UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEANDRO ALVES DOS SANTOS

IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUPORTES À BASE DE QUITOSANA E AMIDO POLIALDEÍDICO PARA UTILIZAÇÃO EM BIOCATÁLISE

CURITIBA

2021

LEANDRO ALVES DOS SANTOS

IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUPORTES À BASE DE QUITOSANA E AMIDO POLIALDEÍDICO PARA UTILIZAÇÃO EM BIOCATÁLISE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nadia Krieger

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Santos, Leandro Alves dos
Imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* em suportes à base de quitosana e amido polialdeídico para utilização em biocatálise. / Leandro Alves dos Santos. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Exatas de Pós-Graduação em Química.
Orientadora: Profa. Dra. Nadia Krieger.

1. Química. 2. Lipase. 3. Quitosana. 4. Biocatálise. I. Krieger, Nadia. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Bibliotecário: Nilson Carlos Vieira Junior CRB-9/1797

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIENCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA - 40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LEANDRO ALVES DOS SANTOS** intitulada: **IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUPORTES A BASE DE QUITOSANA E AMIDO POLIALDEÍDICO PARA UTILIZAÇÃO EM BIOCATÁLISE**, sob orientação da Profa. Dra. NADIA KRIEGER, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Janeiro de 2021.

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ADRIANO AGUIAR MENDES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS)

AGRADECIMENTOS

Ao Caos, e a ordem de tudo, que, por bem ou por mal fez todos nós estarmos aqui.

A Universidade Federal do Paraná, pelo espaço físico fornecido.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A Amano pela doação da lipase.

Um agradecimento especial a minha orientadora Nadia Krieger, por ter concedido a oportunidade de trabalhar junto, pelo incentivo e confiança depositada em mim.

Ao Robson Alnoch pelas valiosas contribuições a este trabalho.

Um agradecimento especial a todos os professores que tive a oportunidade de conhecer durante o mestrado.

Aos meus amigos do Departamento de Química da UFPR.

Aos colegas do LTEB e do LTEF.

Aos meus pais, que mais uma vez me permitiram vivenciar mais uma aventura pela ciência.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo imobilizar a lipase comercial de *Pseudomonas fluorescens* em suportes à base de quitosana (QTS) e amido polialdeídico (AP) e a aplicação dos derivados imobilizados em biocatálise. Inicialmente, a quitosana em pó foi gelificada em uma solução de ácido acético 2,5% (v v^{-1}) e convertida em esferas através da precipitação por gotejamento em solução de NaOH e etanol. Após a filtração e secagem, as esferas foram modificadas com glutaraldeído (GA) (3% v v^{-1}) e com amido polialdeídico com diferentes teores aldeídicos (0,77 – 8,0 mmol g^{-1}). O amido polialdeídico foi obtido através da oxidação seletiva do amido de milho com periodato de sódio. Foram obtidos os suportes, quitosana derivatizada com glutaraldeído (QTS/GA) e com amido polialdeídico (QTS/AP). Estes suportes foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), grau de *crosslinking*, área superficial e distribuição do tamanho do poro. Os suportes QTS/GA e QTS/AP foram utilizados para imobilizar a lipase, resultando nos derivados QTS/GA/LAK e QTS/AP(I-V)/LAK. Foram investigados os principais parâmetros do processo de imobilização: eficiência de imobilização (E), retenção de atividade (R) e atividade de hidrólise em meio orgânico. As eficiências de imobilização foram 59% para QTS, 85% para QTS/GA e 98% para QTS/APV, em apenas 5 h. A lipase imobilizada em QTS/GA e QTS/APIII manteve 95% de sua atividade residual após incubação a 50 °C; a 70 °C, a atividade foi mantida em 60% para QTS/GA/LAK e em 74% para QTS/APIII/LAK, após incubação de 8 h em *n*-hexano. QTS/APIII/LAK também se mostrou estável em isooctano (log P 4,35), *n*-heptano (log P 4,0) e *n*-hexano (log P 3,5), mantendo mais de 80% de sua atividade após 8 h de incubação a 35 °C. As atividades de hidrólise contra tricaprilina em *n*-hexano para LAK imobilizada em QTS, QTS/GA/LAK e QTS/APIII/LAK foram de 5 U g^{-1}, 153 U g^{-1} e 156 U g^{-1}, respectivamente. Entre os três preparados enzimáticos avaliados, as atividades de esterificação foram de 3,2 U g^{-1}, 44 U g^{-1} e 124 U g^{-1}, respectivamente, na síntese de oleato de etila em *n*-hexano, com 5%, 47% e 72% de conversão em 6 h, a 40 °C. QTS/GA/LAK e QTS/APIII/LAK foram utilizados para catalisar reações em sistemas livres de solvente, na síntese do cinamato de etila, um éster de aroma, obtendo-se conversões de 59% e 83%, respectivamente, em 40 h, a 50 °C. Os derivados imobilizados QTS/GA/LAK e QTS/APIII/LAK foram utilizados na resolução cinética dos álcoois (*RS*)-1-feniletanol e (*RS*)-1-fenilpropanol por reações de transesterificação com acetato de vinila. Foram obtidos excelentes valores de excesso enantiomérico (ee >95%) e coeficiente de enantiosseletividade (E > 200) para os isômeros (R) de ambos os substratos avaliados. Os resultados reportados neste trabalho são promissores, complementam a literatura e fundamentam estudos futuros para o desenvolvimento de aplicações da quitosana e do amido polialdeídico em biocatálise.

Palavras-chave: Lipases, Imobilização, Quitosana, Amido polialdeídico, Biocatálise, Resolução cinética de racematos

ABSTRACT

This work aimed to immobilize the commercial lipase of *Pseudomonas fluorescens* on supports based on chitosan (CHT) and polyaldehyde starch (PS) and the application of immobilized derivatives in biocatalysis. Initially, the chitosan powder was gelled in a 2.5% acetic acid solution (v v^{-1}) and converted into spheres through drip precipitation in NaOH and ethanol solution. After filtration and drying, the spheres were modified with glutaraldehyde (GA) (3% v v^{-1}) and with polyaldehyde starch with different aldehyde levels (0.77 - 8.0 mmol g^{-1}). Polyaldehyde starch was obtained through the selective oxidation of corn starch with sodium periodate. The obtained supports were, chitosan derivatized with glutaraldehyde (CHT/GA) and with polyaldehyde starch (CHT/PS). These supports were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), degree of crosslinking, surface area and pore size distribution. The CHT/GA and CHT/PS supports were used to immobilize the lipase, resulting in the CHT/GA/LAK and CHT/PS(I-V)/LAK derivatives. The main parameters of the immobilization process were investigated: immobilization efficiency (E), activity retention (R) and hydrolysis activity in organic medium. Immobilization efficiencies were 59% for CHT, 85% for CHT/GA and 98% for CHT/PSV, in just 5 h. The lipase immobilized in CHT/GA and CHT/PSIII maintained 95% of its residual activity after incubation at 50 °C; at 70 °C, the activity was maintained at 60% for CHT/GA/LAK and at 74% for CHT/APIII/LAK, after 8 h incubation in n-hexane. CHT/PSIII/LAK was also stable in isooctane (log P 4.35), *n*-heptane (log P 4.0) and *n*-hexane (log P 3.5), maintaining more than 80% of its activity after 8 h incubation at 35 °C. For LAK immobilized in CHT, CHT/GA and CHT/APIII the hydrolysis activities against tricapriline in hexane were 5 U g^{-1}, 153 U g^{-1} and 156 U g^{-1}, respectively. Among the three enzyme preparations evaluated, the esterification activities were 3.2 U g^{-1}, 44 U g^{-1} and 124 U g^{-1}, respectively, in the synthesis of ethyl oleate in *n*-hexane, with 5%, 47% and 72% conversion in 6 h at 40 °C. The derivatives CHT/GA/LAK and CHT/APIII/LAK were used to catalyze reactions in solvent-free systems, in the synthesis of ethyl cinnamate, an aroma ester, obtaining conversions of 59% and 83%, respectively, in 40 h at 50 °C. The immobilized derivatives CHT/GA/LAK and CHT/APIII/LAK were used in the kinetic resolution of alcohols (*RS*)-1-phenylethanol and (*RS*)-1-phenylpropanol via transesterification reactions with vinyl acetate. Excellent values of enantiomeric excess (ee> 95%) and enantioselectivity coefficient (E> 200) for the (*R*) isomers of both evaluated substrates were obtained. The results reported in this work are promising, complement the literature and support future studies for the development of applications of chitosan and polyaldehyde starch in biocatalysis.

Keywords: Lipases, Immobilization, Chitosan, Polyaldehyde Starch, Biocatalysis, Kinetic resolution of racemates

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA TRIOLEÍNA CATALISADA POR LIPASES 15
FIGURA 2 – MODELO ESTRUTURAL DE α/β HIDROLASES. 16
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICERÍDEO CATALISADA POR LIPASES 18
FIGURA 4 – APLICAÇÃO DA REGRA DE CAHN, INGOLD E PRELOG (1966) PARA A NOMENCLATURA DE ENANTIÔMEROS 19
FIGURA 5 – (A) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS RÁPIDA E (B) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS LENTA NO MODELO DO SÍTIO ATIVO PARA LIPASES (KAZLAUSKAS et al.,1991). 20
FIGURA 6 – RESOLUÇÃO CINÉTICA DE (*RS*)-3-HIDROXI-4-TOSILOXIBUTANONITRILA PARA A PRODUÇÃO DE (*R*)-Γ-AMINO-B-HIDROXIBUTÍRICO (GABOB) E (*R*)-CARNITINA CATALISADA PELA LIPASE de *Pseudomonas fluorescens* (AK) livre 25
FIGURA 7 – RESOLUÇÃO CINÉTICA DE *terc*-BUTIL (*RS*)-3-(HIDROXIMETIL)-3,4-DIHIDROQUINOLINA-1(2H)-CARBOXILATO PARA A PRODUÇÃO DE ARGATROBANA CATALISADA PELA LIPASE de *Pseudomonas fluorescens* (AK) livre 26
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS 27
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DA QUITINA, QUITOSANA E CELULOSE 30
FIGURA 10 – EXEMPLOS DE MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA QUITOSANA. 31
FIGURA 11 – PRINCIPAIS MÉTODOS DE RETICULAÇÃO DA QUITOSANA 32
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO PROPOSTO DA CLIVAGEM GLICOLÍTICA DO AMIDO 34
FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DA (A) AMILOSE E (B) AMILOPECTINA 37
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE REDUÇÃO DA PROPIOFENONA 51
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS **1** E **1a** UTILIZADOS COMO PADRÕES CROMATOGRÁFICOS. 55

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS **2** E **2a** UTILIZADOS COMO PADRÕES CROMATOGRÁFICOS. 55
FIGURA 177 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO AMIDO POLIALDEÍDICO 58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SELEÇÃO DE ESTUDOS RECENTES SOBRE A UTILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS (Continua) 23
TABELA 2 – AGENTES RETICULANTES MACROMOLECULARES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS 36
TABELA 3 – AMIDO POLIALDEÍDICO COMO AGENTE RETICULANTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS 40
TABELA 4 – TEOR ALDEÍDICO E GRAU DE OXIDAÇÃO OBTIDOS APÓS A OXIDAÇÃO DO AMIDO 57
TABELA 5 – EFEITO DAS CARACTERÍSTICAS DO SUPORTE NOS PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO E NA ATIVIDADE DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* 67
TABELA 6 – EFEITO DA CARGA DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE E NA RETENÇÃO DE ATIVIDADE DOS DERIVADOS IMOBILIZADOS 69
TABELA 7 – ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DOS DERIVADOS IMOBILIZADOS 74
TABELA 8 – ESTUDOS SOBRE O USO DE LIPASES IMOBILIZADAS NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA 74
TABELA 9 – EXEMPLOS DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO CINÂMICO CATALISADAS POR LIPASES (Continua) 79
TABELA 10 – REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA DOS COMPOSTOS (*RS*)-**1** E (*RS*)-**2** MEDIADAS PELA LIPASE IMOBILIZADA DE *Pseudomonas fluorescens* 83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1 LIPASES 15
2.1.1 Definição e características de lipases 15
2.2 ESTRUTURA DE LIPASES 15
2.2.1 As lipases de *Pseudomonas fluorescens* 16
2.2.2 Mecanismo de catálise 17
2.2.3 Reconhecimento quiral por lipases 19
2.2.4 Resolução cinética de racematos catalisada pela lipase de *Pseudomonas. fluorescens* 20
2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS 26
2.4 QUITOSANA 29
2.5 AGENTES RETICULANTES MACROMOLECULARES 33
2.6 AMIDO POLIALDEÍDICO COMO AGENTE RETICULANTE 37
3 OBJETIVOS 40
3.1 OBJETIVO GERAL 40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 40
4 MATERIAIS E MÉTODOS 42
4.1 MATERIAIS 42
4.2 PREPARAÇÃO DO AMIDO POLIALDEÍDICO (AP) 42
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALDEÍDICO 43
4.4 PREPARAÇÃO E ATIVAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA 44
4.4.1 Preparação das microesferas de quitosana 44
4.4.2 Ativação das esferas de quitosana com amido polialdeídico 44
4.4.3 Ativação das microesferas de quitosana com glutaraldeído 44
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES 45
4.5.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR) 45
4.5.2 Determinação de grupos amino livres na quitosana reticulada e determinação do grau de intercruzamento (crosslinking) 45
4.5.3 Determinação da área superficial 46
4.5.3 Determinação da distribuição do tamanho dos poros 47
4.6 ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE 48
4.6.1 Imobilização em suportes à base de quitosana 48
4.6.2 Cinética de imobilização 48

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS PREPARADOS IMOBILIZADOS 49
4.7.1 Atividade de hidrólise em meio orgânico 49
4.7.2 Estabilidade em solventes orgânicos 50
4.7.3 Estabilidade à temperatura 50
4.7.4 Atividade de esterificação 50
4.7.5 Aplicação dos derivados imobilizados na síntese do éster cinamato de etila 51
4.8 RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS 51
4.8.1 Síntese do substrato racêmico (*RS*)-1-fenilpropanol 51
4.8.2 Resolução cinética dos substratos (*RS*)-1-feniletanol e (*RS*)-1-fenilpropanol 51
4.9 MÉTODOS ANALÍTICOS 52
4.9.1 Método Titulométrico (pH-Stat) 52
4.9.2 Método de Lowry-Tinsley 53
4.9.3 Determinação de proteínas 53
4.9.4 Cromatografia em fase gasosa em coluna quiral 54
4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS 56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO POLIALDEÍDICO 57
5.1.1 Determinação do teor aldeídico 57
5.1.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do amido polialdeídico 58
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES À BASE DE QUITOSANA 59
5.2.1 Caracterização macroscópica 59
5.2.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da quitosana reticulada e não-reticulada 61
5.2.3 Efeito dos agentes reticulantes no grau de reticulação da quitosana 63
5.2.4 Determinação da área superficial e diâmetro do poro 64
5.3 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUPORTES À BASE DE QUITOSANA 66
5.3.1 Efeito da composição do suporte na imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* 66
5.3.2 Efeito da carga de proteína 68
5.3.3 Estabilidade à temperatura 69
5.3.4 Estabilidade em solventes orgânicos 70
5.3.5 Aplicação da lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada na síntese do oleato de etila 72

5.3.6 Aplicação da lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada na síntese do cinamato de etila 76
5.3.7 Aplicação da lipase de *Pseudomonas. fluorescens* imobilizada na resolução cinética de (*RS*)-1-feniletanol e (*RS*)-1-fenilpropanol 83
6 CONCLUSÕES 85
7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 86
APÊNDICE A 87
REFERÊNCIAS 88

1 INTRODUÇÃO

A biocatálise constitui uma área em constante ascensão, pois representa uma das ferramentas mais promissoras na solução de diversos problemas do mundo moderno, como a obtenção de combustíveis de fontes renováveis, otimização dos processos de química fina e obtenção de novos medicamentos, entre outros (WU et al., 2020). Na indústria farmacêutica, aproximadamente 80% dos fármacos em desenvolvimento são quirais. Nesse contexto, as lipases têm recebido destaque, em especial na produção de compostos enantiomericamente puros via resolução cinética de racematos (SAWANT et al., 2016).

Entretanto, para o desenvolvimento destas aplicações, é recomendável que a lipase esteja imobilizada em um suporte sólido, pois a imobilização pode garantir a facilidade da separação do biocatalisador e dos produtos após a reação, além de possibilitar a reutilização da enzima e melhorar a sua atividade e estabilidade no meio reacional, aquoso ou solvente orgânico (ALNOCH et al., 2020).

Uma etapa importante para a obtenção de biocatalisadores imobilizados é a seleção do suporte e do método de imobilização que permitam obter um biocatalisador ativo e com boa estabilidade térmica e química. Lipases têm sido imobilizadas em diferentes suportes de natureza biopolimérica, como alginato, amido, agarose e quitosana, empregando algumas técnicas como adsorção, aprisionamento em gel e ligação covalente. Durante a última década, vários suportes para imobilização de lipases por ligação covalente foram investigados com o objetivo de obter derivados termoestáveis e com elevada atividade catalítica, entre eles, as microesferas de quitosana.

A quitosana apresenta grupos amino e hidroxila que podem ser quimicamente modificados, e com isto, estes suportes são capazes de reagir com diferentes grupos nucleofílicos da enzima, tais como amino, hidroxila ou tiol, via ligação covalente multipontual, com mínima modificação química da proteína (MATEO et al., 2004; BETANCOR et al., 2006). Nestes trabalhos, o principal agente e utilizado para modificar a quitosana e promover a ligação covalente com a enzima é o glutaraldeído. No entanto, alguns estudos apontam as desvantagens da utilização deste reagente devido à sua toxicidade; além disso, em consequência do seu pequeno tamanho, o glutaraldeído pode reagir com resíduos de lisina do sítio ativo de algumas enzimas, levando à sua inativação (SOJITRA et al., 2017).

Para superar os problemas relacionados ao glutaraldeído, alguns agentes reticulantes constituídos por moléculas maiores vêm sendo utilizados, como por exemplo, os polialdeídos derivados de dextrana, alginatos, pectina e amido. A grande vantagem destes agentes reticulantes é que, devido ao seu tamanho, não penetram no sítio ativo da enzima e assim, não

afetam a atividade catalítica; outra vantagem é atribuída à característica de "braço espaçador", fator que permite um espaçamento maior entre o suporte e a enzima, que resulta na redução das interações diretas e indesejáveis dos grupos funcionais do suporte com a enzima e melhora a flexibilidade do complexo enzima-suporte (ROJAS et al., 2019). Além disso, os carboidratos, por conterem muitos grupos hidroxila, possuem forte capacidade de retenção de água e podem modificar o microambiente ao redor da enzima mantendo sua conformação ideal (ABD-ELHAKEEM et al., 2014).

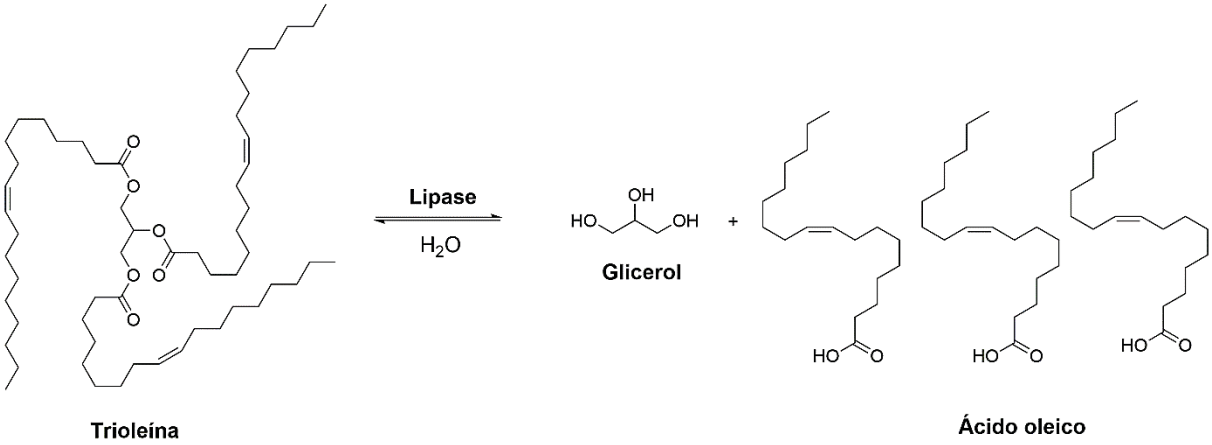
Dentro deste cenário, o objetivo principal deste trabalho foi preparar e selecionar derivados imobilizados estáveis da lipase de *Pseudomonas fluorescens* a partir de quitosana modificada com polialdeído de amido para utilização na síntese de ésteres com aplicação na indústria de combustíveis e de alimentos, e na resolução cinética de álcoois secundários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LIPASES

2.1.1 Definição e características de lipases

Lipases (EC 3.1.1.3) são carboxilesterases definidas classicamente como enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos de ácidos carboxílicos de cadeia longa, formando ácidos graxos, diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol (Figura 1) (ARPIGNY e JAEGER, 1999; KAPOOR e GUPTA, 2012).



Fonte do autor

FIGURA 1 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA TRIOLEÍNA CATALISADA POR LIPASES

Lipases podem catalisar diferentes reações dependendo dos reagentes de partida ou do solvente utilizado. Com isso, além da água, outros compostos podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por lipases, como álcoois, tióis e aminas. Desta forma, estas enzimas podem catalisar reações como aminólise, tiotransesterificação, peroxidação, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (JAEGER et al.,1994; GOTOR-FERNÁNDEZ e GOTOR, 2007).

2.2 ESTRUTURA DE LIPASES

As lipases apresentam uma estrutura terciária com dobramento a/b hidrolase (Figura 2). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo formado por uma folha b central, consistindo em oito diferentes fitas b (b1-b8), conectadas com seis a hélices (A-F). As fitas b têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre

si (SCHRAG e CYGLER, 1997). O sítio ativo das lipases é formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos serina, ácido aspártico ou glutâmico, e histidina. A serina catalítica, localizada no C-terminal da fita b5, faz parte de um pentapeptídeo altamente conservado, GX_1SX_2G, onde G é glicina, S é serina; X_1 é histidina e X_2 é ácido aspártico ou glutâmico (ARPIGNY e JAEGER, 1999).

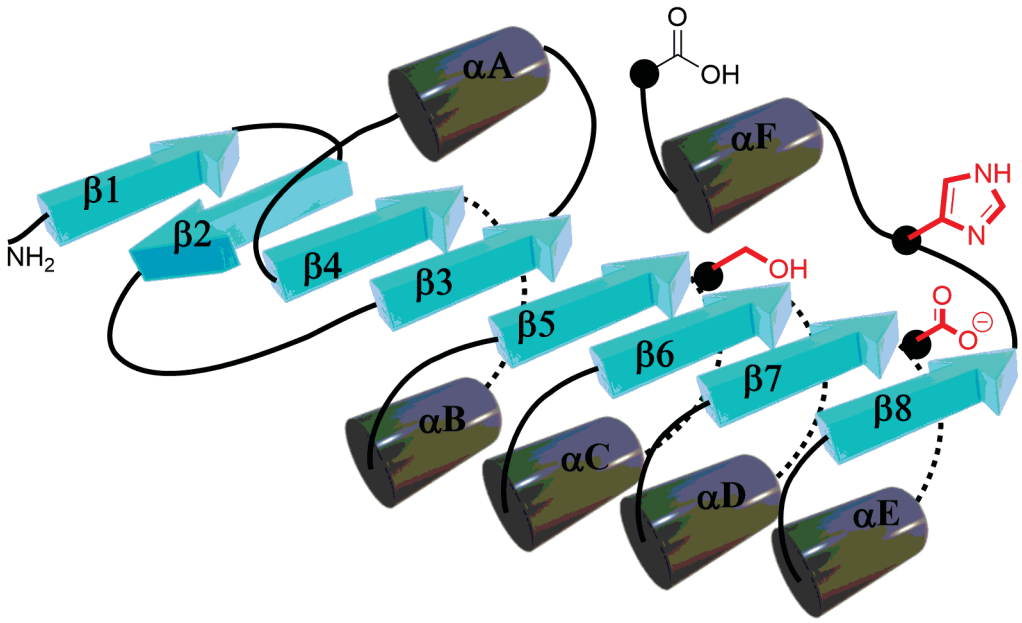


FIGURA 2 – MODELO ESTRUTURAL DE □□□ HIDROLASES.
Adaptado de CASAS-GODOY et al. (2018).

Do ponto de vista estrutural, para a ligação com o substrato, além da região catalítica, existe uma estrutura peptídica móvel que cobre o sítio ativo da maioria das lipases, chamada região da tampa hidrofóbica ou *lid*. Em lipases, esta estrutura está presente na posição b8 (Figura 2), prolongando-se sobre o conjunto central de fitas b e sobre o sítio catalítico. Sua função é promover a interação com a interface lipídeo-água no fenômeno de ativação interfacial, pelo qual a *lid* sofre uma mudança conformacional expondo o sítio ativo, favorecendo a ligação com o substrato (ARPIGNY e JAEGER, 1999).

2.2.1 As lipases de *Pseudomonas fluorescens*

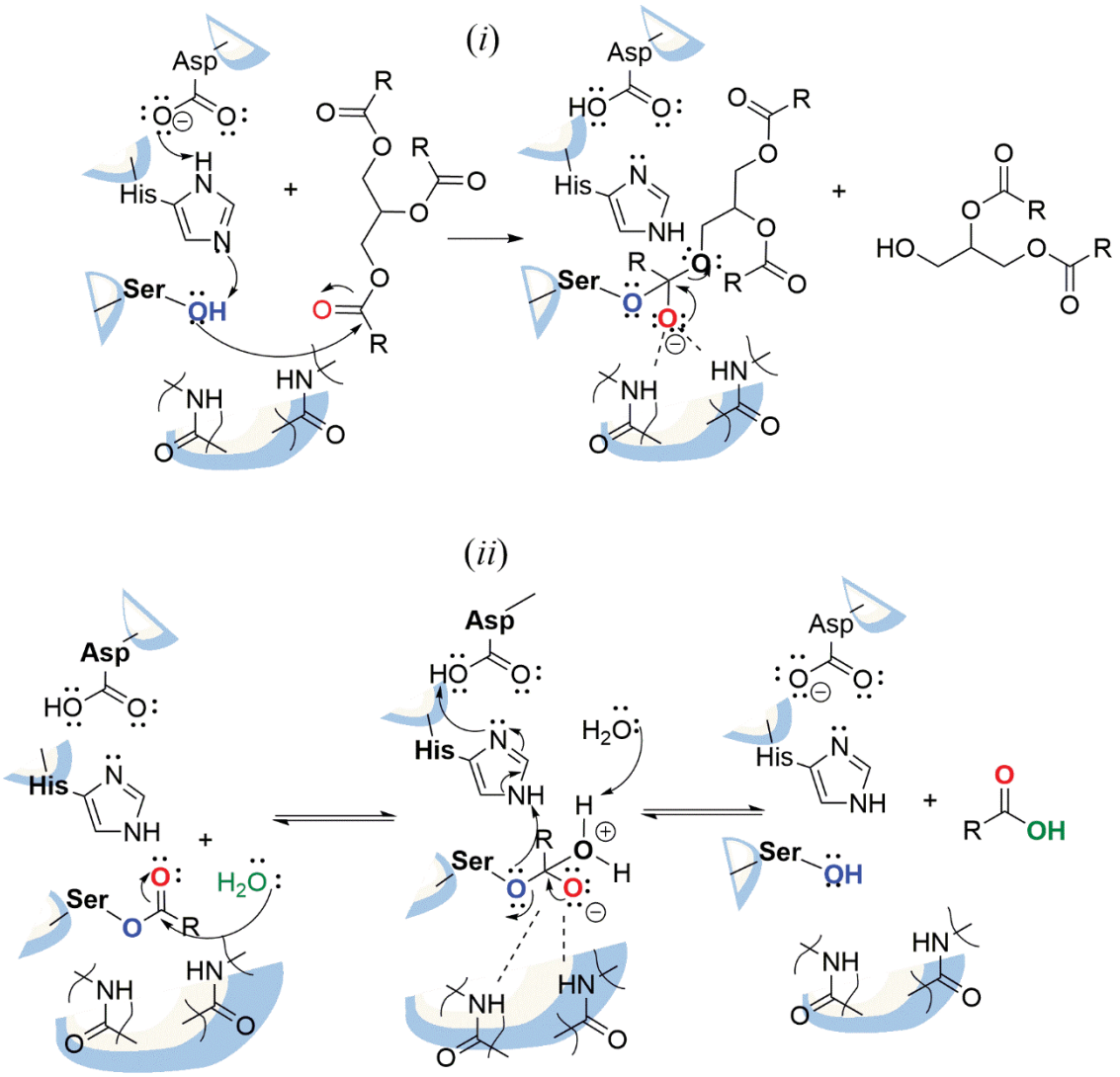
As bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem uma variedade de lipases que são amplamente utilizadas em biocatálise (ROSENAU e JAEGER, 2000). Em 1992, algumas espécies de microrganismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram transferidos para o novo gênero *Burkholderia*, que inclui as espécies *B. cepacia* e *B. glumae* (COENYE et al.,

2001). Deste gênero, comercialmente estão disponíveis as lipases Amano PS e Lipase AH de *B. cepacia*, e as lipases AK, AYS e 56P, de *Pseudomonas fluorescens*. Em síntese orgânica, cada uma apresenta potencial de aplicação na produção de compostos com alto valor agregado.

