicar em parte os resultados aqui obtidos (Chen e Chang, 1993).

#### 5.2.4. Efeito da Concentração dos Substratos

O efeito da concentração de substrato foi estudado utilizando-se a trioleína e tributirina como substratos, tampão fosfato 50 mM pH 8,0, temperatura de 30 °C, e  $W_0$  de 15 e os resultados estão mostrados na Figura 13.

A atividade específica máxima foi obtida com a concentração de 150 mM de trioleína (1717 U/mg) e 120 mM de tributirina (1500 U/mg). As lipases encapsuladas em micelas reversas podem apresentar um comportamento frente ao substrato dito de "Michaelis-Menten", ou seja, essas enzimas exibem uma dependência hiperbólica de  $v_0$  (velocidade inicial) em relação à concentração de substrato. Entretanto, como pode ser observado na Figura 13, este comportamento não foi observado para ambos os substratos estudados, sendo verificada uma inibição da atividade enzimática com concentrações acima de 150 mM de trioleína.





**Figura 13.** (A) Efeito da concentração da trioleína e (B) efeito da concentração da tributirina na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT (100 mM) em isooctano. Condições do ensaio: temperatura de 30 °C; tampão fosfato 50 mM pH 8,0; [enzima] = 38,5 µg/mL da solução micelar e  $W_o = 15$ .

Esta inibição pode ser causada pela influência direta do substrato sobre a lipase ou pela mudança induzida do substrato na estrutura micelar. Além disso, os triglicerídeos podem agir como co-surfactantes e causar um decréscimo no tamanho da micela independentemente do valor de  $W_o$  (Carvalho e Cabral, 2000a).

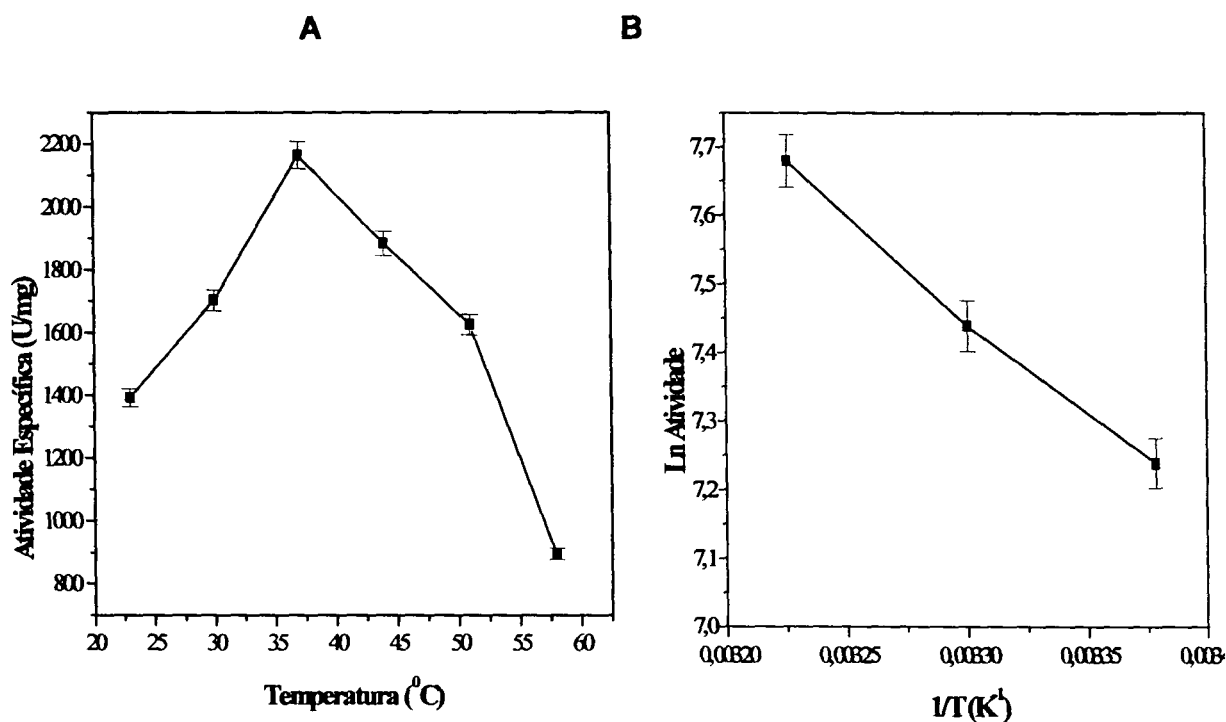
O comportamento da Lipolase apresentado neste experimento não é muito diferente do encontrado em literatura para outras lipases. Castellar *et al.* (1996) obtiveram uma atividade máxima (10733 U/mg) com concentração de 180 mM de trioleína e acima desta concentração a enzima foi inibida para a lipase de *C. viscosum*. Krieger *et al.* (1997, 1995) relataram inibição com concentração acima de 120 mM para a tributirina e 180 mM para a trioleína, usando uma lipase de *Penicillium citrinum* em sistema de micelas reversas AOT/isooctano (100 mM).

### 5.2.5. Efeito da Temperatura e Estabilidade à Temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica foi investigado em uma faixa de temperatura de 23 a 58 °C, usando tampão fosfato pH 8,0 50 mM e  $W_o$  de 15. Atividades relativamente altas foram encontradas numa faixa de 30 a 51 °C (Figura 14), com a máxima de 37 °C (2163,6 U/mg). Comparando-se estes valores com os relatados pelo fabricante para a fase aquosa (faixa de atividade máxima entre 30 e 40 °C), observa-se um deslocamento da faixa para 37 e 51 °C.

A velocidade de uma reação química está relacionada com a energia de ativação ( $E_a$ ): quanto mais alta a  $E_a$ , menor é a velocidade com que esta ocorre. A partir dos resultados do efeito da temperatura, a energia de ativação ( $E_a$ ) da reação de hidrólise da ligação éster da trioleína pode ser calculada, a partir da equação de Arrhenius, em de 18,05 kcal/mol. Diversos são os resultados relatados em literatura para sistemas semelhantes. Prazeres *et al.* (1992), encontraram um valor de  $E_a$  menores (4,7 kcal/mol) para a hidrólise da trioleína pela lipase de *C. viscosum* em sistema de micelas reversas em AOT/isooctano e 2,4 kcal/mol no sistema bifásico. Chen e Chang (1993) encontraram um valor de  $E_a$  maior (33 kcal/mol) para a hidrólise do óleo de oliva pela lipase de *C. cylindracea* em sistema de lecitina de soja/isooctano. Crooks *et al.* (1995 b) encontraram valores de  $E_a$  de 13 kcal/mol para a hidrólise do pNPC<sub>4</sub> (p-nitrofenilbutirato) em sistema de microemulsões AOT/n-heptano pela lipase de *T. lanuginosa*, e 15 kcal/mol para a hidrólise da tributirina pela mesma enzima no mesmo sistema.

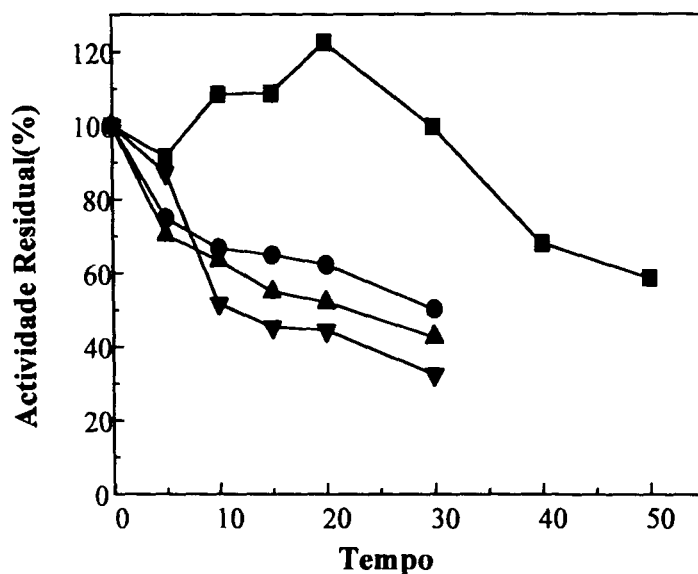
Muitas reações químicas ocorrem a uma velocidade maior com o aumento da temperatura. As reações catalisadas por enzimas tem o mesmo tipo de comportamento, até um limite, onde o aumento da temperatura causa um aumento no número de choques que é suficiente para desnaturar a proteína, pela modificação de sua estrutura resultando em alterações na atividade catalítica. Neste ponto, o efeito da desnaturação sobrepõe-se ao aumento de atividade, causando uma diminuição da velocidade de reação (Krieger, 1995). Portanto, pode-se sugerir que o sistema de micelas reversas, por propiciar um ambiente onde o teor de água é restrito, torna a enzima mais estável, com conseqüente aumento da temperatura da faixa ótima para a atividade.



**Figura 14.** (A) Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT (100 mM) em isooctano e (B) representação de Arrhenius para a determinação da energia de ativação  $E_a$ . Condições do ensaio: Concentração de trioleína: 150 mM; tampão fosfato 50 mM pH 8,0; [enzima] = 38,5  $\mu\text{g/mL}$  de solução micelar e  $W_o = 15$ .

A estabilidade da enzima no sistema micelar frente à temperatura foi investigada em uma faixa de temperatura de 30 a 60 °C, usando tampão fosfato pH 8,0 50 mM e  $W_o$  de 15 em diferentes tempos de incubação. A Figura 15 apresenta os perfis de decaimento da atividade catalítica em função do tempo e da temperatura.