A lipase utilizada neste trabalho, denominada LAK, foi originalmente isolada de uma amostra de solo de uma plantação de arroz no Japão, por Kojima e colaboradores em 1994, sendo a cepa de *P. fluorescens* identificada como AK102. Como resultado, foi produzida uma lipase de 33 kDa, capaz de hidrolisar triglicerídeos com diferentes comprimentos de cadeia, em condições alcalinas e com alta concentração de surfactantes. Devido a estas propriedades, a lipase de *P. fluorescens* AK102 foi disponibilizada comercialmente primeiramente como ingrediente para sabão em pó (KOJIMA et al., 1994). Atualmente, LAK é fornecida pela Amano, e é uma das lipases bacterianas mais utilizadas, tanto para preparação do biodiesel quanto para a resolução cinética enzimática de álcoois secundários (RIOS et al., 2018).

2.2.2 Mecanismo de catálise

As lipases seguem um mecanismo catalítico de hidrólise semelhante àquele já estabelecido para outras serina-hidrolases, como a quimotripsina (Figura 3).



Fonte do autor

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICERÍDEO CATALISADA POR LIPASES

A hidrólise do triglicerídeo ocorre em duas etapas: (*i*) inicialmente, o resíduo de histidina aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila do resíduo de serina do sítio catalítico. Ocorre, então, um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico do grupo éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico (CEN et al., 2019). O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas ligações de hidrogênio formadas com as ligações amida entre os resíduos de aminoácidos específicos, localizados na cavidade oxiânion. Um álcool é liberado, como grupo abandonador, deixando um complexo acil-enzima. Em um segunda etapa, (*ii*) o intermediário acil enzima sofre um ataque nucleofílico por uma molécula de água, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (SMITH et al., 1992; CEN et al., 2019).

2.2.3 Reconhecimento quiral por lipases

A cavidade catalítica de uma lipase, local onde ocorre a reação, contém a tríade catalítica e sítios de ligação dos substratos. Para que ocorra a catálise, são necessárias interações específicas da lipase com o substrato, o que é crucial para o reconhecimento de substratos quirais (SCHULZ et al., 2000).

A quiralidade é uma propriedade geométrica de compostos: uma molécula que não pode ser sobreposta à sua imagem especular é quiral, enquanto uma molécula aquiral é aquela em que sua imagem especular pode ser sobreposta à original sem a quebra e formação de ligações. Assim, compostos que não possuem elemento de simetria no arranjo espacial de seus grupos ligantes, ou seja, que apresentam centro assimétrico, irão apresentar-se na forma de estereoisômeros. Este elemento de simetria frequentemente é o carbono tetraédrico no qual estão ligados quatro diferentes grupamentos, ou seja, o carbono estereogênico. Os estereoisômeros são divididos em diastereoisômeros, cujas moléculas possuem diferentes arranjos espaciais de seus ligantes, porém não são imagens especulares sobreponíveis umas das outras, e enantiômeros, nos quais a molécula apresenta a geometria e a disposição espacial de seus átomos igual à imagem especular do seu par complementar, sendo que somente compostos quirais apresentam esta característica (CAREY; SUNDBERG, 2007).

De acordo como o arranjo espacial, os enantiômeros recebem os prefixos *R* ou *S*, seguindo o sistema de nomenclatura desenvolvido em 1966 pelos químicos Cahn, Ingold e Prelog (Figura 4), baseado nas prioridades dos grupos substituintes ligados ao centro assimétrico, e adotado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Por esta regra, os grupos substituintes no centro estereogênico são assinalados pela diminuição da prioridade, de forma que: 1 > 2 > 3 > 4 (CAHN et al., 1966).

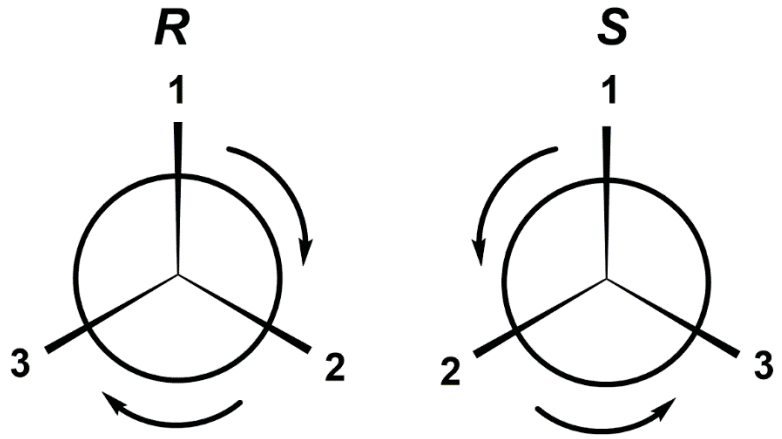
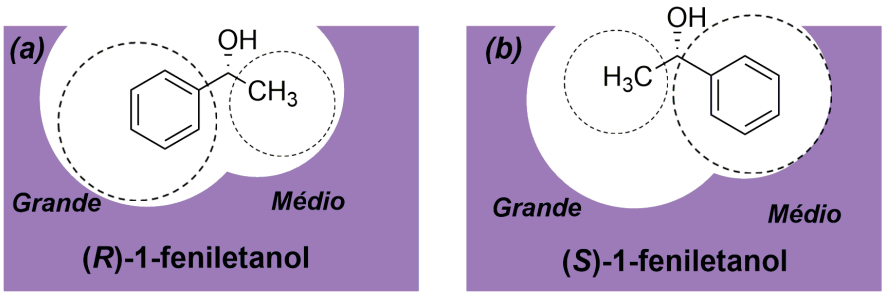


FIGURA 4 – APLICAÇÃO DA REGRA DE CAHN, INGOLD E PRELOG (1966) PARA A NOMENCLATURA DE ENANTIÔMEROS

O esquema é baseado nas prioridades dos grupos substituintes ligados ao centro assimétrico, onde 1, 2 e 3 representam os grupos substituintes e *R* e *S* são as configurações dos enantiômeros

Para entender o reconhecimento quiral e prever se a lipase será enantiosseletiva, existem modelos que descrevem o mecanismo da enantiosseletividade. Alguns modelos são baseados em cavidades que definem o formato e o caráter hidrofóbico do sítio ativo e fornecem uma indicação do tamanho e formato dos substratos que serão preferencialmente acomodados e reconhecidos pela enzima.

Um exemplo é a regra de Kazlauskas, estabelecida no início da década de 1990 para explicar o reconhecimento de álcoois secundários por lipases. A regra é descrita através de um modelo de sítio ativo em que o arranjo estrutural consiste em dois bolsões de tamanhos diferentes, um grande e um médio (Figura 5) (KAZLAUSKAS et al., 1991). Esta regra permite prever qual dos enantiômeros reagirá mais rapidamente de acordo com o tamanho dos grupos que compõem o centro de quiralidade, quanto mais distintos forem os volumes desses grupos, maior será a enantiosseletividade da lipase.



Fonte do autor

FIGURA 5 – (A) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS RÁPIDA E (B) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS LENTA NO MODELO DO SÍTIO ATIVO PARA LIPASES (KAZLAUSKAS et al.,1991).

Para substratos contendo um substituinte médio e um volumoso, por exemplo, um álcool secundário, como o (*R*)-1-feniletanol, a enantiosseletividade é explicada assumindo que, quando o substrato é submetido à resolução por uma lipase, o enantiômero que reage mais rapidamente (*R*) se liga ao sítio ativo de maneira produtiva (Figura 5); no entanto, quando o outro enantiômero reage (*S*), ele é forçado a acomodar improdutivamente seu substituinte volumoso na cavidade menor. Desta forma, o impedimento estérico entre o substituinte grande e o bolsão do sítio ativo menor supostamente dificulta o acesso à tríade catalítica, diminuindo a velocidade de reação para este enantiômero.

2.2.4 Resolução cinética de racematos catalisada pela lipase de *Pseudomonas. fluorescens*

Exemplos de resolução cinética de álcoois secundários estão apresentados na Tabela 1. Entre os exemplos, a lipase de *P. fluorescens* foi utilizada nas formas livre e imobilizada. Foram relatados trabalhos visando a utilização da enzima livre em resolução cinética de compostos contendo o anel fenotiazínico, um bloco construtor de muitos compostos orgânicos com atividades biológicas, presente em medicamentos anti-histamínicos, antipsicóticos, anticolinérgicos, antieméticos, anti-inflamatórios, sedativos ou citostáticos, assim como na resolução cinética do atenolol e metoprolol, que pertencem ao grupo dos beta bloqueadores, uma classe de medicamentos utilizados principalmente para o tratamento de doenças cardiovasculares. Ainda com a enzima livre, foi realizada a acetilação seletiva de *DL*-mentol a partir da mistura de 8 isômeros com acetato de vinila. A escala do processo foi aumentada 400 vezes (de 5 mL para 2 L) em reatores de tanque agitado, com conversão de 30% em *L*-mentol, com uma razão enantiomérica de 65 e um excesso diastereomérico (de) de 82% (BRADY et al., 2012); a enzima livre foi reciclada 38 vezes nesta escala.

Com a lipase imobilizada (Tabela 1), foram relatados estudos utilizando Celite como suporte de imobilização, para resolução cinética de de (*RS*)-2-hidroxi-1-indanona com butirato de vinila e a racemização de (*S*)-2-hidroxi-1-indanona. Ao se combinar as duas reações, obteve-se o butirato de (*R*)-1-oxo-indan-2-ila, com ee_p 92%, e conversão de 90%.

A lipase de *P. fluorescens* foi imobilizada por ligação covalente em nanofibra de carbono funcionalizada com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e *N*-hidroxisuccinimida (EDC/NHS), o derivado foi utilizado na resolução cinética do (*RS*)-1-feniletanol, utilizando acetato de vinila como doador acila. O efeito da temperatura na reação foi estudado entre 25 e 95 °C. Quando incubada em THF, a enzima livre foi estável até 55 °C, enquanto a enzima imobilizada foi estável até 85 °C. O (*S*)-1-feniletanol não consumido na reação de resolução, com ee_s de 99% foi utilizado na síntese do anestésico (*R*)-carboetomidato a partir da reação de Mitsunobu (DWIVEDEE et al., 2019), esta reação converte um álcool em uma variedade de grupos funcionais, tais como um éster, éteres fenílicos utilizando trifenilfosfina e azodicarboxilato de dietila (DEAD), o álcool é submetido a uma inversão da estereoquímica.

Nos exemplos mostrados na Tabela 1, pode ser observada a alta enantiopreferência da lipase de *P. fluorescens*, seja pelo alto valor de excesso enantiomérico de produto, e alto valor de E (>200), quanto pela diversidade de substratos utilizados.

TABELA 1 – SELEÇÃO DE ESTUDOS RECENTES SOBRE A UTILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS (Continua)

Suporte/Tipo de imobilização	**Substrato racêmico**	**Condições da reação**	**Produto**	**Conversão (%)**	**ee_p (%)**	**Referência**
Celite (adsorção)	(*RS*)-2-Hidroxi-1-indanona	Butirato de vinila, MTBE, 24 h, 40 °C.	Butirato de (*R*)-1-*O*-indan-2-ila	45	92	(LÅNGVIK et al., 2010)
Enzima livre	Álcoois secundários contendo grupo fenotiazinil	Acetato de vinila, 24 h, a 25 °C	Acetato de (*R*)-1-(10-etil-10H-fenotiazin-3-il) etila	50	99	(BREM et al., 2010)
Enzima livre	*DL*-Mentol	Acetato de vinila, *n*-heptano.24 h, 50 °C	Acetato de *L*-mentila	30	95	(BRADY et al., 2012)
Esferas de seda-alginato (aprisionamento)	Haloidrinas.	Acetato de vinila, *n*-hexano, 24 h, 32 °C	Acetato de (*S*)-2-cloro-1-feniletanol	28	98	(FERREIRA et al., 2014)
Enzima livre	(*RS*)-Atenolol	Acetato de vinila em THF, 45 °C	Acetato (*S*)-atenolol	50		(AGUSTIAN et al., 2016)
Enzima livre	(*RS*)-1-cloro-3-(4-(2-metoxietil)fenoxi)-propan-2-ol	Acetato de vinila, tolueno, 3 h, 30 °C	Acetato de (*R*)-1-cloro-3-(4-(2-metoxietil)fenoxi)-propan-2-ol	50	96	(SONI et al., 2017)

Suporte/Tipo de imobilização	Substrato racêmico	Condições da reação	Produto	Conversão (%)	ee_p (%)	Referência
Nanopartícula magnética (ligação covalente)	(*RS*)-indanol	Acetato de vinila, *n*-hexano, 1,75 h, 50 °C	(*S*)-indanol	50	99	(GALVÃO et al., 2018)
Nanofibra de carbono funcionalizada com EDC/NHS (ligação covalente)	(*RS*)-1-feniletanol	Acetato de vinila, THF, 25 °C.	Acetato de (*R*)-1-feniletila	49	99	(DWIVEDEE et al., 2019)
Estruturas metaloorgânicas (MOFs)	(*RS*)-Ácido 4-fluoromandélico	Acetato de vinila, MTBE, 12h, 50 °C.	Ácido (*S*)-2-*O*-acetil-2-(4-fluoromandélico)	46	98	(YUAN et al., 2020)

Tabela 1 – Conclusão

MTBE: Éter metil terc-butílico.

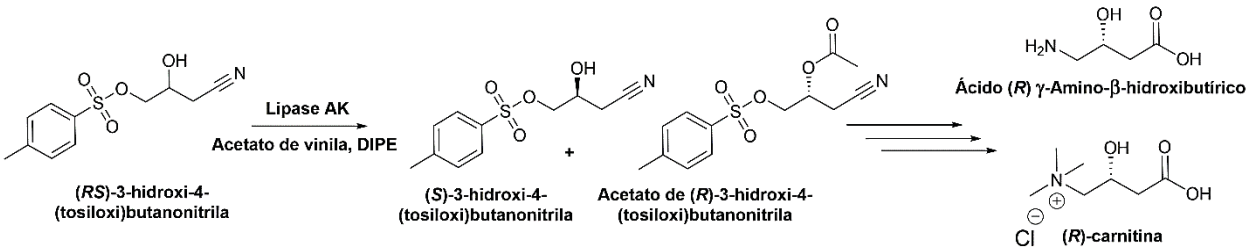
THF: Tetraidrofurano.

EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

NHS: N-Hidroxissuccinimida.

MOFs: Metal-Organic frameworks.

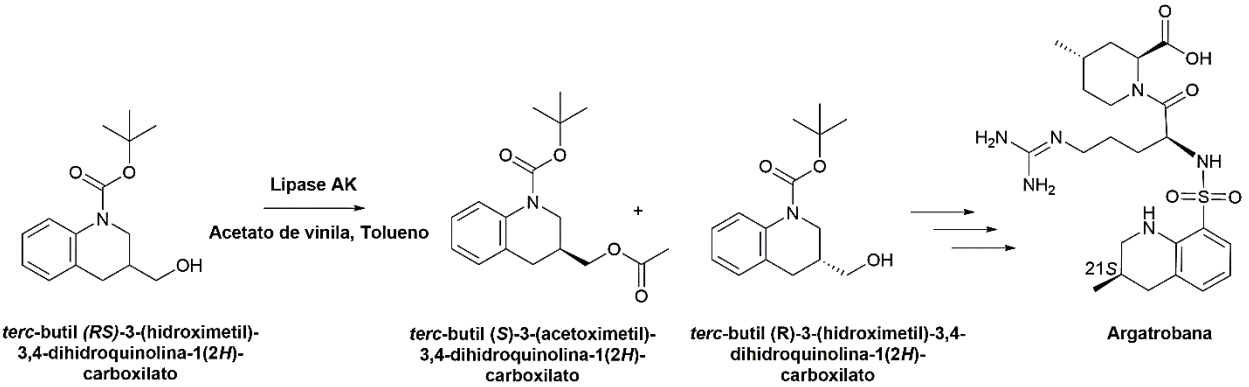
Além dos estudos apresentados na Tabela 1, dois processos de síntese quimioenzimática mediados pela lipase de *P. fluorescens* (AK), na forma livre, foram patenteados. O primeiro processo (US7816119B2) envolveu a resolução do racemato (*RS*)-3-hidroxi-4-(tosiloxi)butanonitrila em éter diisopropílico (DIPE) e produziu o (*S*)-álcool e (*R*)-acetato com alto excesso enantiomérico do produto R (ee_p > 99%) (Figura 6). Após o tratamento com amônia aquosa seguido de solução concentrada de HCl, o isômero (*R*)-acetato foi convertido em ácido (*R*)-γ-amino-β-hidroxibutírico (GABOB), que é um derivado do neurotransmissor GABA. Da mesma forma, o éster-(*R*), após reação com trimetilamina seguida pelo tratamento com solução concentrada de HCl, forneceu o cloreto de (*R*)-carnitina, que tem o papel fisiológico de garantir o transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citoplasma para o interior da mitocôndria (KAMAL et al., 2010).



Fonte do autor

FIGURA 6 – RESOLUÇÃO CINÉTICA DE (*RS*)-3-HIDROXI-4-TOSILOXIBUTANONITRILA PARA A PRODUÇÃO DE (*R*)-Γ-AMINO-B-HIDROXIBUTÍRICO (GABOB) E (*R*)-CARNITINA CATALISADA PELA LIPASE de *Pseudomonas fluorescens* (AK) livre

O segundo processo patenteado (EP3019623A1) utilizando a lipase de *P. fluorescens* (AK) livre envolveu a síntese enzimática dos precursores (*R*)- e (*S*)-3-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina, que são blocos do antitrombótico Argatrobana, utilizado como inibidor da trombina, uma protease que participa do processo de coagulação do sangue (Figura 7). A Argatrobana é uma mistura diastereoisomérica de epímeros (21*R*) e (21*S*), na qual o isômero (*21S*) é duas vezes mais potente que o isômero (*21R*). Neste processo, o éster-(*S*) foi obtido com ee_p >99% e uma conversão de 40% a 25 °C (GRISENTI, 2015).



Fonte do autor

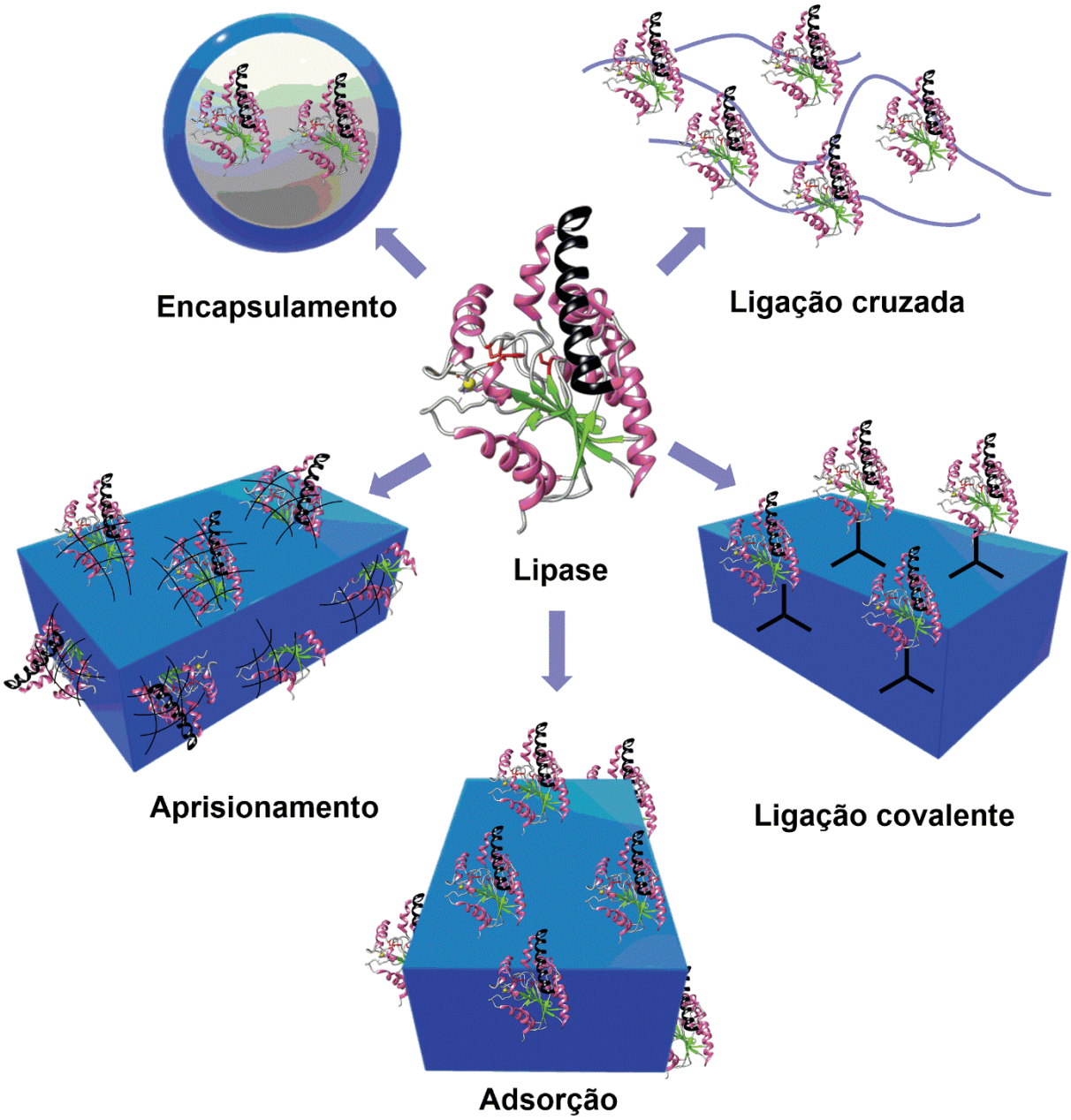
FIGURA 7 – RESOLUÇÃO CINÉTICA DE *terc*-BUTIL (*RS*)-3-(HIDROXIMETIL)-3,4-DIHIDROQUINOLINA-1(2H)-CARBOXILATO PARA A PRODUÇÃO DE ARGATROBANA CATALISADA PELA LIPASE de *Pseudomonas fluorescens* (AK) livre

Estes dois exemplos de processos patenteados utilizando a lipase AK na preparação fármacos enantiomericamente puros ou seus intermediários confirmam a importância de lipases na obtenção de compostos com alto valor agregado. Porém, nestes dois trabalhos, a lipase foi utilizada na sua forma livre. Vale a pena destacar que a imobilização permite a reutilização da enzima em vários ciclos tornando o processo mais eficaz e ajudar a reduzir o custo do processo.

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização consiste na fixação da enzima em um suporte sólido para possibilitar o aumento do tempo de vida útil do biocatalisador e posterior reutilização, para tornar o processo mais econômico.

Enzimas podem ser imobilizadas em um suporte por adsorção física, por ligações covalentes, por encapsulamento e por aprisionamento (Figura 8). Além desses métodos, a imobilização de enzimas pode ser feita na ausência de suporte por copolimerização entre as moléculas de proteína por ação de um agente reticulante, formando agregados de proteínas com ligações intercruzadas (CLEAs) (SHELDON e VAN PELT, 2013).



Fonte do autor

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

No método de imobilização por adsorção, a enzima se adere em um suporte inerte através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Este tipo de imobilização praticamente não causa modificação na estrutura nativa da enzima, se comparado aos outros tipos de imobilização, e por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A imobilização por encapsulação pode ser subdividida em: (i) confinamento por membranas, no qual a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação através de uma

película semipermeável, e que por sua vez pode ser subdividida em: (a) encapsulamento, onde a enzima é imobilizada no interior de esferas não-rígidas, cujo envoltório é constituído por um polímero geleiforme e semipermeável; ou (b) em membranas fibrosas semipermeáveis (SCHACHSCHAL et al., 2011; SAKR e BORCHARD, 2013), (ii) aprisionamento em matriz polimérica: neste caso, entre as malhas de um polímero geleiforme. A eficiência do método, a permeabilidade do gel e sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do polímero utilizado (SHARMA e SINGH, 2020).

Na imobilização por formação de ligação covalente, a enzima é ligada ao suporte por meio de ligações químicas covalentes, ou através de ligações cruzadas entre as moléculas de enzima, sem a necessidade de suporte, exemplos de tais preparações, incluem, cristais de enzimas unidos por ligações cruzadas (CLECs), enzimas reticuladas e agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), neste procedimento, a enzima é precipitada de uma solução aquosa pela adição de um sal, solventes orgânicos ou polímero orgânico miscível em água, tal como polietilenoglicol, em uma etapa subsequente, os agregados de enzima são reticulados com agentes bi- ou polifuncionais (SHELDON e VAN PELT, 2013). As ligações enzima-suporte ou enzima-agente reticulante são normalmente estabelecidas entre os grupos amino primários dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos de tais materiais. Como as interações entre a enzima e o suporte ou enzima-enzima são fortes, pode ocorrer perda da atividade causada por modificações na estrutura cataliticamente ativa da enzima (THANGARAJ e SOLOMON, 2019; BILAL et al., 2019).

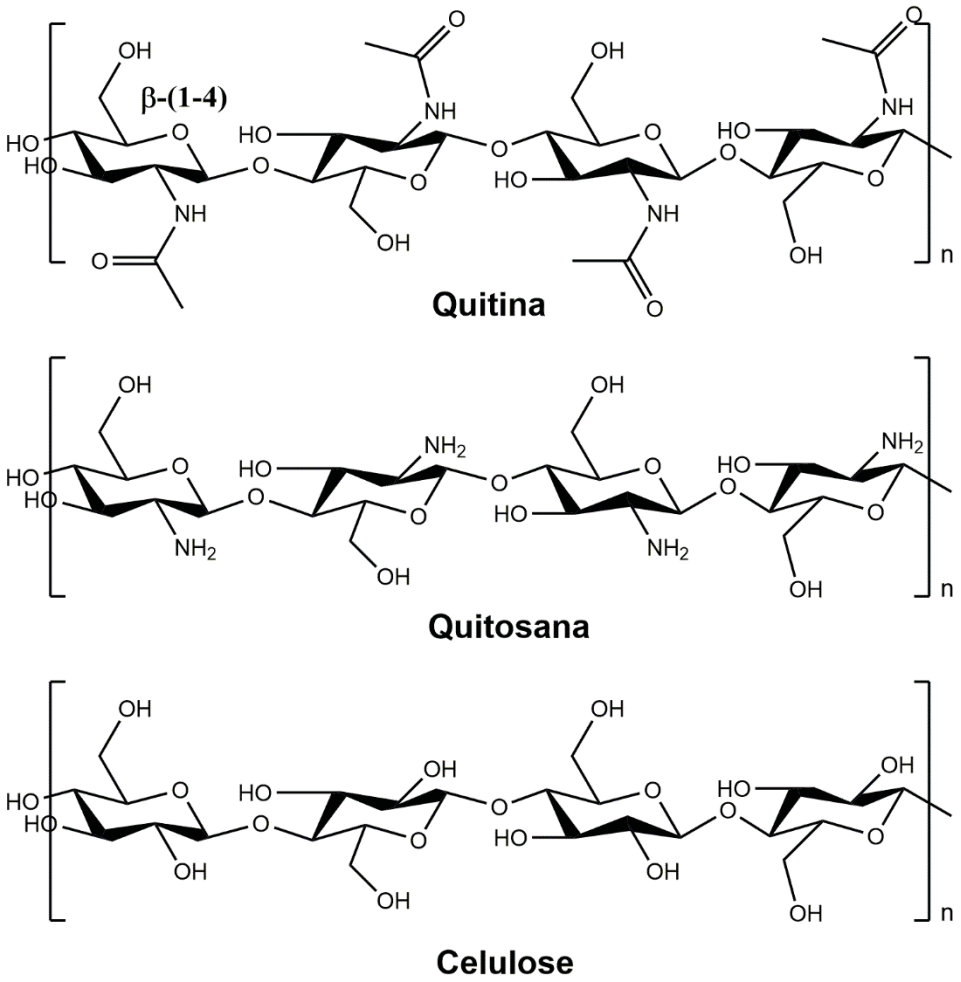
Embora não exista um suporte ou técnica que possa ser aplicada a todas as enzimas, uma série de características desejáveis devem ser comuns a qualquer material considerado para imobilizar enzimas (ZDARTA et al., 2018). Estas incluem, alta afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos funcionais reativos para modificações químicas, estabilidade química e mecânica, facilidade de preparação em diferentes morfologias (flocos, filmes, microesferas), permeabilidade e área de superfície adequada para a aplicação escolhida. Suportes podem ser classificados, de acordo com a sua natureza, como orgânicos e inorgânicos e, conforme sua estrutura, como materiais porosos, não-porosos e de estrutura de gel (WAHAB et al., 2020).

Para aplicações nas áreas de alimentos, farmacêuticas, médicas e agrícolas, a não toxicidade e a biocompatibilidade dos suportes também são necessárias. Além disso, para responder à crescente demanda por materiais ambientalmente corretos, os suportes devem ser biodegradáveis e baratos. Dos muitos suportes que foram considerados e estudados para imobilizar enzimas, orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, a quitosana é de grande interesse por oferecer a maioria das características citadas acima.

2.4 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da desacetilação da quitina, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (RINAUDO, 2006). As principais fontes de obtenção da quitosana são os rejeitos da indústria pesqueira, como carapaças de camarões, caranguejos e lagostas. Sua utilização para gerar produtos de interesse comercial, pois, reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo destes resíduos nos locais onde é produzido e armazenado (MENDES et al., 2011).

Quimicamente, a quitina é composta por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucose (ou *N*-acetil-D-glucosamina) ligadas linearmente por ligações do tipo β-(1 → 4). A quitina e a quitosana podem ser consideradas quimicamente como análogos da celulose, em que a hidroxila no carbono C2 foi substituída pelos grupos acetamido e amino, respectivamente (Figura 9). Os grupos hidroxila estão dispostos na estrutura geral dos três biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino, que confere propriedades especiais diferenciadas em relação à celulose (DUAN et al., 2015; DONGRE, 2017).



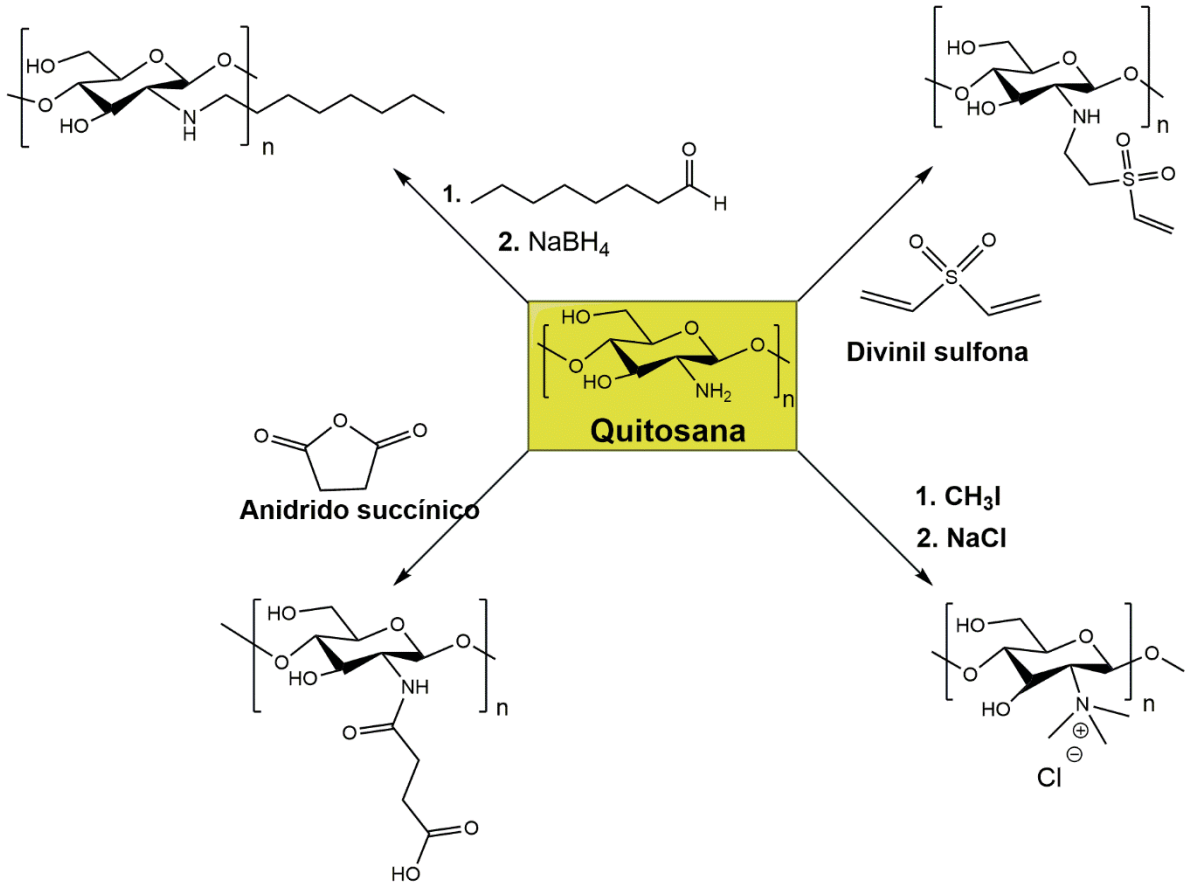
Fonte do autor

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DA QUITINA, QUITOSANA E CELULOSE

A estrutura da quitosana é constituída de unidades ß-(1→4)-2-amino-2-deoxi-Dglucopiranose e ß-(1→4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranose em proporções variáveis. Devido às fortes interações intermoleculares e regularidade estrutural, a quitosana é insolúvel em água, mas se dissolve em soluções ácidas diluídas, comportando-se como um polieletrólito. A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados (NH_3^+) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias, causando um aumento no volume hidrodinâmico do polímero e na viscosidade da solução. Quando uma solução de quitosana acidificada é misturada com soluções alcalinas (pH>9,0), há precipitação de quitosana em sua forma sólida. Este método é explorado para produzir membranas, fibras, mas principalmente microesferas de diferentes tamanhos e porosidades. Estes materiais podem ser obtidos pela adição de uma solução de quitosana gota a

gota a uma solução de NaOH, ou preparados em misturas de água-etanol, nas quais o etanol facilita a solidificação de grânulos de quitosana (HE et al., 2011; LU et al., 2015).

A presença de grupos reativos na estrutura da quitosana, tais como -NH_2 e -OH, possibilita diversas modificações químicas (Figura 10), responsáveis por mudanças nas propriedades físico-químicas do polímero e expansão dos seus campos de aplicação (VERMA et al., 2020).



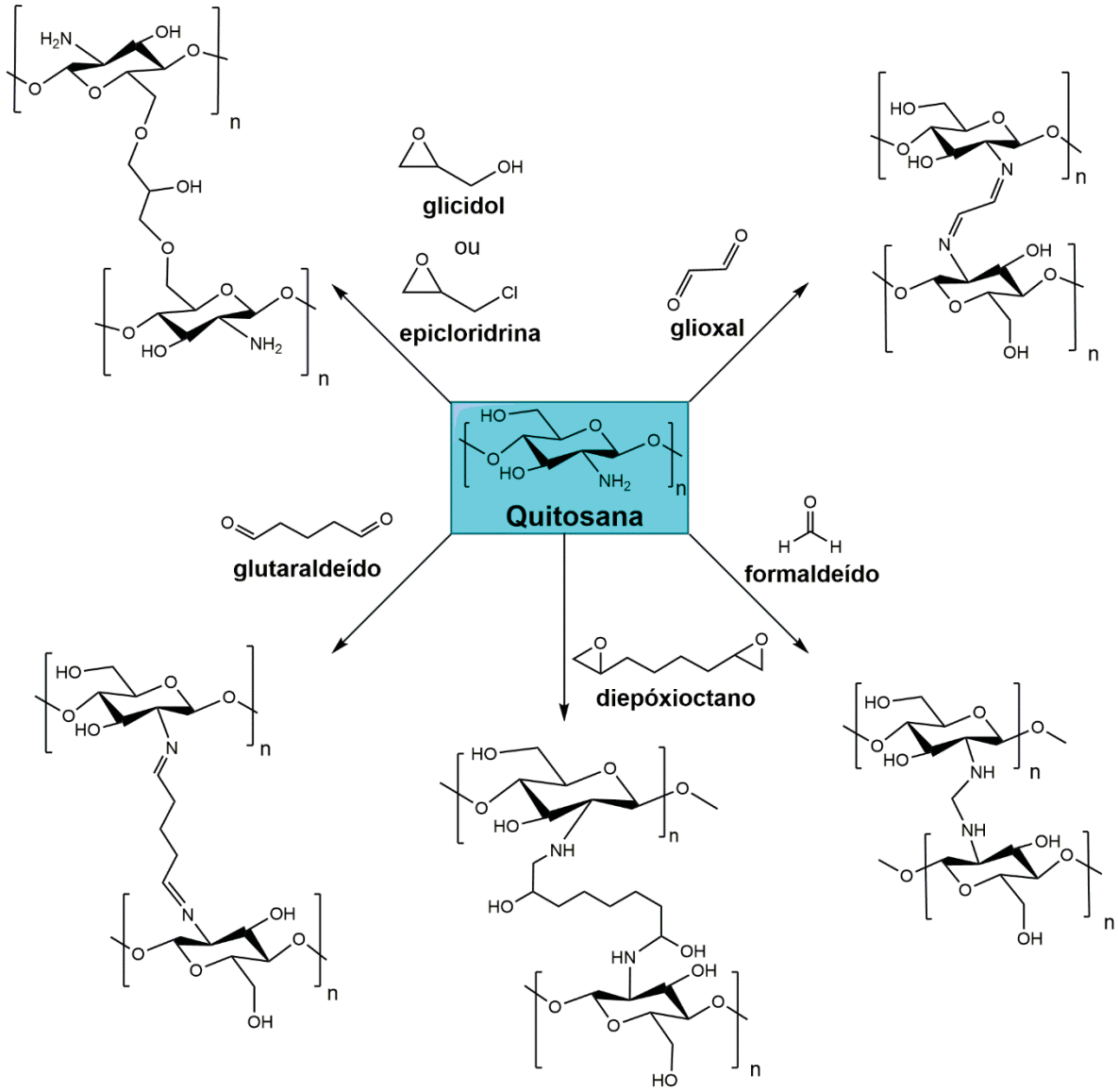
Fonte do autor

FIGURA 10 – EXEMPLOS DE MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA QUITOSANA.

Além dos tratamentos utilizados para modificar quimicamente a quitosana, outro método empregado é a reticulação. Em química de polímeros, o termo reticulação geralmente se refere ao uso de ligações cruzadas para promover uma mudança nas propriedades físicas dos polímeros. Neste trabalho, o processo tem como objetivo melhorar a resistência mecânica, alterar a hidrofobicidade, e tornar a quitosana quimicamente mais inerte e resistente ao meio ácido (THAKUR et al., 2014). A reticulação também sofre influência do tipo e da concentração do agente de *crosslinking* envolvido no processo, e também é responsável pela ativação do suporte, com a elevação do grau de reticulação, o excesso de grupamentos não reticulados, provenientes

do agente de ativação permite a ligação de biomoléculas na superfície do suporte, além disso, reduz-se a porosidade do material, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas (BERGER et al., 2004).

Na reticulação, as principais reações envolvidas são aquelas que empregam agentes bi- ou polifuncionais. Estas reações podem ser realizadas homogeneamente, adicionando-se o agente bifuncional à solução de quitosana, ou heterogeneamente, com a adição do agente à quitosana nas formas de filmes ou esferas. Os principais agentes utilizados são epicloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído e diepóxidos, formando estruturas bastante complexas (Figura 14) (GONSALVES et al., 2011; MELO et al., 2017; VAKILI et al., 2019).



Fonte do autor

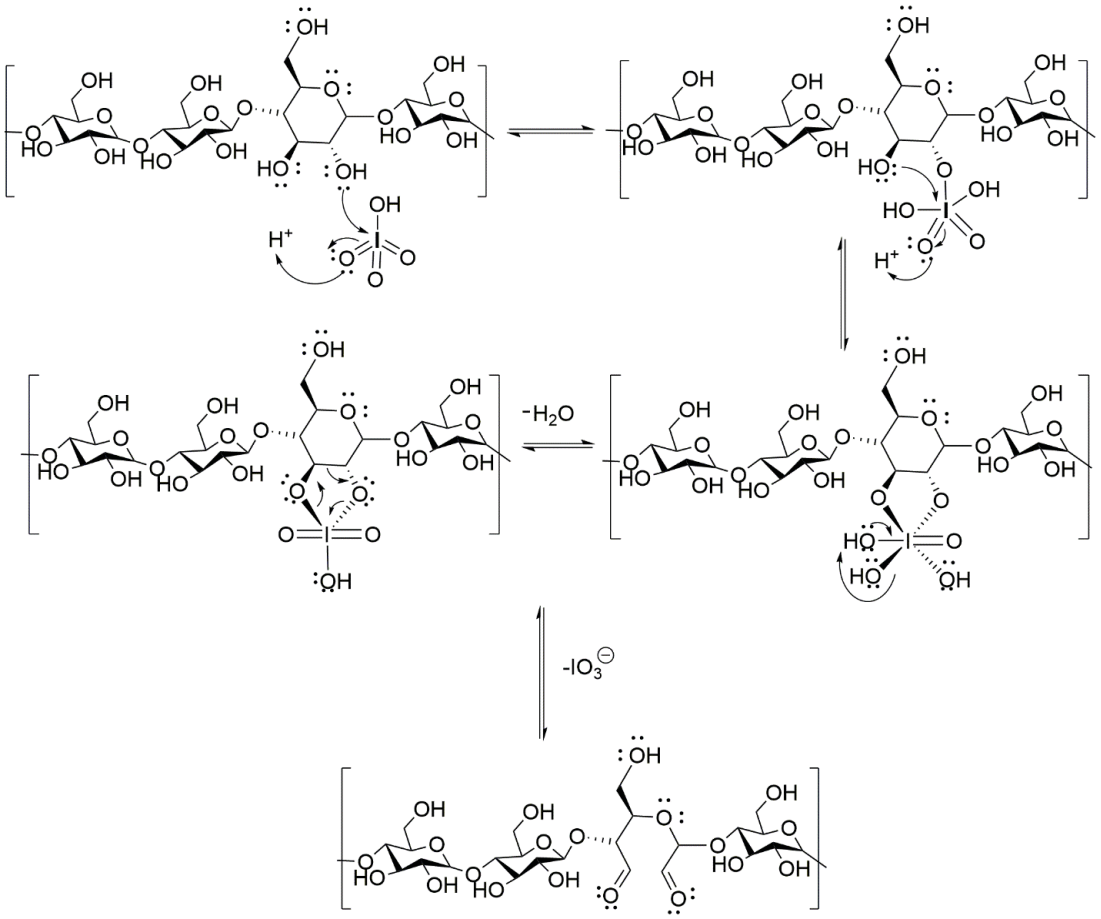
FIGURA 11 – PRINCIPAIS MÉTODOS DE RETICULAÇÃO DA QUITOSANA

O glutaraldeído (1,5-pentanodial) é amplamente utilizado para reticular materiais à base de quitosana pois é um reagente barato e estável em pH neutro a levemente alcalino. A ligação covalente entre o grupo amino e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído é muito estável e resiste a extremos de pH e temperatura (MONTEIRO e AIROLDI, 1999; KULKARNI et al., 2007). A reticulação normalmente é obtida utilizando-se um excesso de glutaraldeído (TAKIGAWA e ENDO, 2006). No entanto, moléculas como o glutaraldeído não podem ser empregadas para todas as enzimas, especialmente enzimas sensíveis a estes reagentes. Para resolver os problemas relacionados ao glutaraldeído, algumas abordagens alternativas foram estudadas utilizando agentes reticulantes macromoleculares.

2.5 AGENTES RETICULANTES MACROMOLECULARES

Nos últimos anos, os agentes reticulantes elaborados a partir de polissacarídeos têm recebido atenção em diferentes áreas, visto que algumas propriedades estruturais dos polissacarídeos podem ser modificadas para gerar di- ou polialdeídos, requisitos específicos de um agente reticulante (SKOPINSKA-WISNIEWSKA et al., 2016; MASINA et al., 2017). Um exemplo comum de modificação de polissacarídeos é a abertura do anel glicosídico nas ligações C2-C3 com periodato.

O uso do ânion periodato (IO_4^-), para clivagem oxidativa de polissacarídeos foi relatado pela primeira vez por León Malaprade, em 1928. Desde então, esta clivagem de glicol (1,2-diol) em meio aquoso é conhecida como oxidação de Malaprade, na qual o mecanismo envolve um intermediário cíclico que se decompõe para produzir dois grupos aldeído (Figura 12) (ZIEGLER-BOROWSKA et al., 2018).



Fonte do autor

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO PROPOSTO DA CLIVAGEM GLICOLÍTICA DO AMIDO

Embora os aldeídos não ocorram naturalmente em macromoléculas biológicas típicas, como carboidratos e proteínas, eles podem ser inseridos onde existam grupos de oxidáveis (açúcares redutores). Na literatura, existem alguns exemplos de utilização de polissacarídeos como agentes reticulantes (Tabela 2).

No trabalho de Villalonga e colaboradores (2000), a tripsina de pâncreas bovino foi ligada covalentemente por meio de ligações cruzadas com polialdeído de carboximetilcelulose via alquilação redutiva utilizando $NaBH_4$. A termoestabilidade e estabilidade ao pH foram melhoradas após a modificação. O derivado reticulado também foi mais resistente à ação do dodecilsulfato de sódio 0,3% (m v^{-1}), mantendo aproximadamente 30% da atividade inicial após 2 h de incubação. O derivado mostrou-se estável na presença de agentes desnaturantes, tais como ureia 8 M e cloreto de guanidínio 6 M, exibindo mais de 60% de atividade residual após 5 h de incubação nestes agentes. Esta modificação também protegeu a enzima contra autólise em pH alcalino e melhorou a estabilidade da enzima na presença de metanol.

Mateo e colaboradores (2004) empregaram a dextrana polialdeídica como agente de reticulação para a preparação de CLEAs a partir penicilina G acilase (PGA), hidroxinitrila liase, álcool desidrogenase e nitrilase, para substituir o glutaraldeído e evitar a inativação enzimática. Para as nitrilases a atividade recuperada foi entre 50% e 60%, enquanto o uso do glutaraldeído causou a completa inativação dessas enzimas. Da mesma forma, os agregados de PGA tiveram atividade final quase inalterada (aproximadamente 90% de recuperação), enquanto apenas 50% da atividade original foi recuperada ao utilizar glutaraldeído. O glutaraldeído, devido ao seu pequeno tamanho, acessa facilmente o sítio ativo da enzima e pode reagir com o resíduo de lisina, cataliticamente importante, levando à inativação. Além disso, as moléculas de glutaraldeído que não reagem podem permanecer no suporte e lixiviar para o meio contaminando a reação e os produtos, e assim, causar efeitos adversos para a saúde.

No trabalho de Ren e colaboradores (2013), para evitar a lixiviação da enzima do suporte, a dextrana polialdeídica (DA) foi utilizada como agente reticulante da lipase de *Candida rugosa* (CRL*)* previamente adsorvida em sílica porosa. Foi observado que, ao utilizar o suporte sem tratamento, a quantidade de enzima lixiviada foi de 37%, após 2 h de agitação em meio aquoso, enquanto para o derivado reticulado, a porcentagem de lixiviação foi menor que 5%, nas mesmas condições. Comparado a CRL livre, a tolerância ao pH de 4,0 a 8,0 e a estabilidade térmica de 40 a 80 °C do derivado imobilizado reticulado foram ambos melhorados em mais de 25%.

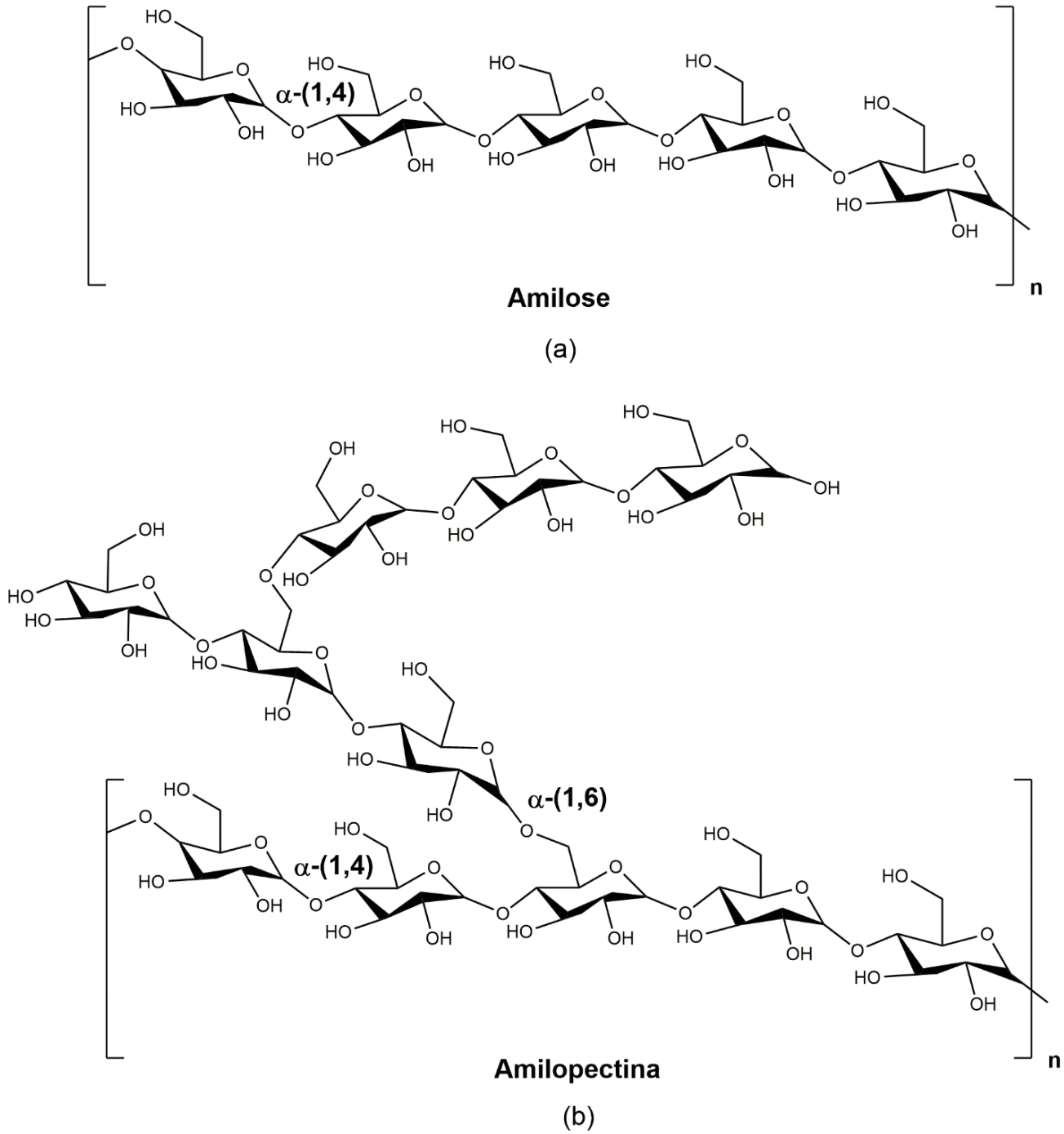
Recentemente (HOSSEINI et al., 2020), a quefirana, um polissacarídeo produzido por micro-organismos presentes nos grãos quefir e constituído por glicogalactanas, foi oxidado com periodato de sódio e utilizado para revestir esferas de vidro modificadas com 3-aminopropil trietoxissilano. Este material foi utilizado para imobilizar pectinases (EC 3.2.1.15), sendo verificado que a estabilidade térmica e de pH da enzima imobilizada foi maior do que a da enzima livre em todas as temperaturas e pH investigados. Além disso, o derivado imobilizado reteve 73% de sua atividade inicial após 15 ciclos de reação. Outro exemplo de polímero natural que pode ser modificado pela inserção de grupos aldeído, é o amido, que apresenta muitas vantagens, como baixo custo, biodegradabilidade e facilidade de produção.

TABELA 2 – AGENTES RETICULANTES MACROMOLECULARES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Tipo de Polialdeído	**Aplicação/Enzima**	**Principais resultados**	**Referência**
Carboximetilcelulose	Preparação de CLEAs a partir de tripsina bovina.	Em comparação com a tripsina livre, a tripsina reticulada reteve 62% e 42% da atividade esterolítica e proteolítica, respectivamente.	(VILLALONGA et al., 2000)
Dextrana	Preparação de CLEAs a partir de penicilina G acilase, hidroxinitrila liase, álcool desidrogenase e nitrilase.	Atividade recuperada (%), nitrilase (glutaraldeído 0%, detrana polialdeídica 50%), PGA (glutaraldeído 48%, detrana polialdeídica 90%).	(MATEO et al., 2004)
Dextrana	Reticulação da lipase de *Candida rugosa* adsorvida em sílica oca para aplicação na resolução do ibuprofeno.	Eficiência de imobilização 79%, retenção de atividade 80%. Lipase livre (conversão 30%, ee_s = 35%, E > 40), lipase imobilizada (conversão 50%, ee_s = 93%, E > 140)	(REN et al., 2013)
Pectina	Preparação de CLEAs macromoleculares magnéticos de glucoamilase.	Atividade recuperada (%), polialdeído de pectina (95,4%), glutaraldeído (85,3%).	(NADAR e RATHOD, 2016)
Quefirana	Ativação de esferas de vidro funcionalizadas com $-NH_2$ para imobilização de pectinase.	Manutenção de 60% da atividade, a 60 °C, após 90 min de incubação em tampão pH 5,0.	(HOSSEINI et al., 2020)

2.6 AMIDO POLIALDEÍDICO COMO AGENTE RETICULANTE

O amido é um polímero natural composto de amilose, um polissacarídeo linear contendo unidades de anidroglucose ligadas do tipo α-(1,4) e amilopectina, que tem cadeias α-(1,4) unidas em pontos de ramificação por ligações α-(1,6) (FIGURA 13).