A 30°C a enzima apresentou ativação (de aprox. 20 %) com 20 min de incubação, com um tempo de meia-vida calculado em aproximadamente 60 min. Os tempos de meia vida para as outras temperaturas foram de 30 min (37 °C), 20 min (50 °C) 10 min (60 °C). Portanto, a enzima não se mostrou particularmente estável no sistema micelar, em comparação ao sistema aquoso. Conforme o fabricante, a enzima é estável a 40 °C e 55 °C, com aproximadamente 95 % de atividade residual após 2 h de incubação, e a 60°C apresenta 80 % de atividade residual no mesmo tempo de incubação (tributirina, pH 8,0) (Boletim Novozyme A/S-Bagsvaerd-Denmark).



**Figura 15.** Efeito da temperatura entre 30 e 60 °C sobre a atividade da da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em micelas reversas de AOT em 100 mM de Isooctano. Condições do ensaio: Concentração de trioleína: 150 mM; temperaturas 30 °C (■), 37 °C (●), 50 °C (▲), 60 °C (▼); tampão fosfato 50 mM pH 8,0; [enzima] = 38,5 µg/mL de solução micelar e  $W_o$  de 15.

### 5.3. ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES

#### 5.3.1. Estudos Prévios

Foram realizados estudos prévios para a verificação de síntese de ésteres empregando diferentes álcoois e ácidos. Inicialmente, foram testados como substratos os álcoois etanol, propanol e butanol e os ácidos etanóico, propanóico, butírico e láurico (dodecanóico) verificando-se a capacidade de síntese da lipase, com relação a diferentes comprimentos de cadeia do álcool e do ácido. As reações foram realizadas a 37 °C,  $W_o$  de 5, tampão fosfato 50 mM pH 8,0. Os ensaios preliminares mostraram que a enzima catalisou apenas a síntese do ácido láurico (100 mM) com etanol (250 mM). O rendimento desta reação foi de 50 % num intervalo de tempo de uma hora. A atividade específica foi de 65,7 U/mg.

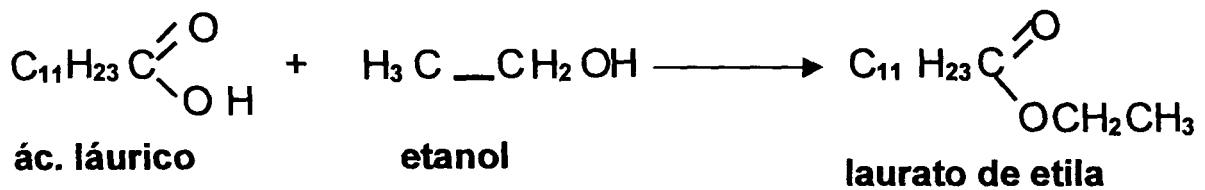


Figura 16. Reação de formação do éster laurato de etila.

A síntese do laurato de etila foi então escolhida como a reação modelo. Além de possibilitar o estudo do comportamento da enzima relativamente à síntese de ésteres, o laurato de etila tem vantagens, como o fato de seu ácido poder ser obtido com abundância e a baixo custo em nosso país, a partir do óleo de babaçú. Além disso, os ésteres de ácido láurico como os lauratos de etilas, butilas e isoamilas são produzidos e comercializados como atenuadores de aromas de frutas na Europa (Macedo e Pastore, 1997). Os ésteres derivados de ácidos carboxílicos de cadeia longa também são componentes de muitos produtos industriais como cosméticos, lubrificantes e flavorizantes. Além disto, estes compostos são encontrados em combustível fóssil e em atmosfera poluída, e portanto, desempenham uma função importante nos estudos do meio ambiente (Hawthorne *et al.*, 1986).

### 5.3.2. Otimização das Condições de Síntese do Laurato de Etila

A Tabela 10 apresenta os resultados experimentais do delineamento fatorial aplicado no estudo da síntese do laurato de etila, bem como, as variáveis e níveis estudados. A Tabela 11 apresenta os efeitos das variáveis, calculados a partir da Tabela 10.

**Tabela 10.** Resultados experimentais do delineamento fatorial aplicado no estudo da síntese do éster laurato de etila.

Experimentos	Wo	pH	Temperaturas (°C)	R. M. álcool: ácido	Atividade Específica (U/mg) a 60 min	Rendimentos a 60 min (%)
1	5	5,6	30	3	198	83
2	10	5,6	30	5	220	92
3	5	10	30	5	81	32,5
4	10	10	30	3	85	37
5	5	5,6	45	5	220	91
6 (triplicata)	10	5,6	45	3	197 +/- 10	73 +/- 2
7	5	10	45	3	-	-
8	10	10	45	5	-	-

\* R.M = razão molar

**Tabela 11.** Valores dos efeitos das variáveis importantes do planejamento fatorial sobre a atividade da *T. lanuginosa* e nos rendimentos do laurato de etila.

Variáveis	Efeitos	
	Atividades específicas	Rendimentos
Wo	+ 0,8 +/- 10	- 1 +/- 2
pH	- 167,5 +/- 10	- 67 +/- 2
Temperatura	- 42 +/- 10	- 20 +/- 2
R.M.	+ 10 +/- 10	+ 6 +/- 2
pH x T	- 41,3 +/- 10	- 14,7 +/- 2

A partir dos resultados obtido na Tabela 10, foi possível ter uma visão mais adequada do sistema e, portanto, calcular, o desvio padrão relativo (DPR), que foi de  $\pm 10$  para a atividade específica e  $\pm 2$  para o rendimento da reação.

Para medir como cada variável influenciou a reação, foi calculado em termos

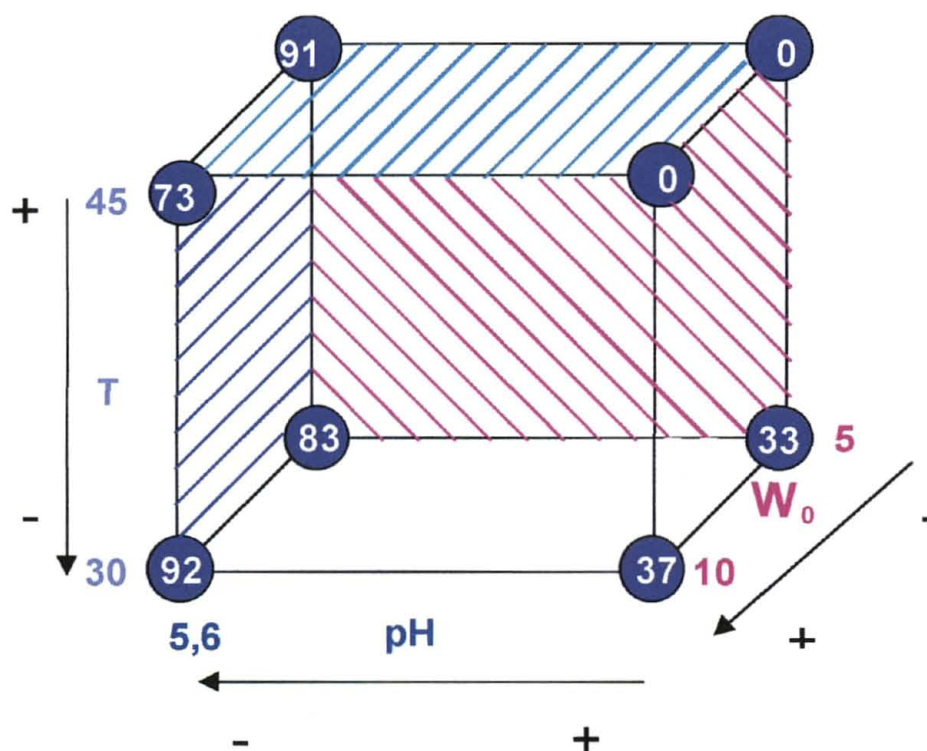
de atividade específica (U/mg) e rendimento da reação (%), o quanto cada variável contribuiu para a formação do éster. Para tal, fez-se o uso do esquema de sinais da Tabela 8b (item 4.5.2, Materiais e Métodos) atribuindo a cada valor de atividade e rendimento do éster o sinal correspondente a cada uma das condições ali modeladas. Em seguida, procedeu-se a somatória dos valores respeitando os sinais atribuídos e o resultado foi dividido por quatro, que corresponde ao número de combinatórios de cada variável.

Em primeira análise, é possível observar que as variáveis  $W_0$  e R.M não apresentaram nenhuma influência em ambas respostas monitoradas, pois os valores dos efeitos foram inferiores (+0,8 e +10) ao desvio padrão característico das correspondentes variáveis –resposta. Entretanto, o efeito provocado pela variável pH sobre as respostas é significativo (- 167,5 e - 67), em relação à atividade específica e rendimento de reação, respectivamente. Segundo os resultados calculados a partir dos dados experimentais, quando o pH passa de 5,6 (nível menos) para 10, (nível mais) a resposta atividade específica apresenta um decréscimo médio de 167,5 unidades. Utilizando-se o rendimento da reação como resposta, encontra-se um efeito similar: pelo aumento do pH o rendimento decresce 67 %. Desta forma, para maximizar qualquer uma destas duas respostas, levando-se em consideração apenas o parâmetro pH, baixos valores de pH são recomendados.

O efeito da temperatura também foi significativo. Os valores dos efeitos calculados para este parâmetro foram de - 42 e - 20, em relação à atividade específica e rendimento de reação, respectivamente. Levando-se em consideração a atividade específica, é possível concluir que, quando a temperatura é mudada do nível menos (30 °C) para o nível mais (45 °C), o sistema apresenta um decréscimo médio de 42 unidades. Novamente, o comportamento com relação ao rendimento da reação é similar. Desta forma, para maximizar qualquer uma destas duas respostas, levando-se em consideração apenas o parâmetro temperatura, valores de temperatura baixos são recomendados.