Fonte do autor

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DA (A) AMILOSE E (B) AMILOPECTINA

A presença de grupos aldeído altamente reativos no amido polialdeídico (AP) é desejada para potenciais aplicações biomédicas, como por exemplo, na engenharia de tecidos, como um material que melhora a adsorção de proteínas e como um transportador de liberação controlada de fármacos (RAFIEE e KARDER, 2020). Também foi relatado que o amido polialdeídico tem propriedades antibacterianas e antivirais (SONG et al., 2009).

As aplicações industriais do amido polialdeídico também são baseadas em sua capacidade de reticulação. A maior parte da sua utilização pela indústria é no processamento de papel como melhorador de resistência à umidade (FIEDOROWICZ e PARA, 2006).

Na literatura, foi demonstrado que o amido polialdeídico pode ser utilizado como agente reticulante para imobilizar covalentemente várias enzimas (Tabela 3). A vantagem deste agente reticulante é a possibilidade de ampliação da quantidade de grupos reativos no suporte, atuando também como agente espaçador entre o suporte e a enzima.

O amido polialdeídico foi utilizado por Žuža e colaboradores (2009) para promover a ligação covalente de penicilina G acilase com dois diferentes tipos de Sepabeads, um derivatizado com etilenodiamina (EA) e outro com hexametilenodiamina (HA). O conjugado AP-PGA imobilizado em Sepabeads EC-EA e Sepabeads EC-HA foram 7 e 9,5 vezes mais estáveis do que o PGA livre, respectivamente, a 50 °C em meio aquoso.

A enzima b-manosidase (EC 3.2.1.25) foi imobilizada na forma de agregados enzimáticos (CLEAs) utilizando o amido polialdeídico como agente formador de ligações cruzadas. O derivado imobilizado apresentou excelente atividade contra galactomanana da goma de alfarroba, que foi 5 vezes maior que a do derivado preparado com glutaraldeído. A caracterização da morfologia do material indicou que os CLEAs preparados usando amido polialdeídico podem resultar em estruturas mais porosas, que são mais adequadas para substratos macromoleculares (ZHEN et al., 2013).

Um agregado enzimático de ciclodextrina glicosiltransferases (EC 2.4.1.19) (CGTase) de *Thermoanaerobacter sp.* foi preparado para síntese de b-ciclodextrinas usando amido como doador de glicose. Foram estudados alguns agentes reticulantes (glutaraldeído, amido polialdeídico e polialdeído de pectina). Os CLEAs preparados com amido polialdeídico foram aproximadamente 3 vezes mais ativos do que aqueles preparados com glutaraldeído, com valores de recuperação de atividade de 25 e 10%, respectivamente (ROJAS et al., 2019). Para a CGTase livre, foi observada perda de atividade de cerca de 20% após 6 h, em tampão citrato pH 6,0, a 60 °C, enquanto para o CLEA mais ativo, preparado com amido polialdeídico, nenhuma perda significativa de atividade foi observada nas mesmas condições de inativação.

Uma lipase de *Rhizopus sp* foi imobilizada em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 modificadas com amido polialdeídico e epicloridrina. Foram investigados os efeitos do pH na estabilidade térmica, ao armazenamento e na reutilização do derivado imobilizado. Os mesmos parâmetros foram investigados com glutaraldeído como agente reticulante. Verificou-se que a enzima imobilizada nas nanopartículas reticuladas com amido polialdeídico tolerava ambientes moderadamente ácidos (pH 6,0 - 6,5). Em pH 9,0, o derivado imobilizado permaneceu com 65% da atividade, indicando que a tolerância da lipase aos ambientes alcalinos foi maior no amido polialdeídico do que na lipase reticulada com glutaraldeído, que manteve 53,2% da atividade inicial. O biocatalisador mostrou estabilidade à temperatura (60 °C), apresentando atividades enzimáticas relativas de 60,4%, e 55,5%, para os derivados reticulados com amido polialdeídico e glutaraldeído, respectivamente, após 2 h de incubação (YANG et al., 2019).

Recentemente (QIU et al., 2020), uma lacase (EC 1.10.3.2) de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 modificadas com líquido iônico funcionalizado usando o amido polialdeídico como braço espaçador. A retenção de atividade observada foi de 73,7%, e eficiência de imobilização de 85,8% com boa estabilidade ao armazenamento (aproximadamente 80% da atividade inicial foi retida após 30 dias). Além disso, a lacase imobilizada pode remover efetivamente compostos como fenol, 4-clorofenol e 2,4-diclorofenol exibindo eficiência de remoção máxima de 86,1%, 93,6% e 100% respectivamente, em uma faixa mais ampla de temperatura e pH

O único trabalho publicado sobre amido polialdeídico como agente reticulante da quitosana é o de Chen e colaboradores (2010). Neste trabalho, o amido polialdeídico foi utilizado como agente reticulante de microesferas de quitosana na imobilização da xilanase (EC 3.2.1.8) de *Aspergillus niger*, visando a síntese de xilo-oligossacarídeos a partir de xilana de *Betulla sp*. Em comparação com quitosana ativada via glutaraldeído e esferas não ativadas, a xilanase imobilizada no suporte ativado com amido polialdeídico apresentou o melhor desempenho catalítico. Após 60 min de incubação em tampão acetato pH 4,6, a 50 °C, o biocatalisador preparado com quitosana e AP reteve 78,5% da atividade inicial (100%), já o biocatalisador preparado com quitosana e glutaraldeído reteve 64,4% da atividade, e a xilanase livre 56,0%. No experimento de armazenamento, após 75 dias, a 4 °C, a xilanase imobilizada utilizando amido polialdeídico reteve 89% de sua atividade inicial, enquanto a xilanase livre manteve apenas 60% de sua atividade inicial.

Apesar das vantagens de utilização de amido polialdeído como agente reticulante, até o momento não existem na literatura informações sobre a utilização do amido polialdeídico para ativação de quitosana para a imobilização de lipases, que é o foco deste trabalho.

TABELA 3 – AMIDO POLIALDEÍDICO COMO AGENTE RETICULANTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Aplicação/Enzima	Principais resultados	Referência
Penicilina G acilase	Eficiência de imobilização (80%, 48 h, 4 °C, pH 5,5), manutenção da atividade, AP-PGA/Sepabeads EC-HA, 78%, 50 °C, 2 h, a enzima livre perdeu a atividade sob essas condições.	(ŽUŽA et al., 2009)
Xilanase	Atividade recuperada (%) Glutaraldeído (54%) Amido polialdeídico (61%)	(CHEN et al., 2010)
CLEAs de b-manosidase	Atividade recuperada (%) Glutaraldeído (5%, 16 h) Amido polialdeídico (21%, 16 h)	(ZHEN et al., 2013)
CLEAs de ciclodextrina glicosiltransferase	Retenção de atividade (%) Glutaraldeído (10%, 20 mM, 2 h) Amido polialdeídico (25%, 20 mM, 2 h)	(ROJAS et al., 2019)
Lipase	Eficiência de imobilização (> 60%, 6 h) Atividade recuperada (60%) 6 ciclos de reutilização, 53.6% da atividade inicial foi mantida.	(YANG et al., 2019)
Lacase	Eficiência de imobilização (85,8%, 4 h) Retenção de atividade (73,7%) Manutenção de 83.5% da atividade inicial após 6 reusos.	(QIU et al., 2020)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a imobilização da lipase comercial de *Pseudomonas fluorescens* em suportes à base de quitosana, ativada ou não com amido polialdeídico, com vistas à utilização em biocatálise.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o amido polialdeídico utilizando amido de milho;

- Preparar microesferas de quitosana;
- Ativar as microesferas de quitosana com amido polialdeídico e com glutaraldeído.
- Caracterizar as microesferas de quitosana através das técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e das técnicas BET e BJH, para realizar a determinação da área superficial e grau de porosidade, respectivamente;
- Imobilizar a lipase de *Pseudomonas fluorescens* nas esferas de quitosana reticuladas ou não, determinando-se a eficiência de imobilização e a retenção de atividade em cada preparado imobilizado;
- Avaliar a estabilidade da enzima imobilizada, em diferentes solventes orgânicos e à temperatura;
- Verificar a atividade de esterificação dos preparados imobilizados da lipase de *Pseudomonas fluorescens*;
- Avaliar a enantiosseletividade dos preparados imobilizados da lipase de *Pseudomonas fluorescens* na resolução cinética de álcoois secundários.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química, e no Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.1 MATERIAIS

A lipase utilizada neste trabalho é uma preparação comercial de *Pseudomonas fluorescens* na forma de pó (Lote:LAKJ0551004) comercializada pela Amano (Nagoya, Japão) com o nome Lipase AK20 e gentilmente doada pela Profª Maria da Graça Nascimento (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC). Experimentalmente, no pó comercial foram encontrados 16.000 U g^{-1} de atividade de hidrólise em meio aquoso contra azeite de oliva a 40 °C, determinado pelo método pHStat (4.9.1) e 15% de proteína, determinado pelo método de Bradford (4.9.3).

A quitosana com granulometria de 60-100 Mesh, $2{,}38 \times 10^5$ g mol^{-1} e grau de desacetilação de 94,1% (Primex S.A., Siglufjörður, Islândia) foi gentilmente doada pela Profª. María Lujan Ferreira da Planta Piloto de Ingenieria Quimica (PLAPIQUI), CCT CONICET, Bahia Blanca, Argentina. O ácido acético (98,5%) e o hidróxido de sódio (99%) foram adquiridos da Neon Química, São Paulo, SP, Brasil. O amido de milho (Maizena, Unilever Company, São Paulo, Brasil) foi adquirido no mercado local. O periodato de sódio (98%), o cloreto de hidroxilamina (98%), e o acetato de vinila (98%) foram fornecidos pela Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). O glutaraldeído (GA) foi fornecido pela Fluka como uma solução a 25% (v v^{-1}). A ninidrina (98%), hidrindantina (98%), acetato de lítio (99%), ácido octanóico (98%), TRIS (99%), (*RS*)-1-feniletanol (98%) e a propiofenona (99%) foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

O etanol (99%) foi adquirido da Alphatec (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), e o boroidreto de sódio (98%) foi adquirido da Êxodo Científica (Sumaré, São Paulo, Brasil).

4.2 PREPARAÇÃO DO AMIDO POLIALDEÍDICO (AP)

A modificação do amido de milho com periodato de sódio (Esquema 1) foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Veelaert e colaboradores (1994).

Em um balão reacional de 250 mL, uma suspensão foi preparada em 100 mL de água ultrapura com adição de 6,0 g de amido, equivalente a 0,037 mol de monômeros de anidroglucose, aquecida sob agitação até a gelificação.

Em seguida, para cada reação, foram adicionadas quantidades crescentes de periodato de sódio, de modo a obter razões molares de 0,2:1, 0,4:1, 0,6:1, 0,8:1 e 1:1, respectivamente. O pH foi ajustado em 4,0 com adição de solução de HCl (2,0%, v/v), mantendo-se a mistura sob agitação magnética a 25 ºC, na ausência de luz, por 24 h. Ao final da reação, a mistura foi precipitada com acetona, filtrada a vácuo e lavada 3 vezes com 20 mL deste mesmo solvente. O sólido obtido foi seco em estufa a 35 ºC até massa constante.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALDEÍDICO

A determinação da percentagem de grupamentos aldeídicos no amido, formados após a reação, foi realizada a partir do ensaio com hidroxilamina, segundo a metodologia descrita por Veelaert e colaboradores (1997). Em um Erlenmeyer de 100 mL com tampa foram adicionados 100 mg de amido polialdeídico (AP). Em seguida, foram adicionados 25 mL de uma solução de hidroxilamina (0,25 mol L^{-1}), mantendo-se a mistura reacional sob agitação branda a 25 ºC por 2 h e na ausência de luz. A análise do controle, contendo apenas amido de milho tratado com cloreto de hidroxilamina, foi realizada da mesma maneira. Por fim, o ácido liberado na reação da hidroxilamina com os grupos aldeído foi titulado com solução de NaOH (0,1 mol L^{-1}) até pH 6,0, utilizando titulação potenciométrica para verificação do ponto de equivalência.

Os experimentos de titulação potenciométrica foram conduzidos numa célula convencional de vidro com capacidade de 100 mL, termostatizada a 25 °C, acoplada a um eletrodo de vidro e um eletrodo de referência de Ag/AgCl. As medidas de pH foram efetuadas em um pHmetro Analyser pH 500 e bureta com capacidade de 25 mL.

A solução de hidroxilamina foi preparada dissolvendo-se 1,74 g de cloreto de hidroxilamina em 25 mL de água destilada, transferindo-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL e completando o volume com água destilada. A porcentagem de grupos aldeído, (CH0)%, foi calculada utilizando-se a Equação 8:

$$(CHO)\% = \frac{M_{NaOH}(V_{amostra} - V_{branco})}{\frac{m}{MM}} . 100 \qquad (8)$$

onde, M é a molaridade da solução de NaOH, V_B é o volume de NaOH gasto na titulação do controle, V_S é o volume gasto de NaOH na titulação da amostra em mL, m a massa em gramas da amostra (seca) de amido polialdeídico (AP) e MM é a massa molar da unidade de glucose anidra.

4.4 PREPARAÇÃO E ATIVAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA

4.4.1 Preparação das microesferas de quitosana

As microesferas de quitosana foram preparadas a partir da dissolução de 2,5 g de quitosana em 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético 2,5% (v/v), mantendo-se sob agitação até a completa homogeneização da solução, resultando em uma solução viscosa com aproximadamente 2,5% (m v^{-1}) de quitosana. Em seguida, a solução foi gotejada lentamente, por meio de uma bomba peristáltica (diâmetro de saída 1,5 mm), em uma solução de NaOH 1,0 mol L^{-1}, contendo 40% (v v^{-1}) de etanol, mantida em banho de gelo. As microesferas gelificadas foram deixadas em contato com esta solução por 30 min, filtradas, lavadas com água destilada até pH 7,0, secas à temperatura ambiente e armazenadas a 4 °C.

4.4.2 Ativação das esferas de quitosana com amido polialdeídico

Foi preparada uma suspensão aquosa de amido polialdeídico (AP) gelificado, de teor variável de número de mols de grupos aldeído. Em seguida, foi adicionado cerca de 1,0 g de microesferas secas de quitosana a 25 mL de cada uma das suspensões de AP. A mistura foi incubada sob agitação constante, a 40 ºC, por 6 h, na ausência de luz. Ao final da reação, e após filtração, o excesso de amido polialdeídico foi lavado com água destilada e as microesferas foram secas à temperatura ambiente.

4.4.3 Ativação das microesferas de quitosana com glutaraldeído

Foi preparada uma solução aquosa de glutaraldeído de concentração 3,0% (v/v). Em seguida, foram adicionados cerca de 1,0 g de microesferas secas de quitosana a 25 mL da solução de glutaraldeído e o sistema foi deixado sob agitação constante, a 35 ºC, por 30 min. Ao final da reação, e após filtração, o excesso de glutaraldeído foi lavado com água destilada e as microesferas foram secas à temperatura ambiente.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES

Os suportes poliméricos QTS, QTS/GA e QTS/APIII foram caracterizados utilizando as técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para verificação dos grupos funcionais presentes no suporte antes e após cada etapa de ativação. A densidade de grupos amino livres no suporte foi determinada utilizando o ensaio com ninidrina, descrito em 3.4.2.

4.5.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

As amostras de microesferas de quitosana reticuladas ou não-reticuladas foram previamente pulverizadas para a análise. O espectro de infravermelho foi obtido na região de 4000 – 400 cm^{-1} com um espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimadzu (UTFPR), utilizando-se pastilhas de KBr, com resolução de 4 cm^{-1} e média de 32 escaneamentos.

4.5.2 Determinação de grupos amino livres na quitosana reticulada e determinação do grau de intercruzamento (crosslinking)

O grau de reticulação foi determinado pelo ensaio com ninidrina, seguindo o método descrito por Leane e colaboradores (2004), com pequenas modificações. O tampão acetato de lítio (10 mL) foi preparado dissolvendo 4,08 g de acetato de lítio diidratado em aproximadamente 6 mL de água ultrapura. O pH da solução resultante foi ajustado para 5,2 usando ácido acético glacial e o volume foi ajustado para 10 mL com água ultrapura. A solução de ninidrina foi preparada adicionando o tampão acetato de lítio (10 mL) a 0,8 g de ninidrina e 0,12 g de hidrindantina em 30 mL de DMSO. Para o ensaio, 0,5 mL de reagente de ninidrina foram adicionados a 0,1 g da amostra em um tubo de ensaio. Os frascos foram imediatamente fechados com tampa, brevemente agitados e aquecidos em água fervente por 30 min para que a reação prosseguisse. Após o resfriamento, 15 mL de uma mistura de etanol/água (1:1, v v^{-1}) foram adicionados a cada tubo de ensaio, então agitados em vórtex por 15 s para oxidar o excesso de hidrindantina. A absorbância de cada solução foi medida em um espectrofotômetro UV (Shimadzu) a 570 nm. A porcentagem de grupos amino livres das microesferas de quitosana após a reticulação foi determinada por meio da Equação 9. O teor de grupos amino no suporte está relacionada à absorbância através da curva

de calibração feita com D-glucosamina (0,1 - 0,6 mmol L^{-1}) que foi obtida nas mesmas condições do ensaio:

$$G.C(\%) = \frac{x - y}{x}.100 \tag{9}$$

onde: x = n° de mols de grupamentos $-NH_2$ livres na quitosana e y = n° de mols de grupamentos $-NH_2$ livres na quitosana reticulada.

4.5.3 Determinação da área superficial

A área superficial dos suportes QTS, QTS/GA e QTS/APIII foi obtida empregando-se o método de BET. Esse método considera a adsorção física de uma quantidade de nitrogênio na superfície de um sólido em função da pressão. A partir da variação de pressão exercida, uma quantidade do gás de nitrogênio é adsorvida, adotando-se a relação linearizada apresentada na Equação 10 (BRUNAUER et al.,1938):

$$\frac{P}{V_a(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C - 1}{V_m C}\left(\frac{P}{P_0}\right) \tag{10}$$

onde: V_a o volume de gás adsorvido na pressão P; P_0 é a pressão de vapor do gás,

V_m o volume aparente da monocamada e C uma constante.

De acordo com a Equação 9, a curva de P/V_a $(P_0\text{-}P)$ em função de P/P_0 resulta em uma linha reta. Em que, a inclinação é dada por:

$$s = \frac{C - 1}{V_m C} \tag{11}$$

e a intersecção é dada por:

$$i = \frac{1}{V_m C} \tag{12}$$

O volume da monocamada de gás adsorvido V_m e a constante C de BET, são calculados pela inclinação da reta e pela intersecção no intervalo de pressão relativa entre 0,05 a 0,35:

$$V_m = \frac{1}{s + i} \tag{13}$$

A área superficial específica, S_{BET} ($m^2.g^{-1}$), da amostra, é então calculada através da Equação 14

$$S_{BET} = \frac{V_m N_A \sigma}{m V_0} \tag{14}$$

onde: σ é a área efetiva ocupada por uma molécula de nitrogênio (1,62 x 10^{-20} m^2); N_A é o número de Avogadro (6,022x10^{23} mol^{-1}); m é a massa de suporte (g) e V_0 é o volume molar do gás na CNTP (22400 cm^3. mol^{-1}).

4.5.3 Determinação da distribuição do tamanho dos poros

A distribuição do tamanho dos poros foi determinada para os suportes QTS, QTS/GA E QTS/APIII, e é calculada a partir da histerese de acordo com a teoria de BARRETT, JOYNER e HALENDA (1951) e representa a pressão relativa (P/P_0) em equilíbrio com o material poroso e o tamanho dos poros onde a condensação capilar ocorre. Neste modelo, assume-se que todos os poros são cilíndricos e para obtenção dos dados utiliza-se a região da dessorção da curva para realização dos cálculos.

O volume total dos poros, V_p, é geralmente derivado da quantidade de vapor adsorvido quando a pressão relativa é próxima a um, assumindo-se que os poros estão preenchidos com nitrogênio condensado no estado líquido normal. Os cálculos de tamanho dos poros são normalmente realizados através de cálculo do raio ou da largura de poros, fazendo-se necessário considerar um modelo para o formato do poro e assumir que a curvatura do menisco está relacionada à largura dos poros. Geralmente, adota-se a forma cilíndrica para o poro e hemisférica para o menisco, resultando na Equação 15

$$r_K = \frac{2\sigma\nu}{RTln(^{P}/_{P_0})} \tag{15}$$

onde: r_K é o raio de Kelvin

σ = tensão superficial do líquido condensado

ν = volume molar

p/p_0 = pressão relativa da condensação

A distribuição de tamanho do poro é expressa graficamente na forma dV/dD (cm^3 g^{-1} nm^{-1}) versus r_p (nm).

4.6 ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE

4.6.1 Imobilização em suportes à base de quitosana

Para a imobilização de LAK nos suportes à base de quitosana, foi utilizada a metodologia descrita por Mendes e colaboradores (2011), com algumas modificações. Os suportes (500 mg) foram lavados três vezes com tampão (Tris-HCl 0,05 mol L^{-1}, pH 8,5) para remoção de impurezas solúveis, pré-tratados em 3,0 mL de tampão (bicarbonato 0,05 mol L^{-1}, pH 10, contendo 0,15% m m^{-1} de Triton X-100) por 15 min à temperatura ambiente (23 °C).

Para os ensaios de imobilização, a lipase AK em pó foi usada como fornecida pelo fabricante, sem purificação. Foram preparados 2,0 mL da solução de lipase usando as quantidades calculadas para fornecer a carga de enzima em mg de proteína por grama de suporte necessária em cada estudo. Em seguida, essa solução foi adicionada ao tampão contendo os suportes, sendo a mistura então incubada em um agitador orbital a 25 °C, 150 rpm, em ausência de luz.

Periodicamente, amostras do sobrenadante foram retiradas e suas atividades enzimáticas e teor de proteína foram analisados. Após o processo de imobilização, o derivado imobilizado foi removido da mistura por filtração, tratado com solução de $NaBH_4$ (0,5 mg mL^{-1}) por 30 min a 4 °C, para reduzir o grupo imina a aminas secundárias estáveis, e os grupos aldeído remanescentes no suporte a grupos hidroxila, que são menos reativos. Então, os derivados imobilizados foram filtrados a vácuo, secos em um dessecador por 16 h e armazenados a 4 °C.

4.6.2 Cinética de imobilização

Para acompanhar o processo de imobilização, foi realizada uma cinética para determinar o melhor tempo de contato entre a enzima e os suportes estudados. Para isso, durante o procedimento de imobilização, foram coletadas alíquotas de 0,3 mL do sobrenadante ao longo do tempo (0 - 24 h), sendo a atividade e a concentração residual de proteínas determinadas pelo método titulométrico em meio aquoso (4.9.1) e pelo método de Bradford (1976), respectivamente. A partir dos resultados experimentais, os valores de eficiência da imobilização (EI) e retenção da atividade (R) foram calculados através das Equações 16 e 17, respectivamente (YADAV e BORKAR, 2008):

$$\mathrm{EI} = \frac{(At_i - At_f)}{At_i}.100 \qquad (16)$$

onde: *Ati*: atividade inicial total de hidrólise antes da imobilização*; Atf*: atividade final total de hidrólise no sobrenadante após a imobilização; *Aobs*: atividade observada do imobilizado (U g^{-1} do suporte); A*t*: atividade teórica do imobilizado (U g^{-1} do suporte).

A retenção da atividade (R) dos preparados imobilizados foi determinada pela atividade de hidrólise em meio orgânico com tricaprilina como substrato (3.6.2), através da Equação 17, comparando-se a atividade teórica, obtida através do balanço de massa expresso em atividade (U g^{-1} de suporte), com a diferença de massa de proteína encontrada do sobrenadante no início e no fim do processo de imobilização, calculada pela Equação 18:

$$R = \frac{A_{OBS}}{A_T} . 100 \tag{17}$$

$$A_T = (m_{pi} - m_{pf}) . A_{EspOrg} \tag{18}$$

onde: m_{pi}: massa de proteína (mg) originalmente da solução enzimática (sobrenadante) antes da imobilização; m_{pf}: massa de proteína (mg) que permaneceu no sobrenadante ao final da imobilização; A_{EspOrg}: atividade de hidrólise específica da enzima livre (U mg^{-1} de proteína), medida em meio orgânico contra a tricaprilina.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS PREPARADOS IMOBILIZADOS

4.7.1 Atividade de hidrólise em meio orgânico

Para o ensaio, foram adicionados 5 mL de meio reacional em um Erlenmeyer de 25 mL contendo 100 mg da enzima imobilizada. O meio reacional foi constituído por 4,9 mL de *n*-hexano, 70 mmol L^{-1} de tricaprilina e 0,1 mL (2% v v^{-1}) de água destilada. Nos ensaios em que foi utilizada a enzima livre em tampão, foram adicionados ao meio reacional 60 µL da solução contendo a enzima com concentração de proteínas já estabelecida. A esse volume foram adicionados 40 µL de água destilada, completando assim 2% (v v^{-1}) de água no meio reacional. A reação foi realizada sob agitação de 160 rpm, a 40 ºC e, em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual através método de Lowry-Tinsley (4.9.2). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a produção de 1 µmol de ácidos graxos por minuto nas condições do ensaio.

4.7.2 Estabilidade em solventes orgânicos

Foram incubados 25 mg dos preparados imobilizados em 1 mL de solventes com diferentes valores de log P, por 8 h, em banho termostatizado a 35 °C. Após a incubação, o material foi removido da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo e seco em dessecador por 16 h, a 4 °C. A atividade residual dos preparados imobilizados foi avaliada pela hidrólise da tricaprilina em meio orgânico (4.7.1). Os solventes orgânicos utilizados foram isooctano (log P 4,5), *n*-heptano (log P 4,0), *n*-hexano (log P 3,5), tolueno (log P 2,5), clorofórmio (log P 2,0), álcool isoamílico (log P 1,36), metil isobutil cetona (log P 1,31), éter etílico (log P 0,98), *n*-butanol (log P 0,84) acetato de etila (log P 0,71), isopropanol (log P 0,28), etanol (log P -0,18), acetona (log P -0,23), acetonitrila (log P -0,34) e dimetilsulfóxido (log P -1,3).

4.7.3 Estabilidade à temperatura

A termoestabilidade da enzima livre e dos preparados imobilizados foi avaliada pela incubação em banho termostatizado por 8 h em diferentes temperaturas (de 30 a 60 °C). Para o ensaio com a enzima livre, 50 µL (0,045 mg) foram incubados em 250 µL de tampão (50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L^{-1} NaCl, 2 mmol L^{-1} $CaCl_2$) e a atividade residual foi avaliada pelo método titulométrico (4.9.1). Os preparados imobilizados (100 mg) foram incubados em 2 mL de *n*-hexano para evitar a dessorção da enzima do suporte. Após a incubação, foi realizado o mesmo procedimento descrito em 4.7.2 para a secagem do suporte. Atividade residual dos preparados imobilizados foi avaliada pela hidrólise da tricaprilina em meio orgânico (4.7.1).

4.7.4 Atividade de esterificação

O desempenho (atividade e conversão em éster) de LAK imobilizada nos diferentes suportes foi avaliado utilizando como reação padrão a síntese do oleato de etila. As reações foram realizadas em agitador orbital em Erlenmeyers de 25 mL contendo 5 mL de *n*-hexano, 100 mg dos preparados imobilizados, 40 mmol L^{-1} de ácido oleico e 120 mmol L^{-1} de etanol, 40 °C, 160 rpm (FERNANDES et al., 2004). Em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido oleico residual, através método de Lowry-Tinsley (4.9.2). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como o consumo de 1 µmol min^{-1} de ácido graxo nas condições do ensaio. Foram realizados também controles com a adição dos suportes sem a lipase.

4.7.5 Aplicação dos derivados imobilizados na síntese do éster cinamato de etila

As reações foram realizadas em agitador orbital, em Erlenmeyers de 25 mL, contendo 10 mL de etanol, 100 mg dos preparados imobilizados, 5,0 mmol de ácido cinâmico. As reações foram mantidas por 6 h, a 50 °C e 160 rpm. Em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido cinâmico residual, através método de Lowry-Tinsley (4.9.2).

4.8 RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS

4.8.1 Síntese do substrato racêmico (*RS*)-1-fenilpropanol

A propiofenona foi reduzida com $NaBH_4/SiO_2$ para a formação do respectivo álcool (Figura 14). Em um Erlenmeyer (125 mL) com agitação magnética adicionou-se 1,0 mL de propiofenona (7,5 mmol) em aproximadamente 20 mL de etanol absoluto, seguido de 0,6 g de $NaBH_4$ (15 mmol) e 1,0 g de sílica gel (ZEYNIZADEH E BEHYAR, 2005). A reação foi monitorada por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como eluente *n*-hexano/acetato de etila (6:4). Em seguida, a mistura reacional foi filtrada, transferida para um funil de separação e lavada com diclorometano (3 x 20 mL), sendo este evaporado em rotaevaporador. O produto obtido foi analisado por cromatografia gasosa quiral

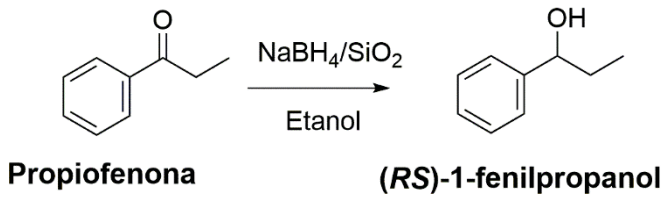


FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE REDUÇÃO DA PROPIOFENONA

4.8.2 Resolução cinética dos substratos (*RS*)-1-feniletanol e (*RS*)-1-fenilpropanol.

Após a síntese dos álcoois, foi realizada uma reação de esterificação utilizando anidrido acético como doador acila e piridina como catalisador, obtendo-se assim os ésteres (*RS*)-acetato

de 1-feniletila (**1a**) e (*RS*)-acetato de 1-fenilpropila (**2a**). Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel (0,035 -0,07 mm, 6 nm) utilizando hexano/acetato de etila (9:1) como eluente. Os compostos foram analisados por análises de cromatografia gasosa.

A enantiosseletividade de LAK livre e dos preparados imobilizados foi avaliada por reações de transesterificação de (*RS*)-1-feniletanol (**1**), adquirido comercialmente e de (*RS*)-1-fenilpropanol (**2**) preparado como descrito em 4.8.1.

As reações foram realizadas em frascos com tampa de rosca de 4 mL. Uma quantidade de biocatalisador, suficiente para dar 12 U de atividade hidrolítica em meio orgânico (65 mg de QTS/APIII/LAK, 68 mg de LAK livre ou 24 mg de Novozym 435) foi adicionada a uma solução de (*RS*)-1-feniletanol (0,1 mmol; 12 µL) ou (*RS*)-1-fenilpropanol (0,1 mmol; 13,7 µL) e acetato de vinila (0,4 mmol; 37 µL) em *n*-hexano (2 mL). A reação foi realizada a 35 °C com agitação orbital de 180 rpm. Em intervalos fixos, amostras de 10 µL da mistura foram removidas e analisadas por GC quiral (4.9.4). Experimentos com microesferas de quitosana pura foram feitos, não sendo observada a ocorrência de reação.

4.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.9.1 Método Titulométrico (pH-Stat)

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

Para todos os ensaios, foi preparada uma emulsão com goma arábica (3%, m/v), $CaCl_2.2H_2O$ (2,0 mmol L^{-1}), tampão Tris-HCl (2,5 mmol L^{-1}, pH 8,0) e NaCl (150 mmol L^{-1}) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). A esta emulsão foi adicionada tricaprilina (63 mmol L^{-1}). A mistura foi homogeneizada durante 15 min em liquidificador. Para cada ensaio, 20 mL de emulsão foram adicionados ao frasco de reação (capacidade de 50 mL), termostatizado a 35 °C, com agitação magnética de 300 rpm.

A reação foi iniciada por adição da enzima à emulsão previamente termostatizada, no próprio reator sob agitação magnética (300 rpm), 30 °C, pH 8,0 (MARTINI et al., 2012) e seguida por 5 min. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a produção de 1 µmol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio.

A atividade de hidrólise foi calculada de acordo com a Equação 19

$$A = \frac{dV}{dt} \cdot [NaOH] . f . F_{pH} \quad (19)$$

onde: dV/dt: é a velocidade inicial da reação, calculada pelo consumo de NaOH na titulação, em mL min^{-1};

[NaOH]: é a concentração de NaOH em µmol mL^{-1};

f: é o fator de correção da concentração de NaOH;

F_{pH}: é fator de correção (adimensional) relacionado à dissociação parcial do ácido caprílico (pKa = 4,89). Este valor foi calculado de acordo com a Equação 20, considerando o pH do ensaio (8,0)

$$F_{pH} = \frac{1 + 10^{(pH-pKa)}}{10^{(pH-pKa)}} \quad (20)$$

4.9.2 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido oleico e ácido cinâmico durante as reações de síntese do oleato de etila e cinamato de etila, na determinação da atividade de esterificação de LAK livre e imobilizada. Foram coletadas amostras do meio reacional de síntese do oleato e cinamato de etila, que foram recebidas em Eppendorfs contendo 1,15 mL de tolueno e o reativo de cor (250 µL), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%), com pH (6,0-6,2), corrigido previamente com piridina. Foram adicionados 100 µL da amostra e a mistura foi agitada em vórtex durante 40 s e a absorbância da fase orgânica lida em espectrofotômetro a 715 nm. A concentração de ácido graxo no meio está relacionada à absorbância através das curvas de calibração feitas com o ácido oleico e o ácido cinâmico que foram obtidas nas mesmas condições do ensaio.

4.9.3 Determinação de proteínas

Para a determinação do teor de proteínas foi utilizado o método de Bradford (1976) em microplacas de 96 poços. Em cada poço foram pipetados 30 µL da amostra mais 170 µL do reagente de Bradford. A placa foi incubada por 2 min a temperatura ambiente e absorbância das amostras foi medida a 595 nm. O padrão utilizado para as curvas de calibração foi uma solução de soro albumina bovina (BSA, 0,2 mg mL^{-1}). As curvas de calibração foram feitas com concentrações entre 0,6 a 6 µg de proteína por poço.

4.9.4 Cromatografia em fase gasosa em coluna quiral

O cromatógrafo gasoso utilizado foi GC-2010 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), equipado com detector de ionização de chama (FID) e com coluna quiral de fase estacionária de β-ciclodextrina,(CP Chirasil-DEX CB), com dimensões de 25 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de diâmetro de partícula. As condições cromatográficas foram: injeção (1,0 μL) modo split (razão 1:50), temperatura do detector 220 ºC, gás de arraste nitrogênio, N_2, com gradiente de temperatura entre 110 e 120 ºC, a 1 ºC min^{-1}.

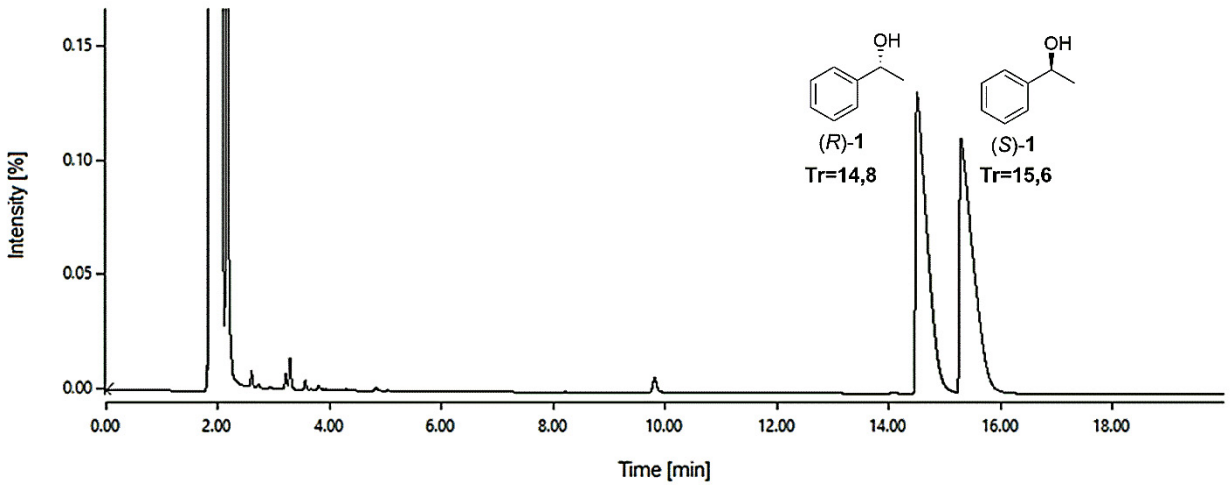
Os dados foram coletados por meio do software GCSolutions e tratados no OpenChrome® As rampas utilizadas no cromatógrafo a gás foram:

Compostos **1** e **1a**: 110 °C até 120 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min;

TR: (*R*)-**1**: 14,8 min, (*S*)-**1**: 15,6 min, (*R*)-**1a**: 14,4 min e (*S*)-**1a**: 13,6 min.

Compostos **2** e **2a**: 110 °C até 120 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min;

TR: (*R*)-**2**: 13,7 min, (*S*)-**2**: 14,8 min, (*R*)-**2a**: 13,3 min e (*S*)-**2a**: 12,7 min.



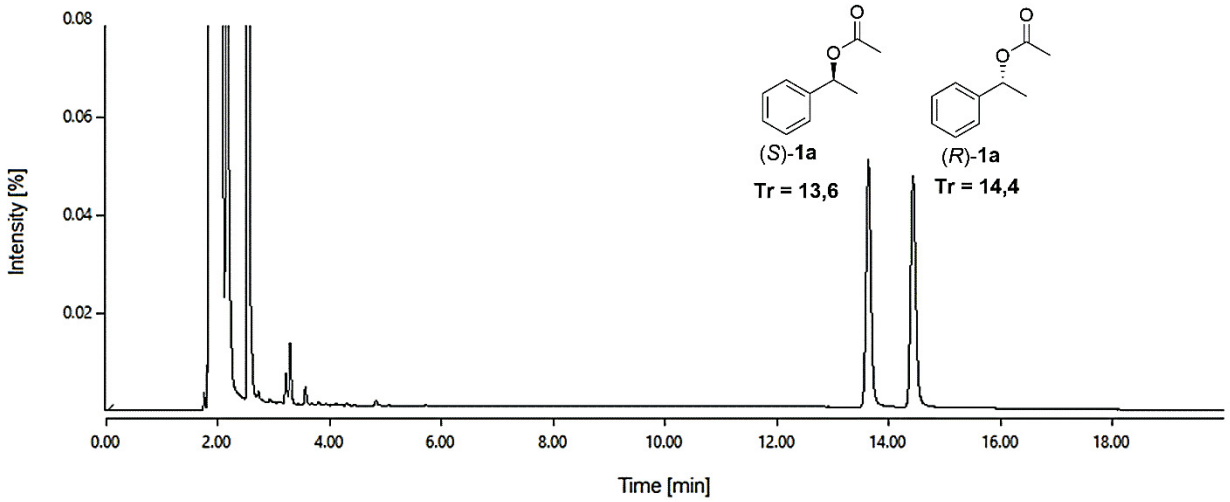


FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS **1** E **1a** UTILIZADOS COMO PADRÕES CROMATOGRÁFICOS.

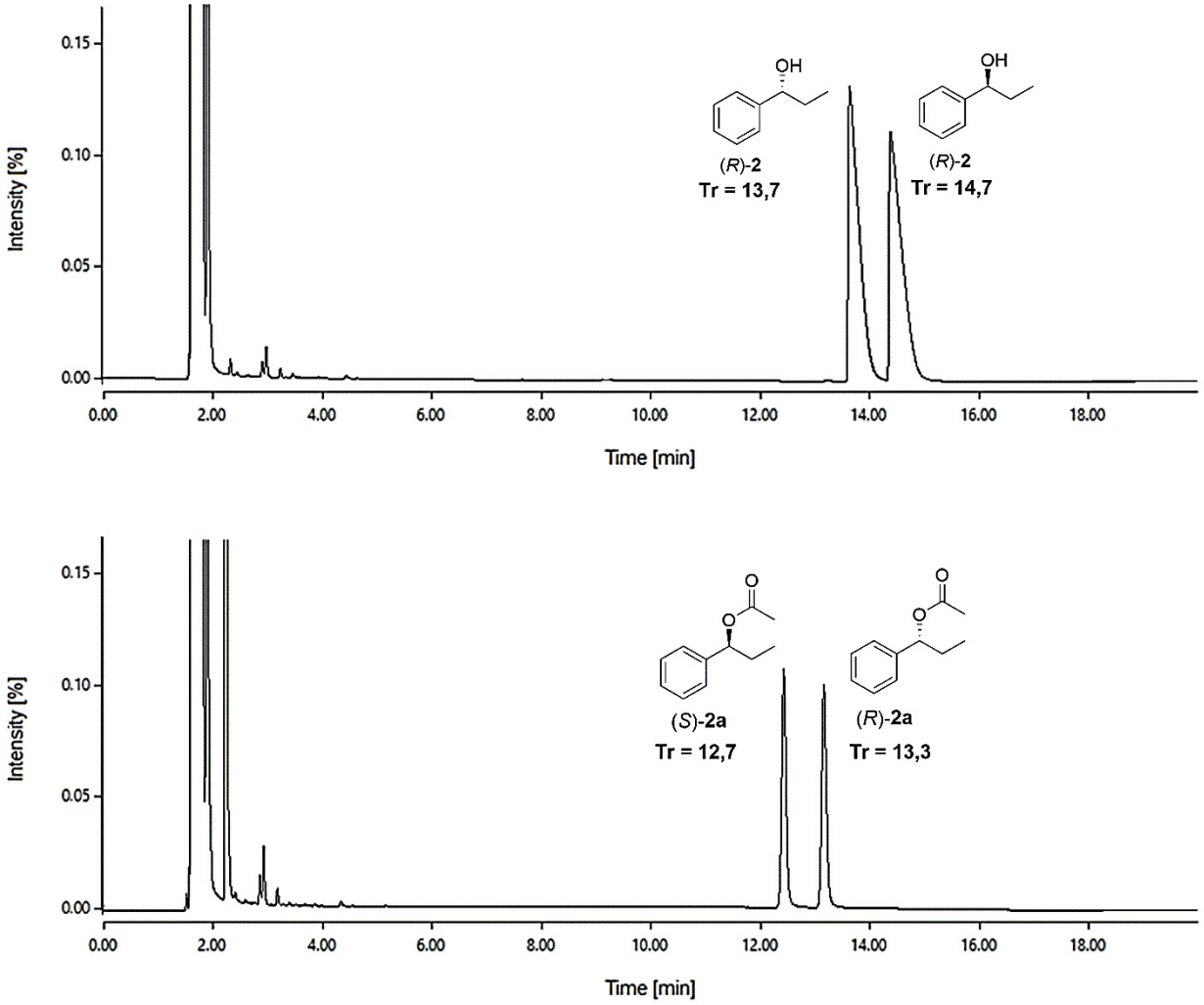


FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS **2** E **2a** UTILIZADOS COMO PADRÕES CROMATOGRÁFICOS.

Os excessos enantioméricos de substrato (ee_s) e produto (ee_p) foram determinados pela diferença de porcentagens relativas de cada enantiômero, conforme a Equação 21, onde R é a concentração do enantiômero (*R*) e S é a concentração do enantiômero (*S*).

$$ee(\%) = \frac{[R - S]}{[R + S]} x\ 100 \tag{21}$$

A conversão (c) foi calculada pela Equação 22 e a coeficiente enantiomérico (E) pela Equação 23, segundo Chen et al. (1982).

$$c\ = \frac{ee_S}{ee_S\ +\ ee_P}.100 \tag{22}$$

$$E = \frac{\ln\,[(1-c)(1-ee_s\,)]}{\ln\,[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln\,[(1-c)\big(1+ee_p\,\big)]}{\ln\,[(1-c)\big(1-ee_p\big)]} \tag{23}$$

onde ee_s corresponde ao excesso enantiomérico do substrato (%), ee_p corresponde ao excesso enantiomérico do produto (%), c corresponde à conversão (%) e E é o coeficiente enantiomérico, que define a enantiosseletividade da enzima.

4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS

Os valores apresentados nos gráficos e tabelas deste trabalho correspondem as médias dos resultados, em duplicata ou triplicata, seguidas do desvio padrão da média, calculado pela Equação 24:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^{\,2}}{n-1}} \tag{24}$$

onde: s é o desvio padrão da média; x_i é o valor de cada resultado individual (x1, x2, x3); $\bar{x}$ é a média aritmética dos valores x_i e n é o número de amostras.

Para comparar os resultados, foi aplicado o teste *t*, com o auxílio das ferramentas de análise do Excel, com nível de significância de 5%. Assim, um valor de $p > 0{,}05$ significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média dos resultados e $p < 0{,}05$ significa que houve diferença estatisticamente significativa entre a média comparadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram preparados três de suportes à base de quitosana para serem empregados na imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LAK): quitosana (QTS), quitosana reticulada com glutaraldeído (QTS/GA) e quitosana reticulada com amido polialdeídico (QTS/AP). Em seguida, estes preparados imobilizados foram caracterizados e utilizados como biocatalisadores de quatro reações distintas: na hidrólise e síntese de ésteres de cadeia longa em meio orgânico, na síntese do cinamato de etila, um éster de aroma, e na resolução cinética enzimática de álcoois secundários.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO POLIALDEÍDICO

5.1.1 Determinação do teor aldeídico

O amido polialdeídico (AP) é obtido a partir da reação entre o amido e sais de ácido periódico, em soluções aquosas acidificadas, conforme descrito na seção 2.5 (pág. 42). Utilizou-se o amido de milho comercial para a realização dos experimentos.

Utilizando a Equação 7 (seção 4.3, pág. 49) e os volumes diferenciais (dV) gastos na titulação do controle e da amostra (Apêndice A), obtiveram-se os teores aldeídicos e grau de oxidação da amostra (Tabela 4).

TABELA 4 – TEOR ALDEÍDICO E GRAU DE OXIDAÇÃO OBTIDOS APÓS A OXIDAÇÃO DO AMIDO

Amostra	**Razão molar[a] (Amido:$NaIO_4$)**	**Teor aldeídico[b] (mmol mg^{-1})**	**Massa Molecular**
API	1:0,2	0,8	
APII	1:0,4	1,5	
APIII	1:0,6	3,5	
APIV	1:0,8	4,7	
APV	1:1	8,0	

Condições reacionais: 6 g de amido, 100 mL de água, 1,58 g – 8,0 g de $NaIO_4$, 25 °C, 24 h, ausência de luz. a) Considerou-se 0,0062 mol o número de unidades de glucose anidra presente em 1 g de amido; b) determinado utilizando a Equação 7 (pág.49).

A concentração de $NaIO_4$ utilizada teve relação direta com o teor aldeídico resultante (Tabela 4). Ao aumentar-se a razão molar de periodato de sódio, foi observado um aumento no teor aldeído e no valor do grau de oxidação, o que está de acordo com a literatura.

5.1.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do amido polialdeídico

O amido polialdeídico preparado a partir da reação com periodato de sódio em meio ácido, e, após secagem e trituração, foi analisado por FTIR (Figura 17).

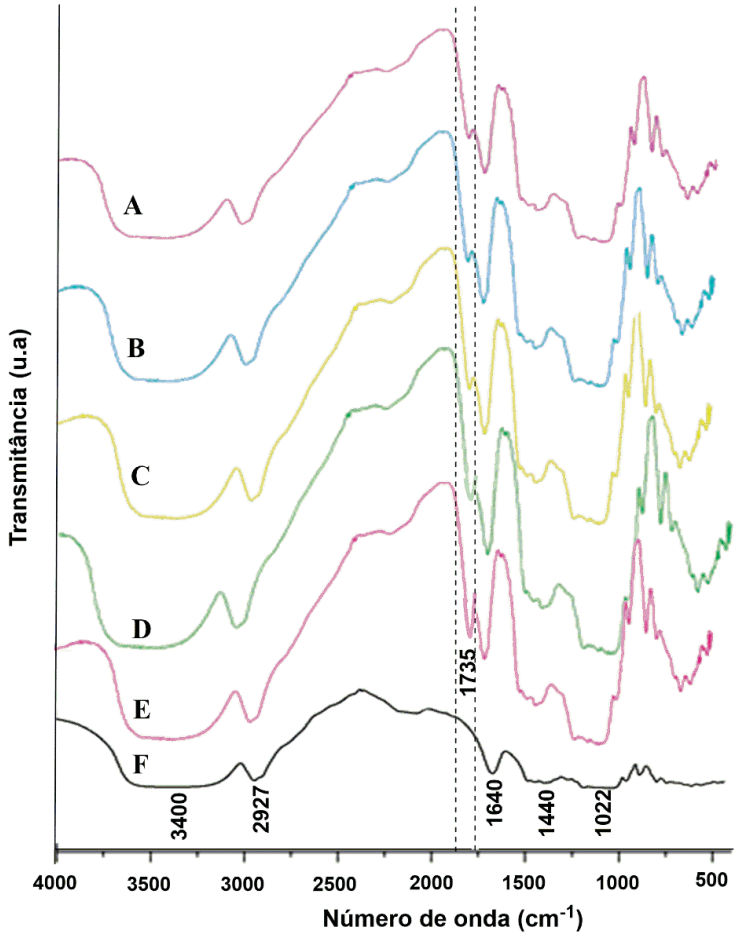


FIGURA 177 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO AMIDO POLIALDEÍDICO

Legenda: (A) magenta: API, grau de oxidação (16%); (B) azul: APII, grau de oxidação (30%); (C) amarelo: APIII, grau de oxidação (56%); (D) verde: APIV, grau de oxidação (77%); (E) rosa: APV, grau de oxidação (>99%); (F) preto: amido não modificado.

A oxidação do amido pelo periodato é caracterizada pela clivagem específica da ligação C2-C3 das unidades de D-glucose. Essa clivagem resulta na formação de dois grupos aldeído por unidade, formando polissacarídeos 2,3-dialdeído. A banda em 1735 cm^{-1} é o pico mais

característico para as vibrações C=O nos grupos de aldeído, enquanto o pico mais fraco em 1160 cm^{-1} é atribuído ao alongamento da ligação C–O do grupo C–OH nos resíduos de D-glucose. As bandas largas na faixa de 1360 a 1440 cm^{-1} são características para o C=O vibrações de alongamento simétrico de grupos carbonila. Estes resultados mostram que o grupo aldeído foi introduzido na estrutura pela oxidação seletiva do amido com periodato (DOU et al., 2015).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES À BASE DE QUITOSANA

5.2.1 Caracterização macroscópica

Na etapa da preparação das microesferas, uma solução de quitosana (4% m v^{-1}) acidificada foi adicionada gota a gota através de uma bomba peristáltica a uma solução aquosa de NaOH contendo etanol. As microesferas de gel obtidas foram lavadas até a neutralidade (pH 7,0) e secas à temperatura ambiente (23 °C) durante 24 h. Em seguida, para a posterior etapa de ativação, os suportes foram denominados QTS, QTS/GA, QTS/API, QTS/APII, QTS/APIII, QTS/APIV e QTS/APV com base em teor de aldeído usado na formulação. Após a reticulação, observou-se alterações na coloração das microesferas. Para a caraterização macroscópica foram considerados os suportes QTS, QTS/GA e QTS/APIII. As microesferas secas sem reticulação apresentaram uma cor que variou de amarelo a levemente alaranjado, por outro lado, aquelas que foram reticuladas com solução de glutaraldeído de concentração 3% (v v^{-1}) apresentaram uma coloração laranja escuro, enquanto as microesferas reticuladas com amido polialdeídico tornaram-se avermelhadas (Figura 18).

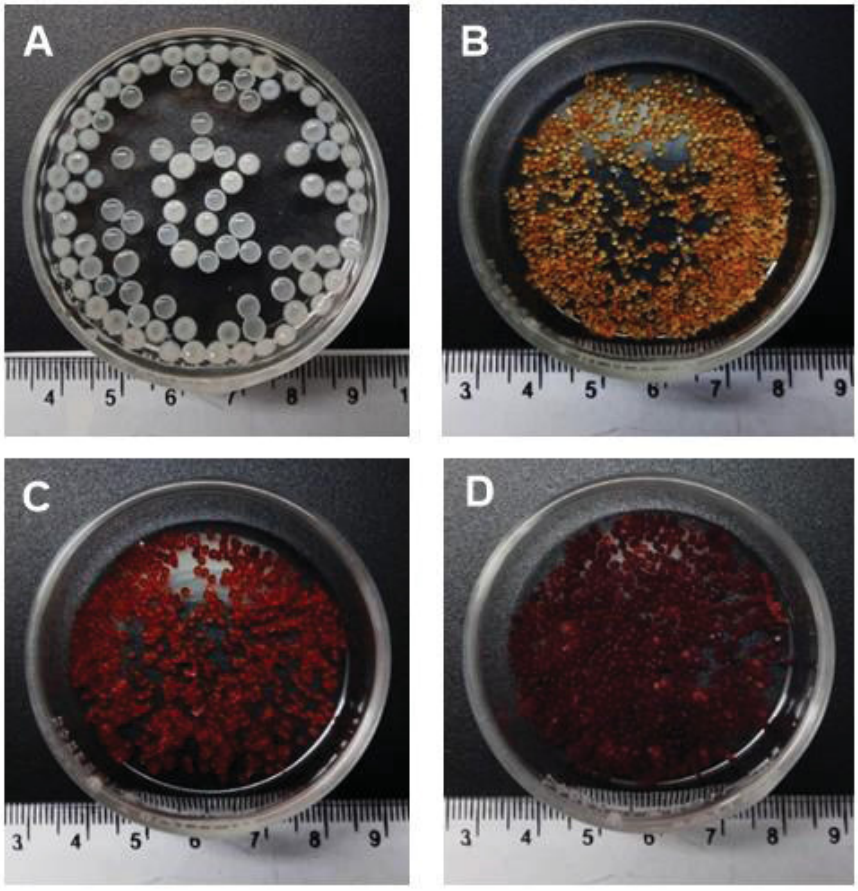


FIGURA 18 – IMAGENS DIGITAIS DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA

(A) microesferas úmidas, (B) microesferas sem reticulação, (C) microesferas reticuladas com glutaraldeído 3% (v v^{-1}) (D) microesferas reticuladas com amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII).

A mudança de coloração indica que as ligações glicosídicas do amido oxidado foram clivadas pelas complexas reações de Maillard desencadeadas pela formação de base de Schiff entre os grupos aldeído e amina (MATSUMURA et al., 2014; CHIMPIBUL et al., 2016). Esta característica macroscópica também foi observada na literatura, em filmes porosos de quitosana contendo nanopartículas de prata modificados com glutaraldeído com vistas à aplicação em curativos com propriedades antibacterianas e para purificação de água (VIMALA et al., 2010).

A microscopia de luz mostrou que o formato das microesferas foi aproximadamente esférico, com um diâmetro de cerca de 1,3 mm. No caso das morfologias, as esferas de quitosana ativadas com amido polialdeídico apresentaram superfície mais lisa (Figura 19C) quando comparadas aos grânulos de quitosana ativados com glutaraldeído (Figura 19B), que apresentavam superfície com maior irregularidade.