Analisando-se o efeito de segunda ordem, ou seja, aquele resultante da interação entre duas variáveis, verifica-se que este apresenta um valor bastante expressivo (- 41,3) para a interação pH e temperatura. Isto faz com que estas duas variáveis devam ser analisadas em conjunto. Para facilitar esta análise, uma representação geométrica do sistema envolvendo as duas variáveis é apresentada

na Figura 17. Em primeiro lugar, é relativamente fácil observar, a partir desta representação, que as melhores condições de síntese estão representadas por um pH de 5,6 e temperatura de 30 °C (vértice inferior esquerdo). Por outro lado, uma análise mais detalhada desta representação evidencia o elevado grau de interdependência existente entre estas variáveis. Quando a reação é realizada a 30 ou 45 °C, o rendimento da reação diminui bruscamente com aumento do pH utilizado. Na Figura 17, verifica-se, portanto, que os melhores rendimentos de reação são obtidos com menores valores de pH e temperatura, prevendo-se uma atividade específica de 220 U/mg e um rendimento de 92%, para um pH de 5,6 e temperatura de 30 °C.



**Figura 17.** Efeito da temperatura entre 30 °C (nível -) e 45 °C (nível +) e pH entre 5,0 (nível -) e 10,0 (nível +) no rendimento da síntese do laurato de etila catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosa* em sistema de micelas reversas AOT/Isooctano. Condições: 60 minutos de reação.

Em seguida, foi realizado um novo planejamento fatorial  $2^{4-1}$ , fixando-se as variáveis que não causaram um efeito significativo nas respostas:  $W_0$  em 10 (nível +) e a razão molar em 5 (nível +), variando-se pH e temperatura. Este planejamento foi realizado para confirmar os resultados obtidos através do primeiro planejamento

fatorial (Tabelas 10 e 11). Os resultados deste novo planejamento estão apresentados na Tabela 12 e 13.

**Tabela 12.** Resultados experimentais do segundo delineamento fatorial aplicado no estudo da síntese do laurato de etila, mantendo-se constantes  $W_0$  10 e R.M 5.

Experimentos	pH	Temperaturas (°C)	Atividade Específica (U/mg) 60 min.	Rendimento a 60 min (%)
1	5,6	30	170	89
2	10	30	69	28
3	5,6	45	-	-
4	10	45	-	-
5 (duplicata)	5,6	30	175 +/- 6	90 +/- 2

**Tabela 13.** Valores dos efeitos das variáveis importantes do planejamento fatorial sobre a atividade da Lipolase o rendimento do laurato de etila.

Variáveis	Efeitos	
	Atividade específica	Rendimento
pH	- 26,5 +/- 6	- 31 +/- 2
Temperatura	- 122 +/- 6	- 59 +/- 2
pH x T	+ 53 +/- 10	+ 31 +/- 2

A Tabela 12 confirma os resultados que foram obtidos no primeiro planejamento fatorial, ou seja, que a máxima atividade é obtida com menores valores de pH (5,0) e temperatura (30 °C). Analisando-se a Tabela 13, a exemplo do que foi encontrado nos experimentos anteriores, é possível observar que as variáveis pH e temperatura apresentaram influência em ambas respostas monitoradas, apresentando valores de efeitos superiores ao desvio padrão característico apresentado pelas correspondentes ferramentas analíticas. Os efeitos

provocados pelo parâmetro pH foram de -26,5 e -31 e os da temperatura foram de -122 e -59, em relação à atividade específica e rendimento de reação, respectivamente.

As melhores condições de obtenção do éster são idênticas às obtidas no delineamento anterior, com respostas previstas em termos de rendimento de éster em 89 % e atividade específica de 170 U/mg.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a variável  $W_o$  normalmente de grande importância na catálise enzimática em sistemas micelares, não apresentou efeito significativo na síntese do laurato de etila. Era de se esperar que um menor  $W_o$  favoreceria a síntese, pois deslocaria o equilíbrio termodinâmico da reação no sentido da síntese. Este resultado poderia ser explicado pela faixa de  $W_o$  estudada, que não seria suficientemente ampla para causar um efeito significativo. Além disso, a não participação da água na reação poderia estar relacionada com o fato das suas moléculas se encontrarem envolvidas em interações com o tensioativo, possuindo uma atividade termodinâmica reduzida (Rao *et al.*, 1991). Este efeito ainda poderia ser atribuído à remoção do éster do local da reação, resultando num deslocamento contínuo do equilíbrio no sentido da síntese (Rao *et al.*, 1991); a um posicionamento do centro catalítico na interface, de algum modo protegido do contato com o microambiente aquoso (Hayes e Gulari, 1990).

A Tabela 14 apresenta diferentes reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases.

**Tabela 14.** Reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases em diferentes sistemas.

Fontes de Lipases	Sistemas	Condições	Reações	Rendimentos e Tempos das reações	Referências
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	AOT/isooctano	Wo 10; pH 5,6; 30 °C e R.M 5.	Esterificação ácido láurico e etanol	60 min	Este trabalho
<i>Rhizomucor miehei</i>	n-heptano	40 °C	Esterificação ácido acético e álcool isoamilico	95 % (72 horas)	Krishna <i>et al.</i> , 2001a
esterase de <i>Bacillus licheniformis</i>	n-heptano	45 °C	esterificação ácido capríco e etanol	95 % (7 dias)	Alvarez-Macarie e Baratti, 2000.
<i>Rhizopus delemar</i>	microemulsão lectina	Wo 4,5	esterificação ácido oleico e octanol	90 % (24 h)	Nagayama <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhizopus delemar</i>	microemulsão AOT	Wo 7,5	esterificação ácido oleico e octanol	90 % (24 h)	Nagayama <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhizomucor miehei</i>	microemulsão AOT/ n-heptano	Wo 10; 40 °C	esterificação ácido decanóico e octanol	-	Rees <i>et al.</i> , 1995 a,b
<i>Candida cylindracea</i>	n-hexano	30 °C	esterificação ácido láurico e etanol	98% (24 h)	Mustranta, 1995
<i>Candida cylindracea</i>	micelas reversas de AOT/isooctano	Wo 15	esterificação ácido palmítico e butanol, octanol e dodecanol	95-100 % (120-200 h)	Rao <i>et al.</i> , 1991
<i>Candida cylindracea</i>	micelas reversas de AOT/isooctano	Wo 8	esterificação ácido láurico e butanol	acima de 95 %	Hayes e Gulari, 1990

Comparando-se as melhores condições para a síntese para o laurato de etila ( $W_0$  10; pH 5,6; R.M 5,0; T 30 °C) com a literatura (Tabela 14), verifica-se que neste trabalho, além do rendimento de síntese ser elevado (em média 90 %), o tempo de reação de 60 minutos é bastante inferior ao normalmente relatado em literatura para a síntese de ésteres (Tabela 14). Além disso, pelos resultados aqui obtidos evidencia-se mais uma vantagem da biocatálise em relação à catálise química como o maior rendimento, a especificidade, regioseletividade e enantioseletividade, que permitem a catálise de reações com um número reduzido de subprodutos, com baixa geração de resíduos e condições brandas de temperatura e pressão (Del Río *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2000). Segundo Bello *et al.* (1987), a percentagem máxima de síntese de ésteres de álcoois primários, através de métodos químicos é de 67 %. Portanto, inferior à maioria dos rendimentos obtidos por via enzimática.

Os resultados aqui obtidos para a otimização das condições de síntese do laurato de etila utilizando delineamento fatorial são inéditos e de difícil interpretação e comparação com reações semelhantes apresentadas em literatura. Entretanto, ao analisar-se os resultados que apontaram para uma pequena interferência do  $W_0$  na atividade da enzima e rendimento da reação, o que é normalmente contrário ao relatado em literatura, e o valor de pH 5,6 que é pouco favorável a atividade enzimática, pode-se sugerir que os fenômenos de catálise no sistema de micelas são muito mais complexos, e envolvem, além das próprias variáveis, as interações entre elas e outros fatores como a difusão do substrato, a estabilidade da enzima e o tipo de água disponível para a sua atividade e estabilidade.

#### 5.4. CINÉTICA DA REAÇÃO DE BIOSÍNTESE DO LAURATO DE ETILA

Os resultados de síntese do laurato de etila, obtidos através do método de Lowry-Tinsley, foram confirmados por CLAE, através da cinética da reação catalisada pela Lipolase, nas condições otimizadas ( $W_0$  de 10, pH 5,6, temperatura de 30 °C e a razão molar álcool/ácido 5). Os resultados estão apresentados na Tabela 15 e no cromatograma em anexo.

**Tabela 15.** Rendimentos da cinética de reação de síntese do laurato de etila com amostras analisadas pelo Método de Lowry-Tinsley e por CLAE, com fator de correção aplicado.