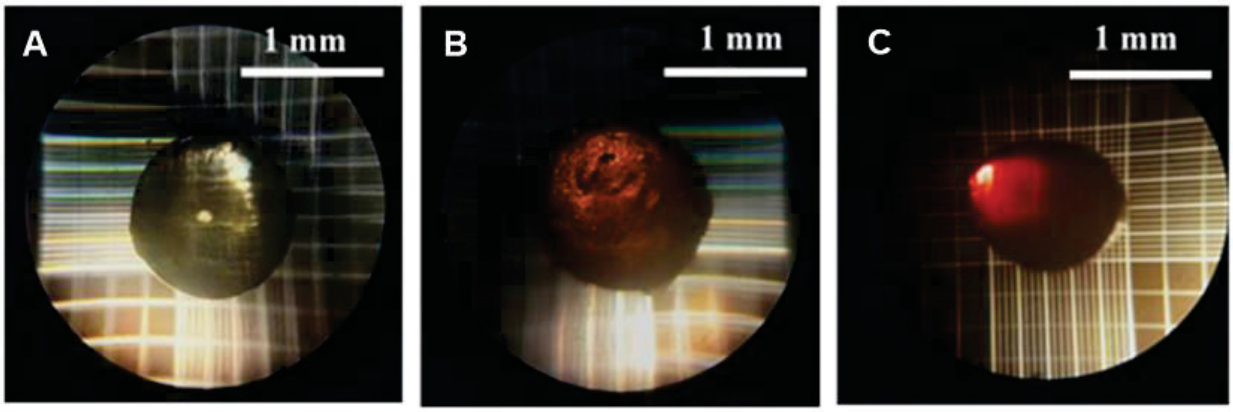


FIGURA 19 – IMAGENS DE MICROSCÓPIO DE LUZ (AMPLIAÇÃO 5X)

Legenda: (a) microesferas sem reticulação (QTS), (b) microesferas reticuladas com glutaraldeído 3% (v v^{-1}) (QTS/GA), (c) microesferas reticuladas com amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII).

Resultados semelhantes, em relação ao formato esférico e diâmetro de aproximadamente 1,3 mm, foram obtidos por Charoenwongpaiboon e colaboradores (2018), que sintetizaram microesferas de quitosana para imobilização da enzima inulosucrase (EC 2.4.1.9) de *Lactobacillus reuteri*.

5.2.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da quitosana reticulada e não-reticulada

As microesferas de quitosana reticuladas (QTS/GA e QTS/APIII) e não-reticuladas (QTS), foram preparadas conforme o item 3.3.1, e após a secagem, foram analisadas por FTIR (Figura 20).

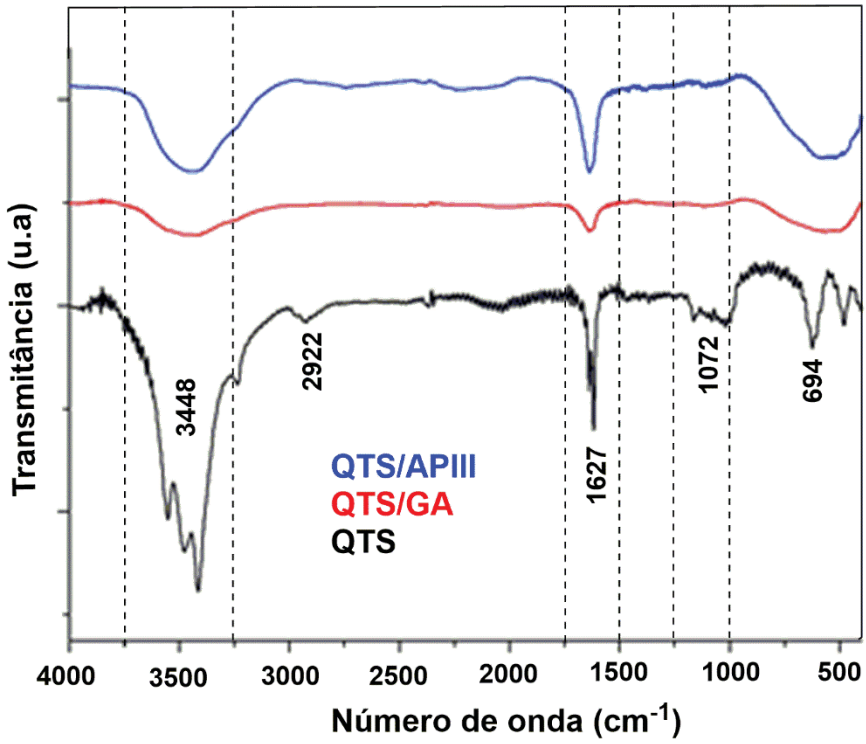


FIGURA 20 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA RETICULADA E NÃO-RETICULADA

Legenda: Em preto: microesferas sem reticulação (QTS), em vermelho: microesferas reticuladas com glutaraldeído 3% (v v^{-1}) (QTS/GA), em azul: microesferas reticuladas com amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII).

No espectro de infravermelho dos suportes à base de quitosana não reticulada, observa-se as bandas de estiramento característico da ligação -OH em 3448 cm^{-1} e de estiramento C—H, alifática, em 2922 cm^{-1}; o alongamento carbonil C=O, característico da quitina, em 1627 cm^{-1}, atribuído à vibração da banda de amida, e as bandas de vibrações, em 1072 cm^{-1}, do estiramento C-O-C do anel de quitosana. Para a quitosana reticulada, os espectros de absorção foram bastante similares, tanto para o suporte modificado com glutaraldeído (QTS/GA), quando para o suporte modificado com amido polialdeídico, QTS/APIII (Figura 20). Após a reticulação, é possível observar a mudança de intensidade de duas bandas principais, que sugerem a interação do amido polialdeídico com a quitosana, e, portanto, sugerem a formação de uma nova rede polimérica. A primeira banda, observada em 3300-3500 cm^{-1}, está relacionada aos grupos -OH e $-NH_2$ livres. Esta banda diminui de intensidade no espectro de QTS/AP, o que é esperado, uma vez que as interações com o glutaraldeído ocorrem através dos grupos amino da quitosana (COSTA e MANSUR, 2008).

Em ambos os espectros (Figura 20), a banda observada em 1659 cm^{-1}, relacionada às ligações C=N (imina) para as microesferas de quitosana reticuladas com o glutaraldeído, está de acordo com dados da literatura. Bin Li e colaboradores (2013) observaram que filmes de quitosana reticulados com glutaraldeído apresentaram uma banda de forte intensidade em 1664 cm^{-1}, enquanto Gupta e Jabrail (2006) reportaram que microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído exibiram uma banda característica em 1660 cm^{-1}. Posteriormente, Andriani e colaboradores (2015) prepararam nanopartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído que apresentaram absorção em 1627 cm^{-1}. Por último, o desaparecimento de bandas cristalinas de quitosana em 1098 e 665 cm^{-1} nas esferas reticuladas demonstrou que a reticulação, tanto com glutaraldeído quanto com amido polialdeídico, perturbou a cristalização de quitosana.

5.2.3 Efeito dos agentes reticulantes no grau de reticulação da quitosana

O grau de reticulação foi calculado a partir da determinação dos grupos amina nas microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído 3% (v v^{-1}) e nas microesferas reticuladas com amido polialdeídico em diferentes graus de oxidação, tendo-se como controle a quitosana não reticulada. A Equação 8 (pág. 51) foi aplicada no cálculo de determinação de grupamentos amino livres.

O maior grau de reticulação (98%) foi obtido com o glutaraldeído, provavelmente porque este pode reagir diretamente com os grupamentos amino da quitosana. Quando o agente de reticulação foi o AP, o grau de reticulação da quitosana aumentou com o grau de oxidação (Figura 21): para as microesferas reticuladas com a menor razão molar (amido:periodato, 1:0,2), o grau de reticulação foi de 64%, enquanto o maior grau de reticulação (90%) foi alcançado para AP produzido a partir da razão molar amido: periodato 1:1,0.

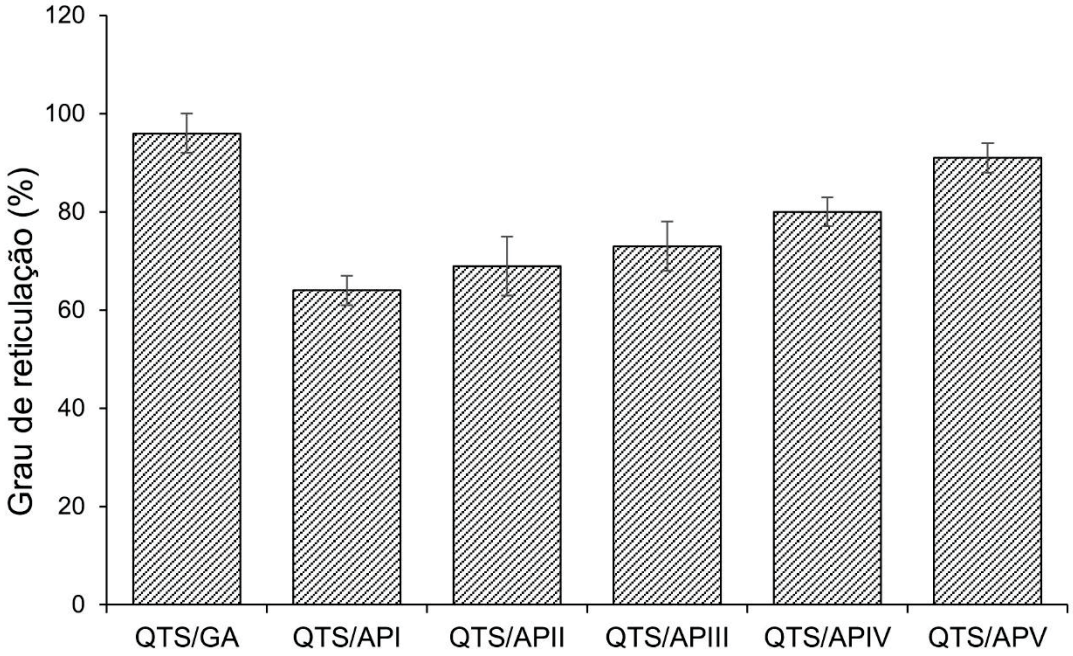


FIGURA 21 – GRAUS DE RETICULAÇÃO OBTIDOS PARA DIFERENTES MÉTODOS DE ATIVAÇÃO DA QUITOSANA

Legenda: Quitosana reticulada com glutaraldeído (QTS/GA); quitosana reticulada com AP com grau de oxidação de 16% (QTS/API); quitosana reticulada com AP com grau de oxidação de 30% (QTS/APII); Quitosana reticulada com AP com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII); quitosana reticulada com AP com grau de oxidação de 77% (QTS/APIV); quitosana reticulada com AP com grau de oxidação >99% (QTS/APV).

Estes resultados mostram que as microesferas de quitosana foram reticuladas com sucesso, tanto com glutaraldeído (QTS/GA) quanto com AP com grau máximo de oxidação (QTS/APV).

5.2.4 Determinação da área superficial e diâmetro do poro

A área superficial foi obtida empregando-se o método de (BET). Esse método considera a adsorção física de uma quantidade de nitrogênio na superfície de um sólido em função da pressão. A partir da variação de pressão exercida, uma quantidade do gás de nitrogênio é adsorvida e, através da Equação 9 (seção 4.5.3), a área superficial é quantificada.

Na Figura 22 encontra-se a isoterma típica de adsorção de nitrogênio para as microesferas de quitosana. A forma obtida para as curvas é característica de uma isoterma tipo IV na classificação de Brunauer, de acordo com a classificação da IUPAC (SING et al., 1985), indicando que as microesferas preparadas são materiais tipicamente mesoporosos.

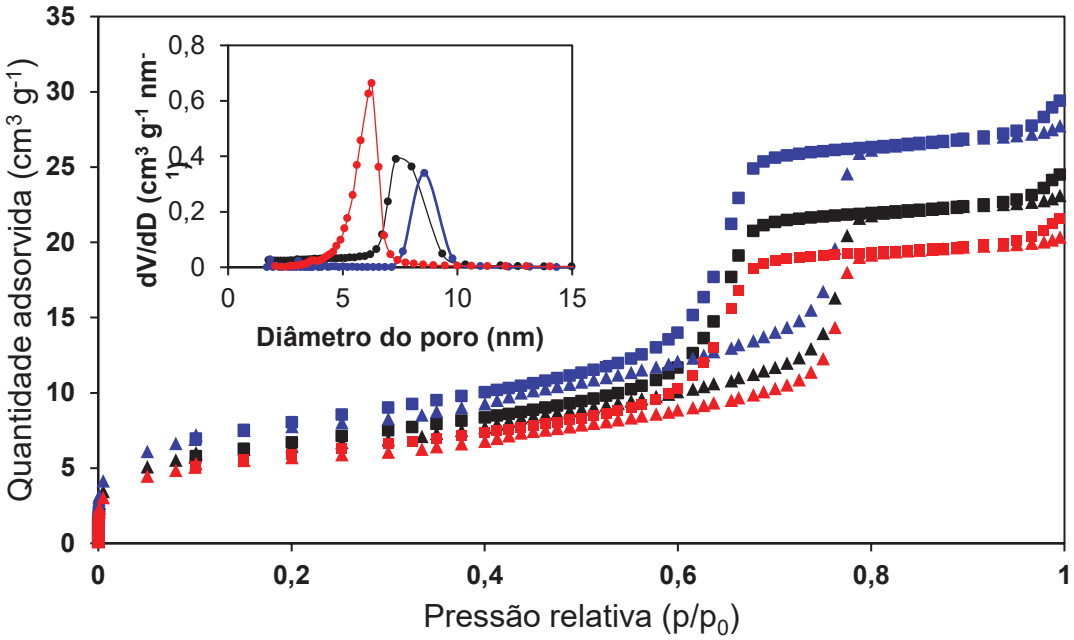


FIGURA 22 – (A) ISOTERMA DE ADSORÇÃO (■) E DESSORÇÃO (▲) DE NITROGÊNIO E (B) CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PORO DE ADSORÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA.

Legenda: Em vermelho, quitosana reticulada com glutaraldeído (QTS/GA), em azul, quitosana reticulada com amido polialdeídico (QTS/APIII), em preto, quitosana sem reticulação (QTS).

A maior área superficial (10,46 m^2 g^{-1}) e o maior distribuição de tamanho de poros (8 nm) foram obtidos para a quitosana reticulada com amido polialdeídico. Os valores destes parâmetros foram similares para as microesferas reticuladas com glutaraldeído (8,42 m^2 g^{-1} e distribuição do tamanho do poro de 6,25 nm) e sem reticulação (9,36 m^2 g^{-1} e distribuição do tamanho do poro de 9 nm), mostrando que a reticulação, por promover ligações intercruzadas na quitosana, diminuiu tanto a área superficial quanto a distribuição do tamanho dos poros.

O resultado obtido para a reticulação da quitosana com glutaraldeído foi próximo aos valores encontrados na literatura. No trabalho de Sowmya e Meenakshi (2014), em que foram preparadas microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído para remoção seletiva de nitratos e fosfatos de soluções aquosas, a área superficial encontrada foi de 9,04 m^2 g^{-1}, porém a distribuição do tamanho de poros não foi determinada. No trabalho de (Luo, Bai e Zhu, 2018), esferas de carboximetil-quitosana foram preparadas utilizando polietilenoglicol como agente formador de poros e em seguida reticuladas com glutaraldeído e utilizadas para a remoção de cobalto (II) de soluções aquosas. A área superficial encontrada foi de 9,36 m^2 g^{-1} e o tamanho dos poros foi de 12,81 nm.

5.3 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUPORTES À BASE DE QUITOSANA

5.3.1 Efeito da composição do suporte na imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens*

O primeiro passo foi selecionar o melhor suporte para imobilização da lipase. Para isso, o processo de imobilização foi conduzido com uma carga inicial de proteína de 10 mg por grama de suporte, utilizando-se uma solução tampão bicarbonato de sódio 0,05 mol L^{-1}, pH 10, contendo Triton X-100 0,15% (m v^{-1}) para auxiliar a dissolução do pó contendo a lipase.

Na Figura 23 estão mostradas as cinéticas de imobilização de LAK nos diferentes suportes. A cinética de imobilização de LAK em QTS/GA, QTS/APIV e QTS/APV mostrou que, para a carga de proteína de 10 mg g^{-1}, a saturação do suporte ocorreu em 4 h. Não se observou diferença significativa entre as cinéticas de imobilização da quitosana reticulada com glutaraldeído e com AP com alto grau de oxidação (APIV, grau de oxidação 77%) e (APV grau de oxidação >99%).

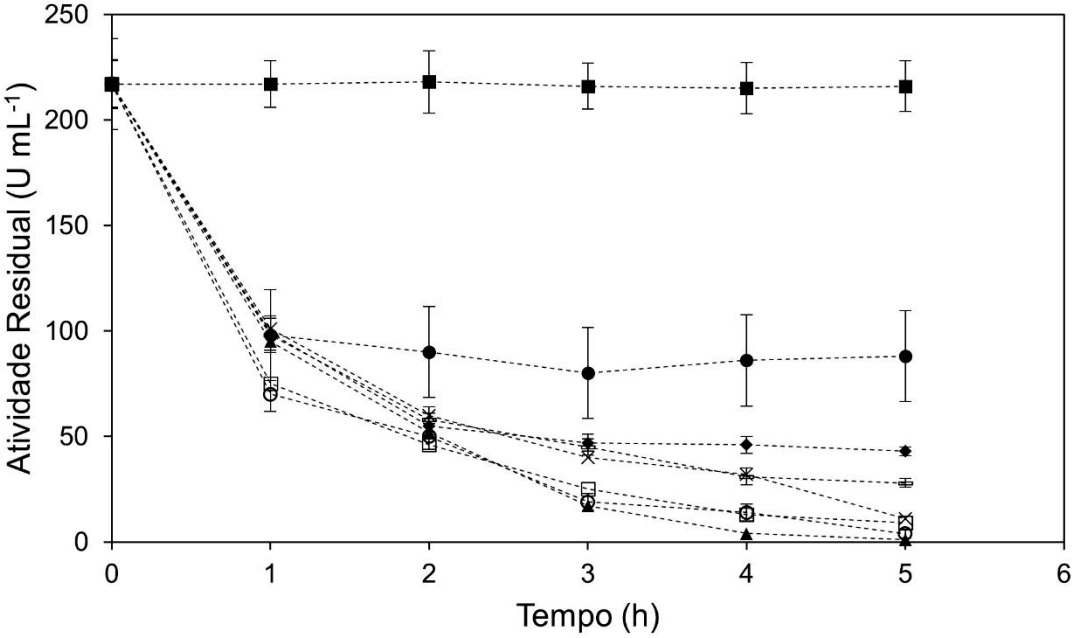


FIGURA 23 – CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUPORTES DE QUITOSANA RETICULADOS COM GLUTARALDEÍDO E COM AMIDO POLIALDEÍDICO COM DIFERENTES GRAUS DE OXIDAÇÃO

Legenda: (●) Quitosana não reticulada (QTS); Quitosana reticulada com: (▲) glutaraldeído 3% (v v^{-1}), QTS/GA; (♦) amido polialdeídico (API), grau de oxidação de 16%; (▬) amido polialdeídico (APII), grau de oxidação de 30%; (x) amido polialdeídico (APIII), grau de oxidação de 56%; (□) amido polialdeídico (APIV), grau de oxidação de 77%; (○) amido polialdeídico (APV), grau de oxidação >99%. Os valores são representados graficamente como as médias

das análises em triplicata ± os erros padrão das médias. Quando a barra de erro não está visível, ela é menor que o símbolo.

Os dados das cinéticas apresentados na Figura 23 permitiram o cálculo dos parâmetros de imobilização, que estão correlacionados com as características do suporte na Tabela 5.

TABELA 5 – EFEITO DAS CARACTERÍSTICAS DO SUPORTE NOS PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO E NA ATIVIDADE DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens*

Suporte	**Teor Aldeídico (mmol mg^{-1})[a]**	**Teor de grupos NH_2 livre no suporte (µmol mg^{-1})[b]**	**Grau de Reticulação (%)[c]**	**EI (%)[d]**	**Atividade (U g^{-1})[e]**	**R (%)[f]**
QTS	**	352 ± 30	**	59	5 ± 2	11
QTS/GA	**	2 ± 4	96	85	153 ± 3	77
QTS/API	0,77	125 ± 3	64	80	103 ± 2	42
QTS/APII	1,5	107 ± 6	69	87	106 ± 6	39
QTS/APIII	3,5	94 ± 5	73	95	156 ± 3	82
QTS/APIV	4,7	73 ± 9	80	96	98 ± 1	33
QTS/APV	8,0	31 ± 3	91	98	86 ± 2	28
LAK livre	**	**	**	**	31 ± 5	**

a) Nº de mols de aldeído fornecidos na solução para ativação das microesferas. b) Determinado pelo ensaio com ninidrina (item 4.5.2, pág. 50). c) Determinado pela Equação 8 (pág 51). d) Eficiência de imobilização calculada por diferença entre a atividade de hidrólise me meio aquoso inicial e final (5 h) no sobrenadante dosadas pelo método do titulométrico, a 35 °C e pH 8,0. e) Atividade de hidrólise em meio orgânico, em unidades por grama de suporte: 4,6 mL de *n*-hexano, 70 mmol de tricaprilina, 2% de água, 100 mg de enzima imobilizada, 160 rpm, 40 ºC, teor de ácidos graxos analisado pelo método Lowry-Tinsley (item 4.9.2, pág. 59). f) Retenção de atividade, calculada através da Equação 16 (pág. 54).

Para todos os suportes reticulados observaram-se altos valores de eficiência de imobilização (EI acima de 80%), sendo os melhores resultados apresentados pelos suportes reticulados com AP (QTS/AP III, IV e V), com eficiências de 95%, 96% e 98% em 24 h, respectivamente, nos quais o aumento do grau de reticulação levou a um aumento de EI. Para a quitosana não-reticulada, a eficiência de imobilização foi baixa (EI = 59%), o que resultou na menor atividade do preparado imobilizado na reação de hidrólise da tricaprilina em meio orgânico, 5 U g^{-1}, um valor mais de 30 vezes menor do que o encontrado para QTS/APIII (156 U g^{-1}).

Os melhores valores de EI (95%), atividade (156 U g^{-1}) e R (82%) foram encontrados para o derivado imobilizado QTS/APIII, preparado com AP de grau intermediários de oxidação (56%) e de grupos aldeído, 3,5 mmol mg^{-1}. Estes valores foram melhores que os obtidos com o

suporte reticulado com glutaraldeído (QTS/GA, EI = 85% , 153 U g^{-1}, 77%), mostrando que o amido polialdeídico como agente reticulante é uma alternativa viável ao glutaraldeído.

Verificou-se que, em teores de aldeído de 0,77 a 3,5 mmol mg^{-1}, a atividade de hidrólise observada no derivado imobilizado aumentou gradativamente de 103 U g^{-1} até 156 U g^{-1}, assim como a retenção da atividade, de 42 a 82% (Tabela 5). No entanto, quando o teor aldeídico foi maior que 3,5 mmol mg^{-1} e graus de oxidação superiores a 56%, a atividade de hidrólise diminuiu e, consequentemente, diminuiu o valor da retenção de atividade, provavelmente devido ao estabelecimento de ligações covalentes multipontuais que podem ter afetado a estrutura cataliticamente ativa de LAK. Resultados semelhantes foram observados por Yang e colaboradores (2019), para nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 revestidas com amido polialdeídico e epicloridrina, que foram utilizadas para imobilizar uma lipase de *Rhizopus sp.*, ao aumentar a quantidade AP com grau de oxidação de 70% na formulação das nanopartículas de 140 mg para 180 mg, a retenção de atividade do preparado imobilizado caiu pela metade.

Tendo em vista os melhores resultados encontrados com QTS/APIII, este suporte foi usado em estudos de carga de proteína subsequentes, sendo os resultados comparados com a quitosana reticulada com glutaraldeído.

5.3.2 Efeito da carga de proteína

Para avaliar o efeito da carga de proteína na imobilização, foram testados 10, 20, 50, 80 e 100 mg de proteína por grama de suporte. As atividades dos preparados imobilizados foram medidas pela a hidrólise da tricaprilina em meio orgânico (Tabela 6). As maiores atividades foram encontradas para carga de proteína 20 mg g^{-1} (183 U g^{-1} para QTS/GA e 196 U g^{-1} para QTS/APIII); acima desta carga, ocorre a saturação de ambos os suportes. Além de ter apresentado uma atividade maior, o derivado imobilizado no suporte reticulado com AP (QTS/APIII) apresentou uma maior retenção de atividade (R = 70% para QTS/APIII e R = 34% para QTS/GA) para a carga de proteína 20 mg g^{-1}.

TABELA 6 – EFEITO DA CARGA DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE E NA RETENÇÃO DE ATIVIDADE DOS DERIVADOS IMOBILIZADOS

		QTS/GA			QTS/APIII		
Carga de proteína (mg g^{-1})[a]	**LAK Livre [b] (U mg^{-1})**	**(U g^{-1})[c]**	**Proteína imobilizada (mg g^{-1})[d]**	**R[e] (%)**	**(U g^{-1})[c]**	**Proteína imobilizada (mg g^{-1})[d]**	**R[e] (%)**
10	21 ± 4	153 ± 5	9,5	77	156 ± 8	10,0	82
20	45 ± 3	183 ± 4	12,0	34	196 ± 6	14,0	70
50	115 ± 10	167 ± 3	13,5	10	178 ± 4	14,0	11
80	185 ± 13	162 ± 3	12,1	6,0	188 ± 3	12,9	6,5
100	231 ± 21	166 ± 4	11,8	5,0	180 ± 4	14,3	5,0

a) mg por grama de suporte; b) Unidade por mg de proteína; c) Unidade por grama de suporte; d) Calculada por diferença entre a carga de proteína oferecida e a residual no sobrenadante; e) Retenção de atividade, Equação 16 (pág. 54). Quitosana reticulada com glutaraldeído 3% (v v^{-1}) (QTS/GA), quitosana reticulada com amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII). Atividade de hidrólise em meio orgânico, unidades por grama de suporte: 4,6 mL de *n*-hexano, 70 mmol de tricaprilina, 2% de água, 100 mg de enzima imobilizada, 160 rpm, 40 ºC, teor de ácidos graxos analisado pelo método Lowry-Tinsley.

A partir destes resultados, foi selecionada a carga de proteína de 20 mg g^{-1} para ambos os suportes para a continuação dos estudos de estabilidade à temperatura e em solventes orgânicos.

5.3.3 Estabilidade à temperatura

A estabilidade dos derivados imobilizados QTS/GA/LAK E QTS/APIII/LAK foi estudada incubando-os em *n*-hexano em diferentes temperaturas por 8 h sob agitação de 160 rpm. A atividade residual dos derivados foi determinada pela hidrólise da tricaprilina em meio orgânico. Os resultados foram comparados com os da LAK livre, incubada em tampão e com determinação da atividade em meio aquoso, usando o mesmo substrato.

Observou-se que, para os derivados imobilizados, a atividade foi mantida em 100% após incubação por 8 h até 50 ºC (Figura 24); a partir desta temperatura, houve um decréscimo na atividade para ambos derivados imobilizados, com queda mais acentuada (30%) para QTS/GA/LAK, a 60 ºC. Mesmo assim, ambos derivados mostraram alta atividade residual, mesmo a 70 ºC, com atividades residuais de 60 e 74% para QTS/GA/LAK e QTS/APIII/LAK, respectivamente. Por outro lado, LAK livre começa a perder atividade a partir de 40 ºC, com queda linear até 70 ºC, quando apresenta 35% de atividade residual. É importante salientar que a comparação das atividades residuais dos derivados imobilizados com LAK livre deve ser feita com cautela, porque os métodos de incubação e dosagem de atividade foram diferentes dos utilizados

para os derivados imobilizados. Isto ocorreu para facilitar a recuperação de LAK livre do meio de incubação.

A maior estabilidade de LAK imobilizada é provavelmente resultado de sua maior rigidez, conferida pelas ligações covalentes estabelecidas com o suporte. Além disso, os grupos hidroxila das moléculas de amido polialdeídico podem interagir com o grupos hidrofílicos na superfície da proteína, e esta série de ligações fracas fortaleceria ainda mais a estrutura de LAK, tornando-a capaz de resistir às mudanças no microambiente enzimático (KAZAN et al., 1997).

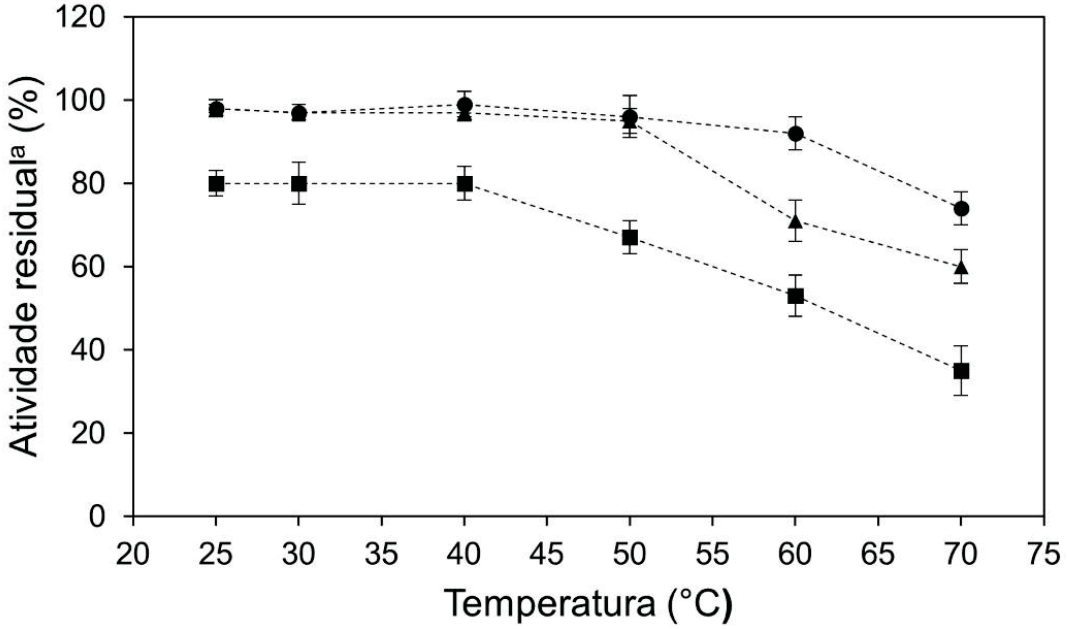


FIGURA 24 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* (LAK) LIVRE E IMOBILIZADA

Legenda: LAK livre (■), QTS/GA/LAK (▲) e QTS/APIII/LAK (●). LAK imobilizada foi incubada em 2 mL de *n*-hexano por 8 h; a atividade residual foi avaliada pela hidrólise da trioleína em meio orgânico. LAK livre foi incubada em 1 mL de tampão (50 mmol $L^{-}1$ Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L^{-1} de NaCl, 2 mmol L^{-1} de $CaCl_2$) por 8 h. Atividade residual de LAK livre foi avaliada pelo método titulométrico com trioleína como substrato. As barras de erro são o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

5.3.4 Estabilidade em solventes orgânicos

A estabilidade do derivado imobilizado QTS/APIII/LAK em meio orgânico foi determinada por incubação por 8 h em solventes com diferentes valores de log P, a 35 ºC, seguida da determinação das atividade residuais, comparando-as com o controle, realizado sem pré-incubação (Figura 24)

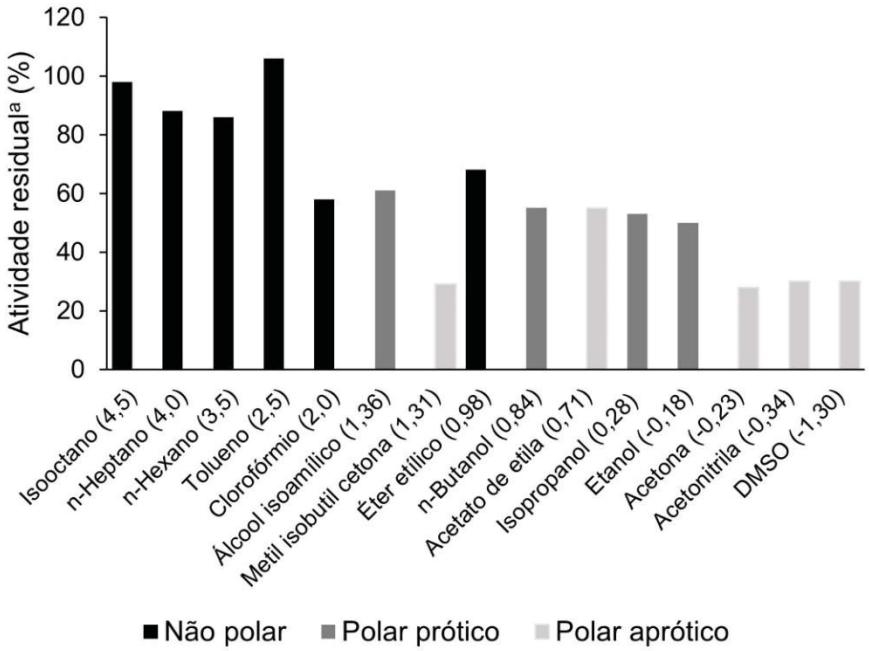


FIGURA 25 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE ORGÂNICO NA ATIVIDADE DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* IMOBILIZADA EM QUITOSANA RETICULADA COM AMIDO POLIALDEÍDICO (QTS/APIII/LAK)

Legenda: 100 mg de QTS/APIII/LAK incubados em 2 mL dos solventes, 8 h de incubação, 160 rpm, 35 °C. a) A atividade residual foi avaliada pela hidrólise da tricaprilina em meio orgânico. A atividade de QTS/APIII/LAK sem incubação (196 U g^{-1}) foi considerada 100%.

Os resultados apresentados na Figura 25 mostram que, dentre os quinze solventes testados, a LAK imobilizada apresentou boa tolerância em solventes orgânicos não polares, como isooctano (log P 4,5), (log P 4,0), *n*-hexano (log P 3,5), *n*-heptano, e tolueno (log P 2,5), em que a atividade foi mantida em valores acima de 80% mesmo após 8 h de incubação a 35 °C. Já em relação aos solventes hidrofílicos, observou-se uma redução da atividade com o aumento da polaridade dos solventes, sendo que esta perda foi mais acentuada após incubação em acetona (72%) durante 8 h (Figura 25). A maior perda de atividade após ser incubada em DMSO também ocorreu para a lipase de metagenômica LipG9 imobilizada em Accurel MP-1000, que perdeu totalmente a atividade após incubação neste solvente durante 8 h a 30 °C (ALNOCH et al., 2015).

Laane et al., (1987) discutiram amplamente os parâmetros de diferentes solventes orgânicos, como a constante dielétrica, o momento dipolar e o logaritmo do coeficiente de partição, log P, e concluíram que este último, era o que melhor se correlacionava com a atividade enzimática. Os solventes hidrofóbicos com valores de log P maiores ou igual a 4 são considerados os mais adequados para as reações biocatalisadas. Solventes com log P entre 2 e 4 são considerados moderados, e a estabilidade em solventes orgânicos polares com log P menores que 2 é uma

característica incomum para a maioria das lipases, devido à capacidade desses solventes em retirar a água de solvatação da superfície da enzima, desnaturando-a. Os resultados apresentados no presente trabalho estão, portanto, parcialmente acordo com o proposto por Laane et al, (1987), pois em solventes com log P acima de 2,5 foram encontradas as maiores atividades residuais. A exceção é o resultado encontrado para incubação em tolueno, pois o derivado imobilizado QTS/APIII/LAK apresentou a mais alta atividade residual (acima de 100%), mostrando ativação da enzima após exposição por 8 h a 35 °C. Uma possível explicação foi proposta por de Yaacob e colaboradores (2016), para a lipase de *P. fluorescens* AMS8 livre, estudada *in silico* com foco na adaptação estrutural e flexibilidade antes da exposição a solventes apolares, polares apróticos e polares próticos. Em tolueno, foi possível prever interações de empilhamento π-π com o anel aromático da cadeia lateral dos aminoácidos fenilalanina e tirosina da enzima. Além disso, a simulação de dinâmica molecular mostrou que a tampa hidrofóbica se mostrou muito flexível em tolueno. Como resultado, esta região da proteína se move, aumentando a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima.

As mais baixas atividades encontradas com solventes polares podem ser explicadas pela interação da água de solvatação de enzimas, livres ou imobilizadas, com estes solventes. Nas enzimas, há uma pequena camada de água essencial que recobre microambiente enzimático, servindo de proteção entre a superfície da enzima e o solvente orgânico. Os solventes que são capazes de remover a quantidade de água da estrutura proteica inativam a enzima.

5.3.5 Aplicação da lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada na síntese do oleato de etila

A Figura 26 apresenta o perfil de conversão do éster na síntese do oleato de etila utilizando LAK imobilizada nos diferentes suportes. Para os ensaios, foram utilizados 100 mg dos derivados imobilizados. Verificou-se que o melhor derivado imobilizado foi o obtido com amido polialdeídico com 56% grau de oxidação e 3,5 mmol mg^{-1} de grupos aldeído (QTS/APIII/LAK), com 72% de conversão em 2 h de reação, seguido do QTS/APII, com 30% de grau de oxidação e 1,5 mmol mg^{-1} de grupos aldeído, que produziu 57% de conversão no mesmo tempo. Por outro lado, o derivado imobilizado com quitosana reticulada com glutaraldeído (QTS/GLU/LAK) produziu uma conversão de 47%, não havendo diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre as conversões obtidas com QTS/GLU e os derivados de quitosana obtidos com maior grau de oxidação (QTS/APIV e QTS/APV com graus de oxidação de 77% e >99%, respectivamente).

As atividades de esterificação, calculadas nos 60 min iniciais das cinéticas da Figura 26, (Tabela 7) mostram claramente as diferenças de atividade entre os preparados enzimáticos: a

atividade aumenta com o grau de oxidação do AP utilizado na reticulação da quitosana, até o máximo, obtido com o preparado QTS/APIII (124 U g^{-1}), para então decair quando o grau de oxidação do AP aumenta, provavelmente devido ao aumento de ligações covalentes multipontuais conferida pelo aumento de grupos aldeído disponíveis no suporte. Estes resultados confirmam os obtidos anteriormente para atividade de hidrólise (Tabela 5), nos quais a atividade de hidrólise aumenta com o grau de oxidação do AP, até o máximo obtido com o preparado QTS/APIII, e então decai.

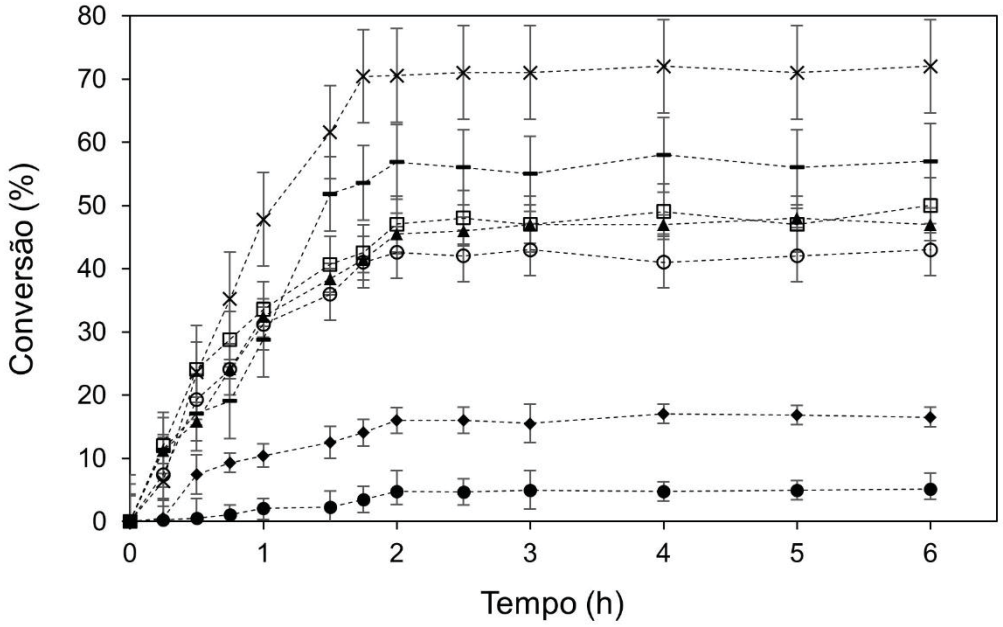


FIGURA 26 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE de *Pseudomonas fluorescens*

Legenda: (●) Quitosana não reticulada (QTS). Quitosana reticulada com: (▲) glutaraldeído 3% (v v^{-1}) (QTS/GA); (♦) amido polialdeídico com grau de oxidação de 16% (QTS/API); (▬) amido polialdeídico com grau de oxidação de 30% (QTS/APII); (x) amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII); (□) amido polialdeídico com grau de oxidação de 77% (QTS/APIV); (○) amido polialdeídico com grau de oxidação >99% (QTS/APV). Condições reacionais: 100 mg dos derivados imobilizados, ácido oleico (210 µmol), etanol (630 µmol), *n*-hexano (3,0 mL), 40 °C, 160 rpm

TABELA 7 – ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DOS DERIVADOS IMOBILIZADOS

Preparado imobilizado	Atividade de esterificação (U g^{-1}_{sup})
QTS	3,2 ± 2
QTS/GA	44 ± 7
QTS/API	16 ± 6
QTS/APII	98± 5
QTS/APIII	124 ± 11
QTS/APIV	50 ± 6
QTS/APV	41 ± 3

Legenda: Quitosana não reticulada (QTS); quitosana reticulada com: glutaraldeído 3% (v v^{-1}) (QTS/GA); amido polialdeídico com grau de oxidação de 16% (QTS/API); amido polialdeídico com grau de oxidação de 30% (QTS/APII); amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII); amido polialdeídico com grau de oxidação de 77% (QTS/APIV); amido polialdeídico com grau de oxidação >99% (QTS/APV). Condições reacionais: 100 mg dos derivados imobilizados, ácido oleico (210 µmol), etanol (630 µmol), n-hexano (3,0 mL), 40 °C, 160 rpm.

Embora as condições da reação ainda não estejam otimizadas, os resultados obtidos para LAK imobilizada em QTS/APIIl (conversão de 72% em 2 h) são considerados promissores quando comparados à literatura (Tabela 8) para ensaios realizados em condições semelhantes, uma vez que apenas o resultado de Madalozzo et al. (2014), usando a lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* (ROL), foi melhor, com 79% de conversão após 30 min de reação.

TABELA 8 – ESTUDOS SOBRE O USO DE LIPASES IMOBILIZADAS NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Lipase	Suporte	Razão molar (álcool:ácido graxo)	Solvente	Conversão %, Tempo (h)	Referência
LAK	Quitosana Reticulada com AP	3:1	*n*-hexano	72%, 2 h	Este trabalho
Lipase recombinante de *Rhizopus oryzae*	Accurel MP 1000	1,4:1	*n*-heptano	79, 0,5	(MADALOZZO et al., 2014)
LipC12	Immobead 150	3:1	*n*-hexano	95%, 4 h	(MADALOZZO et al., (2015)
LipG9	Accurel MP 1000	3:1	*n*-heptano	95%, 7 h	(ALNOCH et al., 2015)

Lipase recombinante de *Burkholderia contaminans* LTEB11	Sepabeads	3:1	*n*-hexano	90%, 6 h	(ALNOCH et al., 2018)
Lipase recombinante de *Burkholderia contaminans* LTEB11	Filmes de amido/ poliéster/ argila	3:1	*n*-heptano	96%, 6 h	(SIMÕES et al., 2020)

5.3.6 Aplicação da lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada na síntese do cinamato de etila

Para a preparação deste éster foram utilizados os derivados imobilizados QTS/GA/LAK e QTS/APIII/LAK (Figura 27). Em 20 h de reação, as conversões obtidas foram 76% e 43%, respectivamente, para os derivados imobilizados QTS/APIII/LAK e QTS/GA/LAK em 40 h de reação, as diferenças se mantêm, com 83% para QTS/APIII/LAK e apenas 60% para QTS/GA/LAK, confirmando a maior atividade de esterificação, conforme resultados anteriores obtidos para a síntese do oleato de etila, do derivado obtido com a quitosana reticulada com amido polialdeídico.

Vale ressaltar que o sistema utilizado na síntese do cinamato de etila é livre de solventes exógenos como o *n*-hexano, utilizado nas reações anteriores e que, devido à alta concentração dos substratos, a reação ocorre mais lentamente, com possível desnaturação da lipase pelos substratos, particularmente o etanol. Isto pode explicar o atingimento de um platô após 20 h de reação para QTS/APIII/LAK e após 30 h de reação para QTS/GA/LAK.

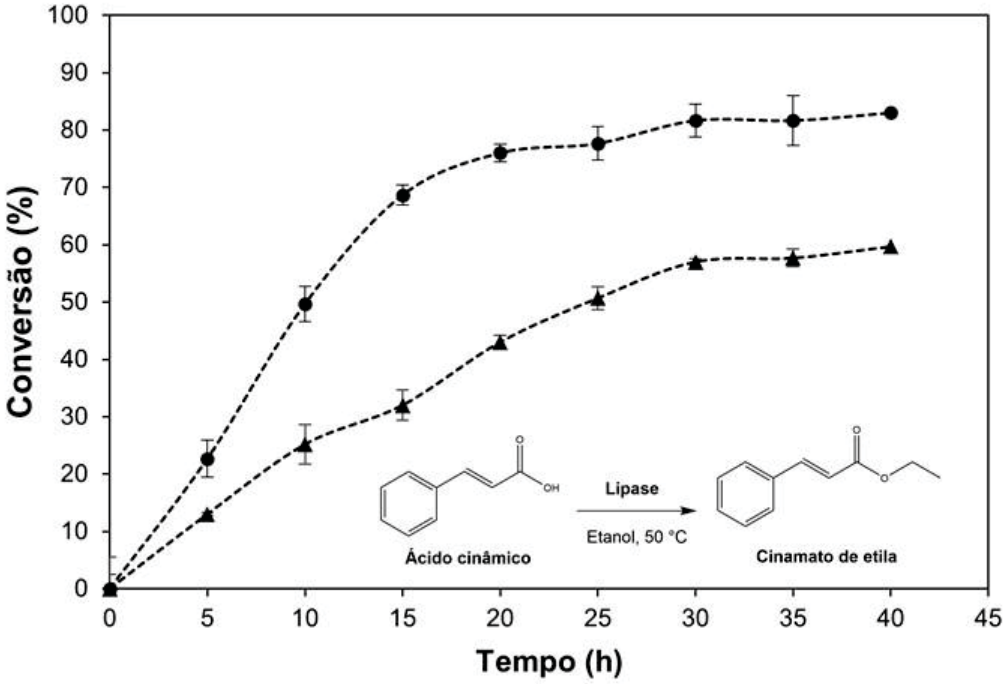


FIGURA 27 – CINÉTICA DA SÍNTESE DE CINAMATO DE ETILA CATALISADA PELA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* IMOBILIZADA EM QUITOSANA RETICULADA, EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

Legenda: (▲) QTS/GA, quitosana reticulada com glutaraldeído 3% (v v^{-1}), (●) QTS/APIII/LAK, quitosana reticulada com amido polialdeídico com grau de oxidação de 56%. Condições reacionais: 100 mg dos preparados imobilizados, ácido cinâmico (5,0 mmol, 740 mg), álcool etílico (4 mL), 50 °C, 160 rpm.

O cinamato de etila é um ingrediente usado em muitos componentes de fragrâncias. Pode ser encontrado em perfumes finos, shampoos, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal, bem como em produtos não cosméticos, como produtos de limpeza doméstica e detergentes. Seu uso em todo o mundo é da ordem de uma tonelada por ano (BHATIA et al., 2007)

Dado o interesse industrial, diferentes estudos sobre a preparação de ésteres do ácido cinâmico utilizando lipases em diferentes meios reacionais foram relatados (Tabela 9). Foram testados álcoois alquílicos de cadeias variando entre metanol a dodecanol, álcool benzílico, álcool oleico, geraniol e D-sorbitol. As melhores conversões nos menores tempos foram obtidas para o geraniol, utilizando Novozyme 435 (CALB), com 97% de conversão em 1 h, em *n*-heptano a 70 ºC (ZANETTI et al., 2014). Em sistema similar, assistido por micro-ondas, foi obtida uma conversão de 88% em 15 min de reação (SHINDE e YADAV, 2014).

No trabalho de Guyot e colaboradores (1997), a síntese enzimática do cinamato de etila foi relatada pela primeira vez, em um sistema livre de solventes, utilizando lipase Novozyme 435 (CALB) por esterificação de ácido cinâmico com etanol, mas apenas 2% de rendimento foi alcançado após 7 dias de reação, a 60 °C. Jakovetic e colaboladores (2013) empregaram isooctano como solvente da reação para sintetizar o cinamato de etila utilizando a mesma enzima imobilizada (Novozym 435), sendo a conversão máxima em éster de 35,2% após 96 h. Sharma e colaboradores (2011) observaram um valor de conversão em cinamato de etila de 54% em 27 h de reação, a 65 °C, utilizando a lipase de pâncreas de porco imobilizada em hidrogel de acrilatos. No trabalho de Wang e colaboradores (2016), após a otimização das condições de reação, a conversão da reação atingiu 99% em 24 h, a 50 °C, utilizando 30 mg da lipase comercial Lipozyme TLIM (Novozymes) e razão molar de substrato de 1:3 (ácido cinâmico:etanol).

Portanto, comparativamente, os resultados obtidos no presente trabalho para a síntese do cinamato de etila utilizando QTS/APIII são excelentes (76% de conversão em 20 h e 83% em 40 h), pois utilizou-se um sistema livre de solventes orgânicos. Os trabalhos que utilizaram sistemas livres de solventes relataram baixas conversões e/ou elevados tempos reacionais, mesmo utilizando Novozyme 435: 30% em 48 h para a síntese do cinamato de butila (GUYOT et al., 1997), 82% em 288 h para a síntese do cinamato de octila (STAMATIS et al., 1999), e 26%, 48 h para o cinamato de dodecila (GUYOT et al.,1997).

TABELA 9 – EXEMPLOS DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO CINÂMICO CATALISADAS POR LIPASES (Continua)

Álcool	**Razão molar (ácido cinâmico:álcool)**	**Biocatalisador**	**Suporte**	**Tempo de reação**	**Solvente, Temperatura (°C)**	**Conversão (%)**	**Referência**
Metanol	1:1	Lipase de *B. licheniformis* MTCC-10498	Sílica	12 h	DMSO, 55 °C	63	(SHARMA et al., 2012)
Metanol	1:1	Lipase de *Bacillus aerius*	Celite-545	10 h	DMSO, 55 °C	64	(SAUN et al., 2017)
Etanol	1:22	LAK imobilizada	(QTS/APIII)	20 h	Sem solvente, 50 °C	76	Este trabalho
Etanol	1:18	Novozym 435	n.a	96 h	Isooctano, 55 °C	35	(JAKOVETIĆ et al., 2013)
Etanol	1:1	Lipase de pancreas suíno	Hidrogel	27 h	DMSO, 65 °C	54	(SHARMA et al., 2011)
Etanol	1:3	Lipozyme TLIM	n.a	24 h	Isooctano, 50 °C	99	(WANG et al., 2016)
n-Propanol	1:1	Lipolase T100	Sílica	2,5 h	DMSO, 45 °C	95	(THAKUR et al., (2012)

Álcool	Razão molar (ácido cinâmico:álcool)	Biocatalisador	Suporte	Tempo de reação	Solvente, Temperatura (°C)	Conversão (%)	Referência
n-Propanol	1:1	Lipase de *Bacillus aerius*	Celite-545	12 h	DMSO, 55 °C	64	(SAUN et al. 2017)
n-Butanol	1:18	Novozym 435	n.a	72 h	Isooctano, 55 °C	60	(JAKOVETIĆ et al. 2013)
n-Butanol	1:178	Novozym 435	n.a	48 h	Sem solvente, 60 °C	30	(GUYOT et al., 1997)
n-Butanol	1:1	Novozym 435	n.a	360 h	Isooctano, 60 °C	97	(GUYOT et al., 1997)
n-Butanol	1:1	Novozym 435	n.a	96 h	*n*-Pentano, 50 °C	85	(BUISMAN et al., 1998)
1-Pentanol	1:18	Novozym 435	n.a	96 h	Isooctano, 55 °C	20	(JAKOVETIĆ et al., 2013)
1-Hexanol	1:1	Novozym 435	n.a	120 h	*n*-Pentano, 50 °C	70	(BUISMAN et al., 1998)
1-Heptanol	1:18	Novozym 435	n.a	96 h	Isooctano, 55 °C	16	(BUISMAN et al., 1998)
1-Octanol	1:56	Novozym 435	n.a	288 h	Sem solvente, 50 °C	82	(STAMATIS et al., 1999)

Álcool	Razão molar (ácido cinâmico:álcool)	Biocatalisador	Suporte	Tempo de reação	Solvente, Temperatura (°C)	Conversão (%)	Referência
1-Octanol	1:56	Lipase de *R. miehei* (Lipozyme)	n.a	288 h	Sem solvente, 50 °C	59	(STAMATIS et al., 1999)
1-Octanol	1:1	Lipase de *R. miehei* (Lipozyme)	n.a	288 h	*t*-butanol, 50 °C	12	(STAMATIS et al., 1999)
1-Dodecanol	1:178	Novozym 435	n.a	48 h	Sem solvente, 60 °C	26	(GUYOT et al., 1997)
1-Dodecanol	1:1	Novozym 435	n.a	120 h	*n*-Pentano, 50 °C	68	(BUISMAN et al., 1998)
Álcool benzílico	1:3	Lipase de pancreas suíno	Estruturas metal-orgânicas (MOFs)	12 h	Isooctano, 55 °C	96	(NOBAKHT et al., 2018)
Álcool benzílico	1:1	Lipozyme TLIM	n.a	27 h	Isooctano, 40 °C	97	(Buisman et al., 1998)

Álcool	Razão molar (ácido cinâmico:álcool)	Biocatalisador	Suporte	Tempo de reação	Solvente, Temperatura (°C)	Conversão (%)	Referência
Geraniol	1:2	Novozym 435	n.a	0,25 h	*n*-Heptano, 60 °C (micro-ondas)	88	(SHINDE e YADAV, 2014)
Geraniol	1:3	CALB	Resina NS88011	1 h	*n*-Heptano, 70 °C	97	(ZANETTI et al., 2017)
Álcool oleico	1:6	Novozym 435	n.a	288 h	*n*-Hexano/2-butanona 50 °C	99	(LUE et al., 2005)
D-Sorbitol	1:1	Novozym 435	n.a	96 h	*t*-Butanol, 37 °C.	80	(KIM et al., 2015)

Tabela 9 – Conclusão

n.a: não aplicável

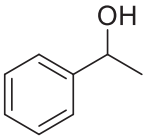
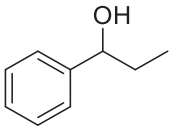
Novozyme 435: Lipase de *Candida antarctica B* imobilizada por adsorção em resina é um suporte macroporosa de poli-(metacrilato de metila) e divinilbenzeno.

Lipozyme TL-IM: Lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em resina de troca iônica.

5.3.7 Aplicação da lipase de *Pseudomonas. fluorescens* imobilizada na resolução cinética de (*RS*)-1-feniletanol e (*RS*)-1-fenilpropanol

Nesta etapa, os derivados imobilizados QTS/APIII/LAK e QTS/GLU/LAK foram avaliados nas reações de resolução cinética do (*RS*)-1-feniletanol e (*RS*)-1-fenilpropanol, que são normalmente adotados como substratos-modelo para determinação da enantiosseletividade de lipases. Os resultados da resolução cinética foram comparados com os obtidos com CALB, que é reconhecidamente *R*-preferente na resolução destes álcoois secundários (Tabela 10).