Tempo (min)	Rendimentos da Reação (%)	
	Lowry- Tinsley	CLAE
0	0	0,1
10	27,0	25,7
20	45,6	41,3
40	69,8	58
50	71,0	59
60	91,8	93,3

Os resultados do ensaio padrão quantitativo para a determinação da perda do produto durante a purificação mostraram que, dos 131 mg de éster adicionados no meio reacional, 98 mg foram recuperados, correspondendo a 75 % de recuperação do éster após o processo de purificação. O rendimento obtido é relativamente baixo, o que indica a necessidade de otimização do processo de purificação. Aplicando-se a correção de perda de produto durante a purificação, por CLAE obtém-se um rendimento de 93,3 %, muito próximo ao obtido por Lowry-Tinsley (91,8 %). Este resultado valida os resultados obtidos nos delineamentos fatoriais pelo método espectrofométrico e portanto, também a utilização do método de Lowry-Tinsley para a determinação da capacidade de esterificação das lipases. O método não requer que a amostra seja previamente purificada, tornando-se mais simples, rápido e barato em relação à determinação de ácidos graxos por CLAE.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados neste trabalho para caracterização cinética da reação de hidrólise de triacilgliceróis pela lipase comercial de *T. lanuginosa* em micelas reversas mostraram que:

- A quantidade de água no sistema micelar, traduzida pelo parâmetro  $W_o$ , foi determinante para a atividade da enzima. A maior atividade enzimática foi obtida em  $W_o$  de 15 (1092,4 U /mg);
- A concentração de proteínas no meio micelar também foi importante, sendo que houve uma diminuição da atividade com o aumento da concentração de proteínas no sistema. A maior atividade enzimática (1400 U/mL e 1200 U/mg) foi obtida com a menor concentração de proteína (38,5  $\mu$ g/mL);
- A atividade enzimática máxima (1474,3 U /mg) foi obtida em tampão fosfato 50 mM pH 8,0;
- A atividade específica máxima foi obtida com a concentração de 150 mM (1717 U/mg) de trioléina e 120 mM de tributirina (1500 U/mg), sendo que para ambos os substratos a enzima não mostrou um comportamento de Michaelis-Menten;
- A temperatura ótima para a atividade foi de 37 °C (2163,6 U /mg), sendo que a enzima apresentou atividades elevadas numa faixa de 30 a 51 °C;
- A energia de ativação ( $E_a$ ) calculada para a reação de hidrólise da trioleína foi de 18,05 Kcal/mol.
- Com relação à estabilidade da enzima à temperatura, a 30°C apresentou ativação de aprox. 20 %, com 20 min de incubação, com tempo de meia-vida calculado em aproximadamente 60 min. Os tempos de meia vida para as outras temperaturas foram de 30 min (37 °C), 20 min (50 °C) 10 min (60 °C).

Com relação aos experimentos realizados para a otimização dos parâmetros da reação de síntese de ésteres pela lipase de *T. lanuginosa*:

- Verificou-se em estudos prévios que a enzima catalisou apenas a síntese do laurato de etila;
- As principais variáveis que influenciaram na síntese do laurato de etila no

sistema de micelas reversas AOT/Isooctano foram: pH = 5,6 e t = 30 °C.

- As variáveis R.M. e  $W_o$  não mostraram nenhuma influência em ambas respostas monitoradas, apresentando valores de efeito inferiores ao desvio padrão.
- Nestas condições, a atividade específica prevista pelo delineamento fatorial foi de 220 U/mg e o rendimento de 92 %.
- O rendimento da cinética de reação na síntese do laurato de etila foi de 91,8 % para o método de Lowry-Tinsley e 93,3 % para o cromatográfico (CLAE).
- Os ensaios de purificação do éster mostraram uma recuperação de 75 %, sendo que este valor precisa ainda ser otimizado.
- O método de análise do éster por CLAE foi convenientemente desenvolvido e otimizado e validou os resultados obtidos pelo método de Lowry-Tinsley.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram esclarecer diversas questões associadas às reações de hidrólise e síntese de ésteres em sistema micelar. Trabalhos futuros poderão abordar temas como, por exemplo:

- Otimização do processo de purificação do éster, pois o rendimento obtido neste trabalho foi relativamente baixo.
- Investigação complementar da lipase de *T. lanuginosa* em micelas reversas: ensaios físico-químicos que possam esclarecer a estrutura micelar contendo a proteína, para tentar explicar os efeitos na catálise enzimática neste sistema.
- Comparação dos resultados obtidos no sistema de micelas reversas com o de outros sistemas aquo-restritos.
- Aplicação do sistema micelar em outras reações de síntese, com aplicações em fármacos e alimentos.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES-BARROS, M.R. "Extração Líquido-Líquido de Produtos Biológicos: Recuperação de Produtos de Fermentação (Ácidos Carboxílicos) e Proteínas". Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico. Lisboa, 1990.

AKESSON, B.; GRONOWITZ, S.; HERSLÖF, B.; MICHELSEN, P.; OLIVECRONA, T. "Stereospecificity of different lipases". *Lipids.*, 8, 313-318, 1983.

AKOH, C.C. "Enzymatic synthesis of acetylated glucose fatty acid esters in organic solvent". *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 71, 319-323, 1994.

AKOH, C.C.; MUTUA, L.N. "Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters: Effect of reaction parameters and the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids". *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 115-119, 1994.

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

AMAYA, C.L.; STUBBS, D.; MARAGONI, A.G. "A new assay for lipase activity in organic solvents. Lipase-catalyzed synthesis of octyl-linolenate in a hexane microaqueous reaction system". *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 131-135, 1995.

ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA ([http:// www anvisa.com.br/](http://www.anvisa.com.br/)).

ASAHARA, T.; MATORI, M.; IKEMOTO, M.; OTA, Y. "Production of two types of lipases with opposite positional specificity by *Geotrichum* sp. FO401B". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57 (3), 390-394, 1993.

BALCÃO, V.M.; ASMO, K.; MALCATA, F.X.; PAAVO, J.K. "Lipase-catalyzed

acidolysis of butterfat with oleic acid: Characterization of process and product". **Enzyme Microb. Technol.**, 23, 118-128, 1998.

BERGLUND, P.; HUTT, K. "Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases". In: Patel, R. N, editor. **Stereoselective biocatalysis**. New York, 2000.

BERTOLINI, M.C.; SCHRAG, J.D.; CYGLER, M.; ZIOMECK, E.; THOMAS, D.Y.; VERNET, T. "Expression and characterization of *Geotrichum candidum* lipase I gene: comparison of specificity profile with lipase II". **Eur. J. Biochem.**, 228 (3), 863-869, 1995.

BIER, M. "Lipases". **Methods Enzymol.**, 1, 627-651, 1955.

BOEL, E.; CHRISTENSEN, T.; WOLDIKE, H. "Nucleic acid encoding a recombinant *Humicola sp* lipase". Official Gazette of USA Patent and Trademark Office Patents 1219, 3394; 1996.

BOLETIM NOVOZYME A/S, **LIPOLASE 100 L**, B 434 d-GB 500, Bagsvaerd-Denmark, 2001.

BORNSCHEUER, U.T. "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis". **FEMS Microbiol. Rev.**, 733, 1-9, 2002.

BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R. J. "Hydrolases in organic synthesis regio- and stereoselective biotransformations". Wiley -VCH, Weinheim, 1999.

BRADFORD, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". **Biochemistry.**, 72, 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; MENGE, U. "A serine protease triad forms the catalytic centre of a

triacylglycerol lipase". **Nature.**, 343, 767-770, 1990.

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

BROWN, E.D.; YADA, R.Y.; MARAGONI, A. "The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactante concentration in Aerosol-OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure". **Biochim. Biophys. Acta.**, 1161, 66-72, 1993.

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. "Reversed micelles in liquid-liquid extraction". In: Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. (Eds). **Recovery Process for Biologycal Materials**. U.K: John Wiley & Sons, 247-271, 1993.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; GIRONA, V.; PATKAR, S.A., ALSINA, M.A. "Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase". **Biochem.**, 39, 413-423, 2000 a.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; DE BOLÓS, J.; PATKAR, S.A.; ALSINA, M.A. "Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic of a fungal lipase". **Biochimie.**, 82, 1053-1061, 2000 b.

CARDENAS, J.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; SINISTERRA, J.V. "Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipase". **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.**, 14, 111-123, 2001.

CARLILE, K.; REES, G.; ROBINSON, B.H.; STEER, T.D.; SVENSSON, M. "Lipase-catalyzed interfacial reactions in reverse micellar systems". **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, 92, 4701-4708, 1996.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. "Studies

on the extraction and back-extraction of a recombinant cutinase in a reversed micellar extraction process". **Bioprocess Eng.**, 11, 203-208, 1994.

CARVALHO, C.M.L.; TAIPA, M.A.; CABRAL, J.M.S. "Reverse micelles as reaction media for lipases". **Biochimie.**, 82, 1063-1085, 2000a.

CARVALHO, C.M.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. " Kinetic of cutinase catalyzed transesterification in AOT reversed micelles: modeling of a batch stirred tank reactor". **J. Biotechnol.**, 81, 1-13, 2000b.

CARVALHO, C.M.L.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. " Cutinase stability in AOT reversed micelles: system optimization using the factorial design methodology". **Enzyme Microb. Technol.**, 24, 569-576, 1999.

CARVALHO, C.M.L.; SERRALHEIRO, M.L.M.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. " Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles". **Enzyme Microb. Technol.**, 21, 117-123, 1997.

CASTELLAR, M.R.; TAIPA, M.A.; CABRAL, J.M.S. "Kinetic and stability characterization of *Chromobacterium viscosum* lipase, and its comparison with *Pseudomonas glumae* lipase". **Appl. Biochem. Biotech.**, 61 (3), 299-314, 1996.

CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. "Fine Chemicals by biotransformation using lipases: revisão". **Química Nova.**, 18 (6), 544- 554, 1995.

CASTRO, M.J.M.; CABRAL, J.M.S. "Stability of hydrogenase in AOT reversed micelles" **Enzyme Microb. Technol.**, 11, 668-672, 1989.

CASTRO, M.J.M.; CABRAL, J.M.S. " Reversed micelles in biotechnological processes". **Biotech. Adv.**, 6, 151-167, 1988.

CHANCE, D.L.; GERHARDT, K.O.; MAWHINNEY, T.P. "Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of hydroxy fatty acids as their methyl methyl esters tert-

butyldimethylsilyl ethers". **J. Chromatogr. A.**, 793, 91-98, 1998.

CHANG, P.S.; RHEE, J.S. "Characteristics of *Chromobacterium viscosum* lipase-catalysed glycerolysis of triglycerides in AOT-isooctane reversed micelles". **Biocatalysis.**, 4, 253-335, 1990.

CHANG, P.S.; RHEE, J.S. "Characteristics of lipase-catalyzed glycerolysis of triglyceride in AOT-isooctane reversed micelles". **Biocatalysis.**, 3, 343-355, 1990.

CHATTOPADHYAY, M.; BANIK, A.K.; RAYCHAUDKURI, S. "Production and purification of lipase by mutant strain of *Rhizopus arrhizus*". **Folia Microbiologica.**, 44 (1), 37-40, 1999.

CHEN, JYH-PING.; CHANG, KO-CHANG. "Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Milk in Lecithin Reverse Micelles". **J. Ferm. Bioeng.**, 76 (2), 98-104, 1993.

CHOWDARY, G.V.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. " Enzymatic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis". **Process Biochem.**, 36, 331-339, 2001.

COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L. "O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente". **Química. Nova.**, 22 (6), 863-864, 1999.

CREAGH, A.L.; PRAUSNITZ, J.M.; BLANCH, H.W. "Structural and catalytic properties of enzyme in reverse micelles". **Enzyme Microb. Technol.**, 1993, 15, 383-392, 1993

CROOKS, G.E.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; SVENSSON, M.; STEPHENSON, G.R. "Comparison of Hydrolysis and Esterification behaviour of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions: I. Effect of pH and water content on reaction kinetics ". **Biotechnol. Bioeng.**, 48, 78-88, 1995 a.

CROOKS, G.E.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; SVENSSON.; STEPHENSON, G.R. "Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions: II. Effect of temperature on reaction kinetics and general considerations of stability and productivity". **Biotechnol. Bioeng.**, 48; 190-196, 1995b.

CUNNAH, P.J.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. " Esterification and transesterification catalysed by cutinase in reverse micelles of CTAB for the synthesis of short chain ester". **Biocatal. Biotrans.**, 14, 125-146, 1996.

CYGLER, M.; SCHRAG, J.D. "Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases". **Methods Enzymol.**, 284 (A), 3-27, 1997.

DEEVER, A.M.T.J. "Mechanism of activation of lipolytic enzymes". Tese de Doutorado. Rijksuniversiteit Utrecht, 1992.

DEKKER, M.; HILHORST, R.; LAANE, C. "Isolating enzymes by reversed micelles". **Anal. Biochem.**, 178, 217-226, 1989.

DEL RÍO, J.L.; CAMINAL, G.; FITÉ, M.; FAUS, I.; BLADÉ, J.; SOLÁ, C. "Lipase-catalysed synthesis of natural ethanol esters: effect of water removal on enzyme reutilisation". **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 75, 991-996, 2000.

DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, R.; WEI, Y.; DODSON, G.; YAMAGUCHI, S.; HAAS, M.J.; DEREWENDA, Z.S. "An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases". **Nat. Struct. Biol.**, 1, 36-47, 1994 a.

DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; WEI, Y.; GREEN, R.; KOBOS, R.; 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 delemar*". **J. Lipids Res.**, 35, 524, 1994 b.

DORDICK, J.S. "Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents". **Enzyme**

**Microb. Technol.**, 11, 194-211, 1989.

DUCRET, A.; TRANI, M.; LORTIE, R. "Lipase catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity". **Enzyme Microb. Technol.**, 22, 212-216, 1998.

DÜNHAUPT, A.; LANG, S.; WAGNER, F. "*Pseudomonas cepacia* lipase: studies on aggregation, purification and on cleavage of oliva oil". **Biotechnol. Lett.**, 14, (10), 953-958, 1992.

EASTOE, J.; ROBINSON, B. H.; STEYTLER, D. C.; THORN-LEESON, D. "Structural studies of microemulsion stabilised by Aerosol OT". **Adv. Coll. Inter. Sci.**, 36, 1-31, 1991.

EGLOFF, M.P.; RANSAC, S.; MARGUET, F.; ROGALSKA, E.; VAN TILBEURGH, H.; BUONO, G.; CABBILLAU, C.; VERGER, R. "Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux". In Malcata, F.X. (Ed). **Engineering of/with lipases..** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

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

FETT, W.F.; GERARD, H.C.; MOREAU, R.A.; OSMAN, S.F.; JONES, L.E. "Screening of non filamentous bacteria for production of cutin-degradation enzymes". **Appl. Environ. Microbiol.**, 58, 2123, 1992.

FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. "A critical revolution of phenomenon of interfacial activation". **Methods Enzymol.**, 284 (B), 327-347, 1997.

FROST, G.M.; MOSS, D.A. "Production of enzymes by fermentation". **Enzyme Technol.**, 7, 112-121, 1987.

GAO, Y.; BREUIL, C. "Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*". **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 14 (3), 1998.

GARCIA-MORENO, E.; RUIZ, M.A.; BARBAS, C.; PINGARRÓN, J.M. "Determination of organic peroxides in reversed micelles with a poly-N-methylpyrrole horseradish peroxidase amperometric biosensor". **Anal. Chim. Acta.**, 448, 9-17, 2001.

GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. "Enzymatic synthesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach". **Enzyme Microb. Technol.**, 25, 584-590, 1999.

GASPAR, M.L.; POLLERO, R.; CABELLO, M. "Partial purification and characterization of a lipolytic enzyme from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*". **Mycologia.**, 89 (4), 610-614, 1997.

GODTFREDSSEN, S.V. "Microbial lipases". In: Fogarty, W.M.; Kelly, C.T. (Eds). **Microb. Enzymes Biotechnol.**, Elsevier Science Publisher Ltd, England, 1990.

GORDILLO, M.A.; OBRADORS, N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁC, C. "Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*". **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 43, 38-41, 1995.

GOTO, A.; YOSHIOKA, H.; MANABE, M.; GOTO, R. "NMR, spectroscopic study on the dissolution of water in sodium bis (2-ethylhexyl)sulfosuccinate/toluene solution". **Langmuir.**, 11, 4873-4875, 1995.

GULOMOVA, K.; ZIOMECK, E.; SCHRAG, J.D.; DAVRANOV, K.; CYGLER, M.. "Purification and characterization of a *Penicillium sp.* lipase which discriminates against diglycerides". **Lipids.**, 31 (4), 379-383, 1996.

HAMPSON, J.W.; FOGLIA, T.A. "Separation of tripalmitin from its hydrolysis products by simple isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography". **J. Am.**

**Oil Chem. Soc.**, 75 (4), 539-540, 1998.

HAMSAVENI, D. R.; PRAPULLA, S. G.; DIVAKAR, S. "Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate". **Process. Biochem.**, 36, 1103-1109, 2001.

HAN, J.J.; IWASAKI, Y.; YAMANE, T. "Use of isopropanol as a modifier in a hexane-acetonitrile based mobile phase for the silver ion HPLC separation of positional isomers of triacylglycerols containing long chain polyunsaturated fatty acids". **J. High Resol. Chromatogr.**, 22 (6), 357-361, 1999.

HAN., D.H.; WALDE, P.; LUISI, P.L. "Dependence of lipase activity on water content and enzyme concentration in reversed micelles". **Biocatalysis.**, 4, 153-161, 1990.

HAN., D.; RHEE, J.S. "Characteristics of lipase-catalysed hidrolysis of olive oil in AOT-Isooctane reverse micelles". **Biotechnol. Bioeng.**, 28, 1250-1256, 1986.

HARA, F.; NAKASHIMA, T.; FUKUDA, H. "Comparative study of commercially available lipases in hydrolysis reaction of phosphatidylcolina". **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, 74 (9), 1129-1132, 1997.

HARALDSSON, G.G.; ALMARSSON, Ö. "Studies on the positional specificity of lipase from *Mucor miehei* during interesterifications of cod liver oil with n-3 polyunsaturated fatty acids and ethyl ester concentrates. **Acta Chem. Scand.**, 45, 723-730, 1991.

HAYES, D.G.; GULARI, E. "Esterification reactions of lipase in reverse micelles". **Biotechnol. Bioeng.**, 35, 793-801, 1990.

HAWTHORNE, S.B.; MILLER, D.J. **Appl. Spectrosc.**, 40, 1200-1211, 1986.

HEDRICH, H.C.; SPENER, F.; MENGE, U.; HECHT, H.J.; SCHIMID, R.D. "Large-scale purification, enzymatic characterization and crystallization of the lipase from

*Geotrichum candidum*". **Enzyme. Microb. Technol.**, 13 (10), 840-847, 1991.

HEDSTRÓM, G.; BACKLUND, M.; SLOTTE, J.P. "Enantioselective synthesis of ibuprofen esters in AOT/isooctane microemulsions by *Candida cylindracea* lipase". **Biotechnol. Bioeng.**, 42, 618-624, 1993.

HIOL , A.; JONZO, M.D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. "Production, purification and characterization of an extracellular lipase from thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit". **Enzyme. Microb. Technol.**, 26 (5-6), 421-430, 2000.

HIOL , A.; JONZO, M.D.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. " Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*". **Enzyme. Microb. Technol.**, 25 (1-2), 80-87, 1999.

HOLMBERG, K.; ÖSTERBERG, E. "Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion". **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, 65, 1544-1548, 1988.

HORNFECK .; U.; GRADZIELSKI, M.; MORTENSEN, K.; THUNIG, C.; PLATZ.; Z. "Highly swollen lamellar phases in the system calcium dodecyl sulphate, pentanol or hexanol, and water". **Langmuir.**, 14, 2958-2964, 1998.

HOU, T. C. "Characterization of new yeast lipases". **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, 74 (11), 1391-1394, 1997.

HUTT, A. J.; CALDWELL, J. "The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs". **Clin. Pharmacokinet.**, 9, 371-373, 1984.

IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. "Fungal lipase". In: Howard L. Brockman (Eds.). **Lipases**. Amsterdam: Elsevier, 443-469, 1984.

JAEGER, K.E.; DIJSTRA, B.W.; REETZ, M.T. "Bacterial Biocatalist: molecular

biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases". **Annu. Rev. Microbiol.**, 53, 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology". **Trends Biotechnol.**, 16, 396-403, 1998.

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

JENSEN, R.G.; GALLUZO, D.R.; BUSH, V.J. "Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolase)". **Biocatalysis.**, 3, 307-316, 1990.

JENSEN, R.G. "Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from variou sources". **Lipids.**, 18, 650-657, 1983.

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN G.; NASCIMENTO, M.G. "Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica". **Química Nova.**, 20 (6), 664-672, 1997.

KAZLAUSKAS, R.J.; BORNSCHEUER, U.T. "Biotransformations with lipases: In Rehm, H. J.; Pihler, G.; Stadler, A.; Kelly, P. J. W, Editors. **Biotechnology**, 8, 37-192, New York, 1998.

KAMYSHNY, A.; TROFIMOVA, D.; MAGDASSI, S.; LEVASHOV, A. "Native and modified glucose oxidase in reversed micelles". **Coll. Surf. B: Biointerfaces.**, 24, 177-183, 2002.

KHOR, H.T.; TAN, N.H.; CHUA, C.L. "Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil". **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, 63, 538-540, 1986.

KIM, M.G.; LEE, S.B. "Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by lipase-catalysed esterification reaction: Effects of water content and solid support". **J. Ferm. Bioeng.**, 81 (3), 269-271, 1996.

KIM, T., CHUNG, K. "Some characteristics of palm Kernel olein hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* lipase in reversed micelle of AOT in isooctane, and additive effects". **Enzyme. Microb. Technol.**, 11, 528-532, 1989.

KIRAN, K. R.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S. "A central composite rotatable design analysis of lipase catalyzed synthesis of lauroyl lactic acid at bench-scale level". **Enzyme Microb. Technol.**, 29, 122-128, 2001.

KIYOTA, H.; HIGASHI, E.; KOIKE, T.; ORITANI, T. "Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate". **Tetrahedron: Asymmetry**, 12, 1035-1038, 2001.

KLIBANOV, A. M. "Why are enzymes less active in organic solvents than in water"? **Trends Biotechnol.**, 15, 97-101, 1997.

KLIBANOV, A.M. "Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents". **Acc. Chem. Res.**, 23, 114-120, 1990.

KOICHIRO, S.; MAKOTO, I.; YOSHINARI, B.; YOSHINOBU, KAWANO.; RYOICHI, K.; ISAO, K. "Characteristics and kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in a reverse micellar system". **J. Ferm. Bioeng.**, 81 (2), 143-147, 1995.

KOTLARCHYK, M.; CHEN, S. H.; HUANG, J.S.; KIM, M.W. "Structure of three-component microemulsions in the critical region determined by small-angle scattering". **Phys. Rev. A.**, 29, 2054-2069, 1984.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S "Purification of the lipase from *Penicillium citrinum* by chromatographic process". **Bioprocess Eng.**, 20, 59-65, 1999.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; FONTANA, J.D.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; CABRAL, J.M.S. "Kinetic characteristics of *Penicillium citrinum* lipase in AOT/isooctane reversed micelles". **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 67(1-2):85-87,

1997.

KRIEGER, N. "Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum*". Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 1995.

KRISHNA, S. H.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. "Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*". **J. Biotechnol.**, 87, 191-201, 2001a.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. "Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study". **Biochim. Biophys. Acta.**, 1547, 262-267, 2001b.

KRISHNA, S.H.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. "Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology". **Enzyme. Microb. Technol.**, 26, 131-136, 2000.

KULKARNI, N.; GADRE, R.V. "Simple gas chromatography method for lipase assay". **Biotechnol. Tech.**, 12 (8), 627-628, 1998.

LAANE, C.; BOEREN, S.; HILHORST, R.; VOS, K.; VEEGER, C. "Optimization of biocatalysis in organic media". In Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M.D (Eds),. **Biocatalysis in Organic Media**, 65-84, 1987a.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. "Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents". **Biotechnol. Bioeng.**, 30, 81-87, 1987b.

LATTMAN, R.; GHISALBA, O.; GYGAX, D.; SCHAR, H. P.; SCHMIDT, E. "Screening and application of microbial esterases for the enantioselective synthesis of chiral glycerol derivatives". **Biocatalysis.**, 3, 137-144, 1990.

LEBLANC, D.; MORIN, A.; HU, D.; ZHANG, X.M.; BISAILLON, J.G.; PAQUET, M.; DUBEAU, H. " Short chain fatty acid esters synthesis by commercial lipases in low-

water systems and by resting microbial cells in aqueous medium". **Biotecnol. Lett.**, 20, 1127-1131, 1998.

LEVASHOV, A.V.; KHMELNITSKY, Y.L.; KYACHKO, N.L.; MARTINEK, K. "Reversed micellar enzymology". In: **Surfactants in Solution**, 2, 1069-1091. Mittal, K.L. e Lindman, B. (Eds), Plenum Press, N.Y, 1984.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. "Industrial biotransformation". Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

LIMA, V.M.G. "Lipases de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx IOC 4212". Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2000.

LIMA, A.W.O.; ANGNES, L. "Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações em química analítica". **Química Nova.**, 22 (2), 229-245, 1999.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. "Rapid colorimetric determination of free fatty acids". **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 53, 470-472, 1976.

LUISI, P.L.; MAGID, GIOMANI, M.; PILENI, M.P.; ROBINSON, B.H. "Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules". **Biochim. Biophys. Acta.**, 947, 209-246, 1988.

LUISI, P.L.; MAGID, L.J. "Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions". **CRC Crit. Rev. Biochem.**, 20, 409-474, 1986.

LUISI, P.L.; SALTMAN, R.; GUARNACCIA, R. "Co-oligopeptides of glycine and aromatic amino acids with variable distance between residues. Enzymatic synthesis of N-protect dipeptide esters". **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 2 (2), 133-138, 1977.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. "Lipases microbianas na produção de ésters formadores de aroma". **Ciência Tecnol. Alimentos.**, 17 (2), 115-119, 1997.

MALCATA, F.X. "Hydrolysis of butterfat by immobilized using three-phase membrane reactors". Tese de Doutorado, University of Wisconsin-Madison, 1991.

MANIASSO, N. "Ambientes micelares em química analítica". **Química Nova.**, 24 (1), 87-93, 2001.

MANOJ, K.M.; SWAMINATHAN, T. "Ester synthesis in reversed micelles using lipase". **Bioproc. Eng.**, 17, 185-188, 1997.

MARHUENDA-ERGA, F.C.; PIERA-VELÁZQUEZ, S.; CADENAS, C.; CADENAS, E. "Enzymatic activity of an extremely halophilic phosphatase from the Archaea *Halobacterium salinarum* in reversed micelles". **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.**, 10, 555-563, 2000.

MARQUES, D.B.; PASTORE, G.M. "Produção de aromas naturais por microorganismos". **Bol. SBCTA.**, 33 (1), 80-185, 1999.

MARTINEK, K.; KLYACHKO, N.L.; KABANOV, A.V.; KHMELNITSKI, Y.L.; LEVASHOV, A.V. "Micellar enzymology: its relation to membranology". **Biochem. Biophys. Acta.**, 981, 161-172, 1989.

MARTINEK, K.; LEVASHOV, A.V.; KLYACHKO, N.L.; KHMELNITSKI, Y.L.; BEREZIN, I.V. "Catalysis by water-soluble enzymes in organic solvents. Stabilization of enzymes against denaturation through their inclusion in reversed micelles of surfactants". **Dokl. Akad. Nauk. SSSR.**, 236, 920-923, 1977.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; GROTH CLAUSEN, I.; PATKAR, S.; SVENDSEN, A.; HULT, K. "The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola Lanuginosa* lipase". **Protein Eng.**, 9, 519-524, 1996.

MASE, T.; MATSUMIYA, E.; MATSUURA, A. "Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase". **Biosci. Biotech. Biochem.**, 59 (2), 329-330, 1995.

MATZKE, S.F.; CREAGH, A.L.; HAYNES, C.A.; PRAUSNITZ, J.M.; BLANCH, H.W. "Mechanisms of protein solubilization in reversed micelles". **Biotechnol. Bioeng.**, 40, 91-102, 1992.

MAYORDOMO, I.; RANDZ, G.F.; PIETRO, J.A. "Isolation, purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*". **J. Agric. Food Chem.**, 48 (1), 105-109, 2000.

MELO, E.P.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. "Triglycerides hydrolysis and stability of a recombinant cutinase from *Fusarium solani* in AOT-isooctane reversed micelles." **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 50, 45-56, 1995 a.

MELO, E.P.; COSTA, S.M.B.; CABRAL, J.M.S. "Structural effect on reversed micelles of AOT over a recombinant cutinase from *Fusarium solani pisi*: a steady state fluorescence study." **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 750, 85-88, 1995 b.

MOJOVIC, L.; SILER-MARINKOVIC, S.; KUKIC, N.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. "*Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the mid-fraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat". **Enzyme Microb. Technol.**, 15, 438-443, 1993.

MUKHERJEE, K.D. "Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids". **Biocatalysis**, 3, 277-293, 1990.

MUSTRANTA, ANNIKKA. "Novel applications of lipases". **VTT Biotechnology and Food Research**, 1995.

NAGAYAMA, K.; MATSU-URA, SYN-ICHI.; DOI, T.; IMAI, M. "Kinetic characterization of esterification catalyzed by *Rhizopus delemar* lipase in lecithin-AOT microemulsion system". **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.**, 4, 25-32, 1998.

NAKANO, H.; KIKU, Y.; ANDO, K.; KAWASHIMA, Y.; KITAHATA, S.; TOMINAGA, Y.; TAKENISHI, S. "Lipase-catalyzed esterification of mono- and oligoglycosides with various fatty acids". **J. Ferment. Bioeng.**, 78, 70-73, 1994.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. "Planejamento e Otimização de Experimentos". Editora de Unicamp, 102-106, São Paulo, 1995.

NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE, C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.; CHAHINIAN, H. "Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study". **Biochim. Biophys. Acta.**, 1534, 34-44, 2001.

OLAMA, Z.A.; NAIM, N.; ADBEL, M.N. "Optimization and purification of thermostable lipase produced by *Aspergillus ustus* grown on soy-bean litters". **J. Med. Res. Inst.**, 19 (4), 79-104, 1998.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.M.; HAREL, M.; REMINGTON, S.J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J.L.; VERSCHUEREN, K.H.G.; GOLDMAN, A. "The  $\alpha/\beta$  hidrolase fold". **Protein Eng.**, 5, 197-211, 1992.

OMAR, I.C.; HAYASHI, M.; NAGAI, S. "Purification and some properties of a thermostable lipase produced from *Humicola lanuginosa*". **Agric. Biol.Chem.**, 51 (1), 37-45, 1987.

OGUNDERO, V.W. "Partial purification and activities of an extracellular lipase of *Thermomyces lanuginosus* from Nigerian palm". **Mycophatologia**, 97, 105-109, 1987.

ORLICH, B.; SCHOMÄCKER, R. "*Candida rugosa* lipase reactions in nonionic W/o-microemulsion with a technical surfactant". **Enzyme Microb. Technol.**, 28, 42-48, 2001.

OSÓRIO, N.M.; FERREIRA-DIAS, S.; GUSMÃO, J.H.; FONSECA, M.N.R. "Response surface modelling of the production of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase". **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.**, 11, 677-686, 2001.

PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. "Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*". **World J. Microbio. Biotechnol.**, 11, 669-677, 1995a.

PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. "Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat". **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 43, 42-51, 1995b.

PAIVA, A. L.; MALCATA, F.X. "Integration of reaction and separation with lipases: an overview". **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.**, 3, 99-109, 1997.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V.T. "The realm of microbial lipases in biotechnology". **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 29, 119-131, Part 2, 1999.

PARK, H.J.; CHOI, W.J.; HUH, E.C.; LEE, E.Y.; CHOI, C.Y. "Production of optically active Ketoprofen by direct enzymatic esterification". **J. Biosci. Bioeng.**, 87 (4), 545-547, 1999.

PATEL, M. T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. " Hydrolysis of milk fat by lipase in solvent-free phospholipid reverse micellar media". **J. Food. Sci.**, 61, 33-38, 1996.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. "Introduction to Organic Laboratory Techniques". 3<sup>0</sup> Edition, 86-99, 1997.

PENCREAC'H, G.; BARATTI, J.C. "Properties of free and immobilised lipase from *Burkholderia cepacia* in organic media". **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 52, 276-280, 1999.

PETERSEN, S.B.; JHONSON, P.I.; FOJAN, P.; PETERSEN, E.I.; PETERSEN, M.T.N.; HANSEN, S.; ISHAK, R.J.; HOUGH, E. "Protein engineering the surface of enzymes". **J. Biotechnol.**, 66, 11-26, 1998.

PHYTIAN, S.J. " Esterases. In: **Biotechnology–Series**". Wiley –VCH, Weinheim,

193-241, 1998.

PIMENTEL, M.C.B.; KRIEGER, N.; COELHO, L.C.C.B.; FONTANA, J.O.; MELO, E.H.M.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA-FILHO, J.L. "Lipase from a brazilian strain of a *Penicillium citrinum*". **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 49 (1), 59-74, 1994.

PINTO-SOUSA, A.M.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. "Esther synthesis by a recombinant cutinase in reversed micelles of a natural phospholipid". **Biocatalysis.**, 9, 169-179, 1994.

PRAZERES, D.M.F.; GARCIA, F.A. P.; CABRAL, J.M.S. "Kinetics and stability of a *Chromobacterium viscosum* lipase in a reversed micellar and aqueous media". **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 53, 159-164, 1992.

RAO, P.; DIVAKAR, S. "Lipase catalyzed esterification of  $\alpha$ -terpineol with various organic acids: application of the Plackett-Burman design". **Process Biochem.**, 36, 1125-1128, 2001.

RAO, A.M.; MURRAY, M.A.; JOHN, V.T. "Characteristics of lipase catalysis during ester synthesis in reversed micellar system". **Biocatalysis**, 4, 253-264, 1991.

RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B.; MUSANI, R.; SAMAD, M.Y.; BASRI, M. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 3, p. 153-159, 1997.

REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; STEPHENSON, G.R. "Macrocyclic lactone synthesis by lipase in water-in-oil-microemulsion". **Biochim. Biophys. Acta.**, 1257, 239-248, 1995a.

REES, G.D.; ROBINSON, B.H. "Esterification reactions catalyzed by *Chromobacterium viscosum* lipase in CTAB-based microemulsion systems". **Biotechnol. Bioeng.**, 45, 344-355, 1995b.

RUBIN, D.; DENNIS, E. A. "Lipases: Part A. Biotechnology". **Methods in Enzymol.**, 284, 1-408, New York, 1997a.

RUBIN, D.; DENNIS, E. A. "Lipases: Part B. Enzyme characterization and utilization". **Methods Enzymol.**, 286, 1-563, New York, 1997b.

RUSSEL, J.T.; SELIME, K.; DIDIER, C.; ALANIN, N. "Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miechei* in three different types of organic media: a comparative study". **Enzyme Microbiol. Technol.**, 22, 439-445, 1998.

SARDA, L.E.; DESNUELLE, P. "Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion". **Biochim. Biophys. Acta.**, 30, 513-521, 1958.

SÁNCHEZ, A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁ, C. "Enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids and trans-2-phenyl-1-cyclohexanol: Comparison between immobilised lipases from *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei*". **Biotechnol. Lett.**, 20 (12), 1145-1148, 1998.

SAVELLI, G.; SPRETI, N.; DI PROFIO, P. "Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions". **Current Opinion Colloid Interface Science.**, 5, 111-117, 2000.

SCHIMIDLI, P.K.; LUISI, P.L. "Lipase-catalyzed reactions in reverse micelles formed by soybean lecithin". **Biocatalysis.**, 3, 367-376, 1990.

SCHLATMANN, J.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. "Esterification of short chain organic acids with alcohols by a lipase microencapsulated in reversed micelles". **Biocatalysis.**, 5, 137-144, 1991.

SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. "Lipases and  $\alpha/\beta$  hidrolases fold". **Methods Enzymol.**, 284 (A), 87-107, 1997.

SELLEK, G.A.; CHAUDHURI, J.B. " Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles: Review". **Enzyme Microb. Technol.**, 25, 471-482, 1999.

SELMİ, B.; GONTIER, E., THOMAS, D. "Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium". **Enzyme Microb. Technol.**, 23, 182-186, 1998.

SHAH, C.; SELLAPPAN, S.; MADAMWAR, D. "Entrapment of enzyme in water-restricted microenvironment amyloglucosidase in reverse micelles". **Process. Biochem.**, 35, 971-975, 2000.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. "Production, purification, characterization, and applications of lipases: Research review paper". **Biotechnol. Adv.**, 19, 627-662, 2001.

SHELLEY, A . W.; DEETH, H. C.; MACRAE, I. C. "Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications". **J. Microb. Methods**, 6, 123-137, 1987.

SMITH, R.E.; LUISI, P.L. "Micelar solubilization of biopolymers in hydrocarbon splvents. III. Empirical definition of an acidity scale in reverse micelles". **Helvetica Chim. Acta.**, 63, 2302-2311, 1980.

STAHMANN, K.P.; BÖDDECKER, T.; SAHM, H. "Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubble, or droplets of lipid or fatty acid". **Eur. J. Biochem.**, 244, 220-225, 1997.

STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; DIMITRIADIS, E.; KOLISIS, F.N. "Catalytic behavior of *Pseudomonas cepacia* lipase in W/o emulsions". **Biotechnol. Bioeng.**, 45, 33-41, 1995.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. "Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*". **J. Bacteriol.**, 168, 1070-1074, 1986.

SUAREZ, M.J.; LANG, J. "Effect of addition of water-soluble polymers in water-in-oil microemulsions made with anionic and cationic surfactants". **J. Phys. Chem.**, 99, 4626-4631, 1995.

SVENDSEN, A.; CLAUSEN, I.G.; PATKAR, S. A.; BORCH, K.; THELLERSEN, M. "Protein engineering of microbial lipases of industrial interest". **Methods Enzymol.**, 284, 317-340, 1997.

SVENSSON, M.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; STEPHENSON, G.R. "Phospholipid-stabilised water-in-oil microemulsions: A study of ester synthesis by *Humicola lanuginosa* lipase". **Coll. Surf. B: Biointerfaces.**, 8, 101-111, 1996.

SWEIGARD, J.A.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. "Cloning and analysis of CUT1, a cutinase gene from *Magnaphorthe grisea*". **Mol. Gen. Genet.**, 232 (2), 174-182, 1992.

TAEGEUM KIM.; KIOMIN CHUNG. "Some characteristics of palm Kernel olein hydrolysis by *Rhizolus arrhizus* lipase in reversed micelle of AOT in isooctane, and additive effects". **Enzyme Microb. Technol.**, 11, 528-532, 1989.

THOMSON, C.A.; PASCAL, J.D.; MAZZA, G. "Detection and measurement of microbial lipase activity: A Review". **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 39, 165-187, 1999.

TOIDA, J.; ARIKAWA, Y.; KONDOH.; K.; FUKUZAWA, M.;. "Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*". **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 62 (4), 759-763, 1998.

TOIDA, J.; KONDOH.; K.; FUKUZAWA, M.; OHNISHI, K.; SEKIGUCHI, J. "Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*". **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 59 (7), 1199-1203, 1995.

TSAI, S.W.; TSAI, C.S.; CHANG, C.S. "Lipase-catalysed synthesis of (S)-naproxen ester prodrug by transesterification in organic solvents biphasic". **Appl. Biochem.**

**Biotechnol.**, 80, 205-219, 1999.

TSAI, S.W.; HUANG, C.M. "Enantioselective synthesis of (S) suprofen ester prodrugs by lipase in cyclohexane". **Enzyme Microb. Technol.**, 25 (8-9), 682-688, 1999.

TSAI, S.W.; CHIANG, C.L. "Kinetics, mechanism, and time course analysis of lipase-catalyzed hydrolysis of high concentration olive oil in AOT-isooctane reversed micelles". **Biotechnol. Bioeng.**, 38, 206-211, 1991.

UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.I. "Production of lipase by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation". **Process Biochem.**, 37, 637-641, 2002.

UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S. "Cocoa butter equivalent through enzymatic esterification of palm oil midfraction". **Process Biochem.**, 36, 933-939, 2001.

UPPENBERGER, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T.A. "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase-B from *Candida antarctica*". **Structure.**, 2, 453-454, 1994.

UVARANI, G.; JAGANATHAN, L.; SHRIDAS, P.; BOOPATHY. "Purification and characterization of lipase from *Rhizomucor miehei*". **J. Sci. Ind. Res.**, 57, 607-610, 1998.

VAN DYCK, S.M.O.; LEMIERE, G.L.F.; JONCKERS, T.H.M.; DOMMISSE, R.; PIETERS, L.; BUSS, V. "Kinetic resolution of a dihydrobenzofuran-type neoligan by lipase-catalyzed acetylation". **Tetrahedron: Asymmetry.**, 12, 785-789, 2001.

VAN ERP, S.H.M.; KAMENSKAYA, E.O.; KHMELNITSKY, Y.L. "The effect of water content and nature of organic solvent on enzyme activity in low-water media". **Eur. J. Biochem.**, 202, 379-384, 1991.

VEERAGAVAN, k. "A simple and sensitive method for the estimation of microbial

lipase activity". **Anal. Biochem.**, 186, 301-305, 1990.

VERGER, R. "Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts". **Trends. Biotechnol.**, 15 (1),32-38, 1997.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches". **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.**, 9, 113–148, 2000.

VULFSON, E. "Industrial applications of lipases". In: **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application.**, 271-288. Wooley, P. and Petersen, S.B. Cambridge University, G.B., 1994.

WANG, Y.; SRISVASTAVA, K.C.; SHEN, G.V.; WANG, H.Y. "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841)". **J. Ferm. Bioeng.**, 79, 433-438, 1995.

WANG, W.; WEBER, M.E.; VERA, J.H. "Effect of alcohol and salt on water uptake of reverse micelles formed by dioctyldimethyl ammonium chloride (DODMAC) in isooctane". **J. Coll. Inter. Sci.**, 168, 422-427, 1994.

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

WOLFF, A.M.; SHOWELL, M.S. "Application of lipases in detergents". **Enzymes in Detergency.**, 93-97. Marcel Dekker, New York, 1997.

XIE, Y.C.; LIU, H.Z.; CHEN, J.Y. "*Candida rugosa* lipase catalyzed esterification of racemic ibuprofen and chemical hydrolysis of S-ester formed". **Biotechnol. Lett.**, 20, 455-458, 1998.

XIN, J.Y.; LI, S.B.; XU, Y.; CHUI, J. R.; XIA, C. G. "Dinamic enzymatic resolution of

naproxen methyl ester in a membrane bioreactor". **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 76, 579-585, 2001.

XIN, J.Y.; LI, S.B.; XU, Y.; WANG, L.L. "Enzymatic resolution of (S) (+) Naproxen in a trapped aqueous organic solvent biphasic continuous reactor". **Biotechnol. Bioeng.**, 68 (1), 78-83, 2000.

YADAV, R.P.; SAXENA, R.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S. "Purification and characterization of a regio-specific lipase from *Aspergillus terreus*". **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 28 (3), 243-249, 1998.

YAMADA, Y.; KUBOI, R.; KOMASAWA, I. "Increased activity of *Chromobacterium viscosum* lipase in aerosol OT reverse micelles in the presence of nonionic surfactants". **Biotechnol. Prog.**, 9, 469-472, 1993.

YAMAMOTO, K.; FUJIWARA, N. "Purification and some properties of a castor oil hydrolyzing lipase from *Pseudomonas sp*". **Agric. Biol. Chem.**, 52 (12), 3015-3021, 1998.

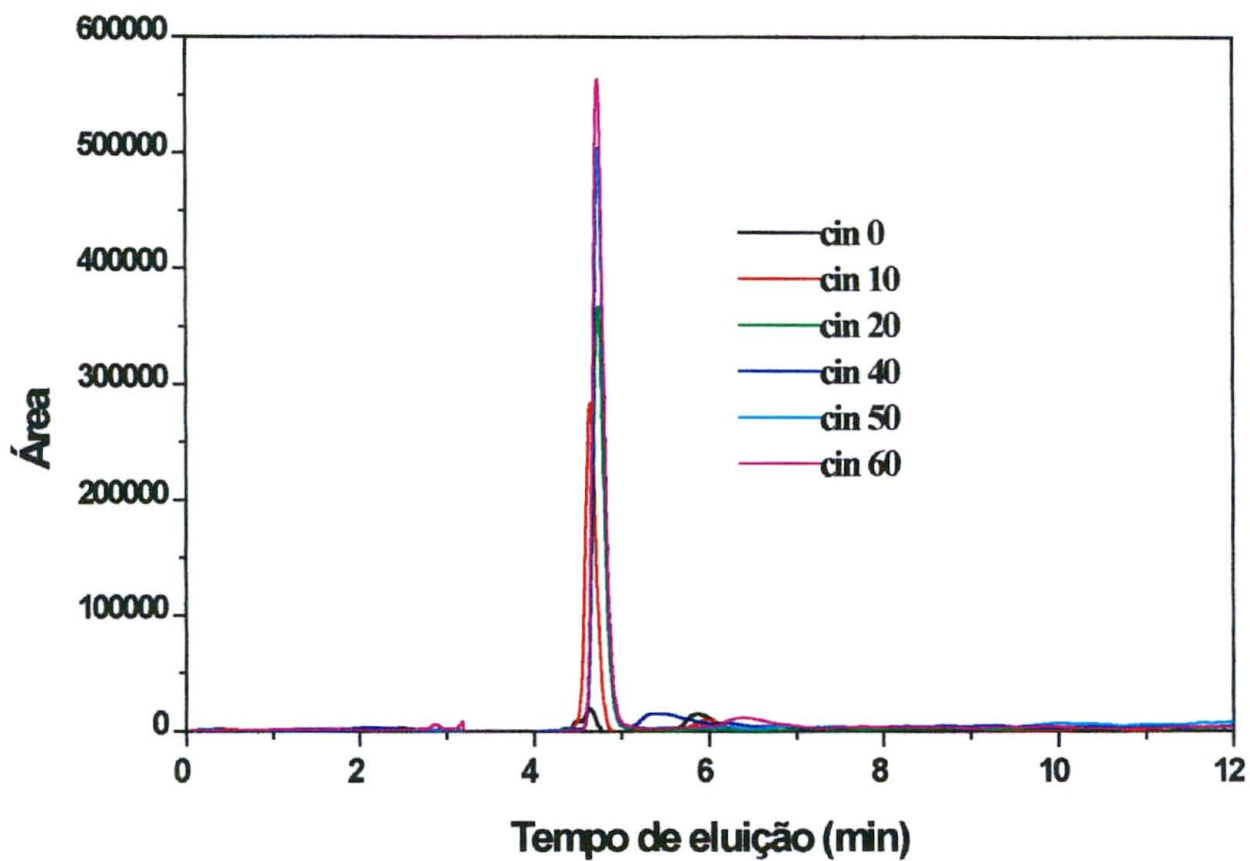
YAMANE, T. "Enzyme technology for the lipids industry: an engineering overview". **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, 64, 1657-1662, 1987.

YAO, C.; KOLLER, W. "Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi- cloning and characterization of a cutinase gene from *Alternaria brassicicola*". **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, 44, 81, 1994.

ZHANG, L. Q.; ZHANG, Y. D.; XU, L.; LI, X. L.; YANG, X. C.; XU, G. L.; WU, X. X.; GAO, H. Y.; DU, W. B.; ZHANG, X. T.; ZHANG, X. Z. "Lipase-catalyzed synthesis of RGD diamide in aqueous water-miscible organic solvents. **Enzyme Microb.**

**ANEXOS**

---



Cromatograma de CLAE da Cinética de Reação de Biossíntese do Laurato de Etila. Condições do ensaio: Coluna C<sub>18</sub> Micropak MCH 10, fase móvel acetonitrila:acetona (9:1), vazão de 0,9 mL/min, e 40 °C.