TABELA 10 – REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA DOS COMPOSTOS (*RS*)-**1** E (*RS*)-**2** MEDIADAS PELA LIPASE IMOBILIZADA DE *Pseudomonas fluorescens*

Entrada	**Substrato**	**Biocatalisador**	**Tempo (h)**	**C[a] (%)**	**ee(%)[b]**	
					(*S*)-álcool	**(*R*)-éster**
1	 (*RS*)-**1**	Novozyme 435	2	50	99	99
2		LAK livre	24	12	13	99
3		QTS/GA/LAK	24	38	61	99
4		QTS/APIII/LAK	24	43	74	99
5	 (*RS*)-**2**	Novozyme 435	36	50	99	99
6		LAK livre	36	5	5	99
7		QTS/GA/LAK	36	21	26	99
8		QTS/APIII/LAK	36	36	56	99

a) conversão: c=100x(ee_s/ee_s+ee_p); b) excesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma. Condições reacionais: (65 mg de QTS/APIII/LAK, 68 mg de LAK livre ou 24 mg de Novozym 435), (*RS*)-1-feniletanol (0,1 mmol; 12 µL), (*RS*)-1-fenilpropanol (0,1 mmol; 13,7 µL), acetato de vinila (0,4 mmol; 37 µL), *n*-hexano (2 mL), 35 °C, 180 rpm.
Lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre (LAK), LAK imobilizada em quitosana reticulada com glutaraldeído 3% (v v^{-1}) (QTS/GA/LAK), LAK imobilizada em quitosana reticulada com amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII/LAK).

Na resolução cinética de (*RS*)-1-feniletanol, como esperado, a mais alta conversão no menor tempo foi obtida para a reação catalisada por Novozymes 435, (50% em 2 h), com altos valores de excesso enantiomérico: 99% para o álcool (*S*)-**1** e 99% para o éster (*R*)-**1a** (Tabela 10 – Entrada 1). O segundo melhor resultado foi obtido para o derivado imobilizado QTS/APIII/LAK com 43% de conversão em 24 h (Tabela 10 – Entrada 4), seguindo-se QTS/GA/LAK, com 38% de conversão no mesmo tempo (Tabela 10- Entrada 3). Para todos os casos, os coeficientes enantioméricos (*E*) foram elevados (E>200).

A vantagem da imobilização de LAK foi verificada pela comparação dos resultados com LAK livre, que apresentou uma conversão de apenas 12% em 24 h-(Tabela 10 – entrada 2). Na literatura, a utilização de LAK livre na resolução cinética do (*RS*)-1-feniletanol produz baixos valores de conversão (HAN et al., 2016).

O álcool (*RS*)-**2** possui um átomo de carbono a mais que o álcool (*RS*)-**1,** aumentando o impedimento estérico, e, devido a isto, a reação de transesterificação deste álcool é mais lenta. A reação padrão de transesterificação do álcool (*RS*)-**2** mediada pela CALB em *n*-hexano, apresentou a conversão de 50% em 36 h. No mesmo tempo, QTS/APIII/LAK produziu uma conversão de 36% e valores de excesso enantiomérico de 56% para o álcool (*S*)-**2** e 99% para o éster (*R*)-**2a** (Tabela 10 – Entrada 8). A reação mediada por QTS/GA/LAK alcançou 21% de conversão em 36 h de reação, com valores de excesso enantiomérico de 26% para o álcool (*S*)-**2** e 99% para o éster (*R*)-**2a** (Tabela 10 – Entrada 7).

Diante dos resultados apresentados observou-se que os derivados imobilizados produzidos com quitosana reticulada com amido polialdeídico são promissores em reações de resolução cinética, porém, para o emprego comercial se mostra necessário a otimização dos parâmetros da reação como temperatura, solvente e quantidade de enzima utilizada, para a diminuição do tempo de reação e aumento dos valores de conversão.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, que envolveu a preparação de um suporte à base de quitosana e amido polialdeídico para a imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* AK, permitiram as seguintes conclusões:

(i) Caracterização do suporte

- A análise de FT-IR do amido polialdeídico mostrou mudanças nos valores de transmitância nas bandas relacionadas, dando indícios de que houve a inserção de grupos aldeído.
- A titulação potenciométrica, devido a sua simplicidade, disponibilidade de equipamento, utilização de pequenas quantidades de amostras e reagentes simples mostrou ser uma eficiente técnica para quantificar o teor de grupos aldeído, bem como, para determinar o grau de oxidação do amido modificado.
- A análise de FT-IR comprovou a presença de todos os grupos funcionais da quitosana e de suas modificações, sendo útil para a caracterização dos suportes.

(ii) Caracterização da enzima imobilizada

- A retenção de atividade do preparado imobilizado foi maior quando se utilizou o amido polialdeídico como agente de ativação das esferas de quitosana, para uma carga de proteína de 20 mg g^{-1}.
- O melhor suporte, considerando a eficiência de imobilização, saturação do suporte e a retenção de atividade foi a quitosana reticulada com amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII).
- A enzima imobilizada foi mais estável em solventes orgânicos que a livre, apresentando estabilidade até 70 °C, quando incubada por 8 h. A enzima também se mostrou estável em uma ampla faixa de solventes orgânicos apolares.

(iii) Estudos de utilização da enzima imobilizada

- Nas reações de preparação do oleato de etila, e do éster de aroma, cinamato de etila, a catálise foi mais eficiente, em termos de produtividade, para o sistema utilizando a lipase

imobilizada em QTS/APIII quando comparado com o sistema utilizando quitosana reticulada com glutaraldeído 3% (v v^{-1}) (QTS/GA).

- A resolução enzimática do (*RS*)-1-feniletanol (**1**) e (*RS*)-1-fenilpropanol (**2**), utilizando a lipase imobilizada em QTS/APIII mostrou-se promissora.

De modo geral, conclui-se que a imobilização de *Pseudomonas fluorescens* (LAK) em quitosana ativada com amido polialdeídico é promissora, garantindo à LAK maior estabilidade. Esses resultados destacam o potencial de aplicação do amido polialdeídico como agente de reticulação para a imobilização de lipases em materiais à base de quitosana e que este pode substituir o glutaraldeído. Assim, ressalta-se a vantagem da utilização de biopolímeros como suporte para imobilização de enzimas. Além disso, a modificação química destes biopolímeros é um campo em desenvolvimento que oferece potencial inexplorado para buscar materiais funcionais, inovadores e avançados a partir de recursos abundantes para melhorar processos biocatalisados. Esta estratégia para obter um novo biocatalisador imobilizado utilizando uma matriz polimérica renovável pode ser considerada ambientalmente correta e de baixo custo.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomendam-se as seguintes ações:

1. Modificação de outros polímeros de carboidratos, como pectinas, dextrana, galactomananas, entre outros, para ativação de quitosana.

2. Estudos que objetivem a imobilização de outras lipases, e até mesmo outras enzimas, nos suportes à base de quitosana e amido modificado.

3. Produção de outros ésteres de interesse industrial, como por exemplo, ésteres de açúcares, lipídios estruturados, utilizando o biocatalisador QTS/APIII/LAK.

APÊNDICE A

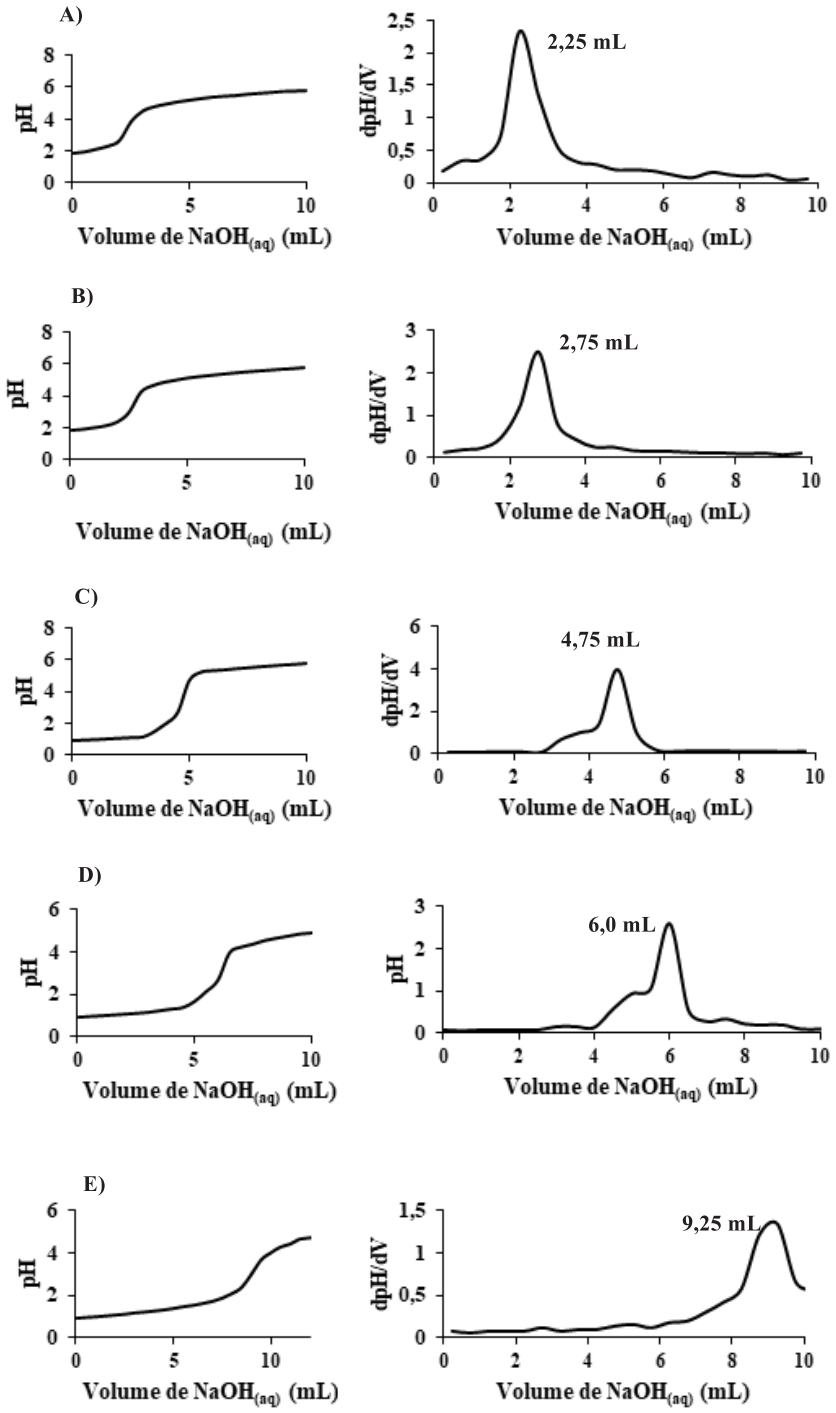


FIGURA 18 – PERFIL DAS CURVAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DOS DIFERENTES TEORES DE GRUPOS ALDEÍDO

(A) Amido polialdeídico com grau de oxidação de 16% (API); (B) amido polialdeídico com grau de oxidação de 30% (QTS/APII); (C) amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII); (D) amido polialdeídico com grau de oxidação de 77% (QTS/APIV); (E) amido polialdeídico com grau de oxidação >99% (QTS/APV).

REFERÊNCIAS

ABD-ELHAKEEM, M. A.; ELSAYED, A. M.; ALKHULAQI, T. A. Activity and

stability of immobilized *Candida rugosa* lipase on chitosan coated Fe_3O_4 nanoparticles in aqueous and organic media. **Journal of Advances in Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 2478–2483, 2014.

AGUSTIAN, J.; KAMARUDDIN, A. H.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Enantio-conversion and -selectivity of racemic atenolol kinetic resolution using free *Pseudomonas fluorescens* lipase (Amano) conducted via transesterification reaction. **RSC Advances**, v. 6, n. 31, p. 26077–26085, 2016.

ALNOCH, R. C.; ALVES DOS SANTOS, L.; MARQUES DE ALMEIDA, J.; KRIEGER, N.; MATEO, C. Recent trends in biomaterials for immobilization of lipases for application in non-conventional media. **Catalysts**, v. 10, n. 6, p. 697, 2020.

ALNOCH, R. C.; MARTINI, V. P.; GLOGAUER, A.; COSTA, A. C. D. S.; PIOVAN, L.; MULLER-SANTOS, M.; SOUZA, E. M. DE; PEDROSA, F. D. O.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2015.

ALNOCH, R. C.; STEFANELLO, A. A.; PAULA MARTINI, V.; RICHTER, J. L.; MATEO, C.; SOUZA, E. M. DE; MITCHELL, D. A.; MULLER-SANTOS, M.; KRIEGER, N. Co-expression, purification and characterization of the lipase and foldase of *Burkholderia contaminans* LTEB11. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 1222–1231, 2018.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem J**, v. 343 Pt 1, p. 177–183, 1999.

ASSIS GONSALVES, A. DE; ARAUJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. DE. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quimica Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 877–882, 2006.

BHATIA, S. P.; WELLINGTON, G. A.; COCCHIARA, J.; LALKO, J.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on ethyl cinnamate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, Supplement 1, p. S90–S94, 2007.

BILAL, M.; ASGHER, M.; CHENG, H.; YAN, Y.; IQBAL, H. M. N. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 202–219, 2019.

BRADY, D.; REDDY, S.; MBONISWA, B.; STEENKAMP, L. H.; ROUSSEAU, A. L.; PARKINSON, C. J.; CHAPLIN, J.; MITRA, R. K.; MOUTLANA, T.; MARAIS, S. F.;

GARDINER, N. S. Biocatalytic enantiomeric resolution of L-menthol from an eight isomeric menthol mixture through transesterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.L.], v. 75, p. 1-10, 2012.

BREM, J.; TOŞA, M. I.; PAIZS, C.; MUNCEANU, A.; MATKOVIĆ-ČALOGOVIĆ, D.; IRIMIE, F. D. Lipase-catalyzed kinetic resolution of racemic 1-(10-alkyl-10H- phenothiazin-3-yl)ethanols and their butanoates. **Tetrahedron Asymmetry**, [S.L.], v. 21, n. 16, p. 1993-1998, 2010.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309–319, 1938.

BUISMAN, G. J. H.; HELTEREN, C. T. W. VAN; KRAMER, G. F. H.; VELDSINK, J. W.; DERKSEN, J. T. P.; CUPERUS, F. P. Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 2, p. 131–136, 1998.

CAHN, R. S.; INGOLD, C.; PRELOG, V. Specification of Molecular Chirality. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 5, n. 4, p. 385–415,1966.

CASAS-GODOY, L.; GASTEAZORO, F.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; MARTY, A.; SANDOVAL, G. Lipases: an overview. Lipases And Phospholipases, [S.L.], p. 3-38, 2018.

CEN, Y.; SINGH, W.; ARKIN, M.; MOODY, T. S.; HUANG, M.; ZHOU, J.; WU, Q.; REETZ, M. T. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

CHAROENWONGPAIBOON, T.; WANGPAIBOON, K.; PICHYANGKURA, R.; PROUSOONTORN, M. H. Highly porous core–shell chitosan beads with superb immobilization efficiency for *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase and production of inulin-type fructooligosaccharides. **RSC Advances**, v. 8, n. 30, p. 17008–17016, 2018.

CHEN, H.; LIU, L.; LV, S.; LIU, X.; WANG, M.; SONG, A.; JIA, X. Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on chitosan using dialdehyde starch as a coupling agent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 24–32, 2010.

CHIMPIBUL, W.; NAGASHIMA, T.; HAYASHI, F.; NAKAJIMA, N.; HYON, S.-H.; MATSUMURA, K. Dextran oxidized by a malaprade reaction shows main chain scission through a maillard reaction triggered by schiff base formation between aldehydes and amines. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 2254–2260, 2016.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3427–3436, out. 2001.

COSTA, E. S.; MANSUR, H. S. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)blend chemically crosslinked by glutaraldehyde for tissue engineering application. **Quimica Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460–1466, 2008.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DONGRE, R. S. Marine Polysaccharides in Medicine. **Biological Activities And Application Of Marine Polysaccharides,** [S.L.], p. 1-26, 2017.

DOU, Y.; ZHANG, B.; HE, M.; YIN, G.; CUI, Y.; SAVINA, I. N. Keratin/Polyvinyl alcohol blend films cross-linked by dialdehyde starch and their potential application for drug release. Polymers, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 580-591, 2015.

DUAN, J.; HAN, C.; LIU, L.; JIANG, J.; LI, J.; LI, Y.; GUAN, C. Binding cellulose and chitosan via intermolecular inclusion interaction: synthesis and characterisation of gel. **Journal of Spectroscopy**, v. 2015, p. 179258, 2015.

DUTRA MADALOZZO, A.; SANVIDO MUNIZ, L.; BARON, A. M.; PIOVAN, L.; ALEXANDER MITCHELL, D.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 13–19, 2014.

DWIVEDEE, B. P.; SONI, S.; BHIMPURIA, R.; LAHA, J. K.; BANERJEE, U. C. Tailoring a robust and recyclable nanobiocatalyst by immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on carbon nanofiber and its application in synthesis of enantiopure carboetomidate analogue. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1299–1310, 2019.

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

FERREIRA, I. M.; NISHIMURA, R. H. V.; SOUZA, A. B. D. A.; CLOSOSKI, G. C.; YOSHIOKA, S. A.; PORTO, A. L. M. Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized on silk fibroin-alginate spheres. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 36, p. 5062-5065, 2014.

FIEDOROWICZ, M.; PARA, A. Structural and molecular properties of dialdehyde starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 360–366, 2006.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; VICENTE, G. Use of Lipases in Organic Synthesis. *In*: **Industrial Enzymes**. [s.l.] Springer Netherlands, [s.d.]. p. 301–315, 2006

GUYOT, B.; BOSQUETTE, B.; PINA, M.; GRAILLE, J. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. v. 19, n. 6, p. 529–532, 1997.

HAN, H.; ZHOU, Y.; LI, S.; WANG, Y.; KONG, X. Z. Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on porous polyurea and its application in kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 39, p. 25714–25724, 2016.

HE, Q.; AO, Q.; GONG, Y.; ZHANG, X. Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 12, p. 2791–2802, 2011.

HOSSEINI, S. S.; KHODAIYAN, F.; E. MOUSAVI, S. M.; AZIMI, S. Z.;

GHARAGHANI, M. Immobilization of pectinase on the glass bead using polyaldehyde kefiran as a new safe cross-linker and its effect on the activity and kinetic parameters. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125777, 2020.

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. VAN; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.

JAKOVETIĆ, S. M.; JUGOVIĆ, B. Z.; GVOZDENOVIĆ, M. M.; BEZBRADICA, D. I.; ANTOV, M. G.; MIJIN, D. Ž.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D. Synthesis of aliphatic esters of cinnamic acid as potential lipophilic antioxidants catalyzed by Lipase B from *Candida antarctica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 7, p. 1560–1573, 2013.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KAZAN, D.; ERTAN, H.; ERARSLAN, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 191–197, 1997.

KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2656–2665, 1991.

KIM, J.-H.; BHATIA, S. K.; YOO, D.; SEO, H. M.; YI, D.-H.; KIM, H. J.; LEE, J. H.; CHOI, K.-Y.; KIM, K. J.; LEE, Y. K.; YANG, Y.-H. Lipase-catalyzed production of 6-O-cinnamoyl-sorbitol from D-sorbitol and cinnamic acid esters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 1, p. 244–252, 2015.

KOJIMA, Y.; YOKOE, M.; MASE, T. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 9, p. 1564–1568, 1994.

KULKARNI, V. H.; KULKARNI, P. V; KESHAVAYYA, J. Glutaraldehyde-crosslinked chitosan beads for controlled release of diclofenac sodium. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, n. 1, p. 211–217, 2007.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81–87, 1987.

LÅNGVIK, O.; SALORANTA, T.; KIRILIN, A.; LILJEBLAD, A.; MÄKI-ARVELA, P.; KANERVA, L. T.; MURZIN, D. Y.; LEINO, R. Dynamic Kinetic Resolution of rac-2-Hydroxy-1-indanone by using a Heterogeneous $Ru(OH)_3/Al_2O_3$ Racemization Catalyst and Lipase. **ChemCatChem**, v. 2, n. 12, p. 1615–1621, 2010.

LEANE, M. M.; NANKERVIS, R.; SMITH, A.; ILLUM, L. Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, n. 1–2, p. 241–249, 2004.

LU, H.; WANG, W.; WANG, A. Ethanol–NaOH solidification method to intensify chitosan/poly(vinyl alcohol)/attapulgite composite film. **RSC Advances**, v. 5, n. 23, p. 17775–

17781, 2015.

LUE, B.-M.; KARBOUNE, S.; YEBOAH, F. K.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 462–468, 1 abr. 2005.

LUO, W.; BAI, Z.; ZHU, Y. Fast removal of Co(II) from aqueous solution using porous carboxymethyl chitosan beads and its adsorption mechanism. **RSC Advances**, v. 8, n. 24, p. 13370–13387, 2018.

MADALOZZO, A. D.; MARTINI, V. P.; KUNIYOSHI, K. K.; SOUZA, E. M. DE; PEDROSA, F. O.; GLOGAUER, A.; ZANIN, G. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 45–51, 2015.

MASINA, N.; CHOONARA, Y. E.; KUMAR, P.; TOIT, L. C. DU; GOVENDER, M.; INDERMUN, S.; PILLAY, V. A review of the chemical modification techniques of starch**.** **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 157, p. 1226-1236, 2017.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; LANGEN, L. M. VAN; RANTWIJK, F. VAN; SHELDON, R. A. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 273–276, 2004.

MATSUMURA, K.; NAKAJIMA, N.; SUGAI, H.; HYON, S.-H. Self-degradation of tissue adhesive based on oxidized dextran and poly-l-lysine. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 32–38, 2014.

MELO, R. R. DE; ALNOCH, R. C.; FERREIRA, A.; VILELA, L.; SOUZA, E. M. DE; KRIEGER, N.; RULLER, R.; SATO, H.; MATEO, C. New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation : A tool for enzyme immobilization at neutral pH. Molecules, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 1-18, 2017.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. DE; CASTRO, H. F. DE; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quimica Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 2, p. 119–128, 1999.

MTCC-, B. Synthesis of methyl cinnamate using immobilized lipase from *B. licheniformis*. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. 3, p. 68–71, 2012.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Magnetic macromolecular cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of glucoamylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 83, p. 78–87, 2016.

NOBAKHT, N.; FARAMARZI, M. A.; SHAFIEE, A.; KHOOBI, M.; RAFIEE, E. Polyoxometalate-metal organic framework-lipase: An efficient green catalyst for synthesis of

benzyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 8–19, 2018.

QIU, X.; WANG, Y.; XUE, Y.; LI, W.; HU, Y. Laccase immobilized on magnetic nanoparticles modified by amino-functionalized ionic liquid via dialdehyde starch for phenolic compounds biodegradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 391, p. 123564, 2020.

RAFIEE, F.; REZAIE KARDER, F. Bio-crosslinking of chitosan with oxidized starch, its functionalization with amino acid and magnetization: As a green magnetic support for silver immobilization and its catalytic activity investigation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 1124–1132, 2020.

REN, L.; JIA, H.; YU, M.; SHEN, W.; ZHOU, H.; WEI, P. Enhanced catalytic ability of Candida rugosa lipase immobilized on pore-enlarged hollow silica microspheres and cross-linked by modified dextran in both aqueous and non-aqueous phases. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 5, p. 888–896, 2013.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; SANTOS, J. C. S. DOS; BARROS GONÇALVES, L. R. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99–120, 2018.

ROJAS, M.; AMARAL-FONSECA, M.; ZANIN, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GIORDANO, R.; TARDIOLI, P. Preparation of Crosslinked Enzyme Aggregates of a Thermostable Cyclodextrin Glucosyltransferase from *Thermoanaerobacter sp*. Critical Effect of the Crosslinking Agent. **Catalysts**, v. 9, n. 2, p. 120, 2019.

ROSENAU, F.; JAEGER, K. E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1023–1032, 2000.

SAKR, O. S.; BORCHARD, G. Encapsulation of enzymes in layer-by-layer (lbl) structures: Latest advances and applications. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 7, p. 2117–2135, 2013.

SAUN, N. K.; GUPTA*, S. K. N. AND R. **Effect of Carbon Chain Length of Alcohols on the Syntheses of Cinnamate Esters by Immobilized Lipase from Bacillus aeriusCurrent Biotechnology**, 2017.

SAWANT, G.; GHOSH, S.; BANESH, S.; BHAUMIK, J.; CHAND BANERJEE, U. In silico approach towards lipase mediated chemoenzymatic synthesis of (*S*)-ranolazine, as an anti-anginal drug. **RSC Advances**, v. 6, n. 54, p. 49150–49157, 2016.

SCHACHSCHAL, S.; ADLER, H.-J.; PICH, A.; WETZEL, S.; MATURA, A.; PEE, K.-H. VAN. Encapsulation of enzymes in microgels by polymerization/cross-linking in aqueous droplets. **Colloid and Polymer Science**, v. 289, n. 5, p. 693–698, 2011.

SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. B. T.-M. IN E. [4] Lipases and αβ hydrolase fold. *In*: **Lipases, Part A: Biotechnology**, v. 284, p. 85–107, 1997.

SCHULZ, T.; PLEISS, J.; SCHMID, R. D. Stereoselectivity of Pseudomonas cepacia lipase toward secondary alcohols: A quantitative model . **Protein Science**, v. 9, n. 6, p. 1053–

1062, 2000.

SHARMA, C. K.; CHAUHAN, G. S.; KANWAR, S. S. Synthesis of medically important ethyl cinnamate ester by porcine pancreatic lipase immobilized on poly(AAc-co-HPMA-cl-EGDMA) hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 5, p. 2674–2679, 5 set. 2011.

SHARMA, M.; SINGH, S. P. Chapter 11 - Enzyme entrapment approaches and their applications. **Biomass, Biofuels, Biochemicals**, p. 191-216, 2020.

SHELDON, ROGER A; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SHINDE, S. D.; YADAV, G. D. Microwave irradiated immobilized lipase catalyzed synthesis of alkyl benzoate esters by transesterification: Mechanism and kinetic modeling. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 21, p. 8706–8713, 2014.

SIMÕES, B. M.; GROSSMANN, M. V. E.; BARON, A. M.; ANDRADE, M. M.; CASTRO, M. DA C. DE; FARIAS, T. L. DA S.; ALMEIDA, D. A. DE; GARCIA, P. S. Production of starch-polyester bio-support for lipases immobilization: synergistic action of itaconic acid and nanoclay. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 0, n. 0,

SMITH, L. C.; FAUSTINELLA, F.; CHAN, L. Lipases: three-dimensional structure and mechanism of action. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, n. 4, p. 490–496, 1992.

SOJITRA, U. V.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 677–685, 2017.

SONG, L.; CRUZ, C.; FARRAH, S.; BANEY, R. Novel antiviral activity of dialdehyde starch. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 13–14, 2009.

SONI, S.; DWIVEDEE, B. P.; SHARMA, V. K.; BANERJEE, U. C. Kinetic resolution of (: RS)-1-chloro-3-(4-(2-methoxyethyl)phenoxy)propan-2-ol: a metoprolol intermediate and its validation through homology model of *Pseudomonas fluorescens* lipase. **RSC Advances**, v. 7, n. 58, p. 36566–36574, 2017.

SOWMYA, A.; MEENAKSHI, S. Zr(IV) loaded cross-linked chitosan beads with enhanced surface area for the removal of nitrate and phosphate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 336–343, 2014.

STAMATIS, H.; SERETI, V.; KOLISIS, F. N. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 12, p. 1505–1510, 1999.

TAKIGAWA, T.; ENDO, Y. Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health. **Journal of Occupational Health**, v. 48, n. 2, p. 75–87, 2006.

THAKUR, A.; KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Production of n-propyl cinnamate (Musty Vine Amber Flavor) by Lipase Catalysis in a Non-Aqueous Medium. **Current Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 234-240, 2012.

THAKUR, V. K.; THAKUR, M. K. Recent Advances in Graft Copolymerization and Applications of Chitosan: A Review. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 12, p. 2637–2652, 1 dez. 2014.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBioEng Reviews**, v. 6, n. 5, p. 157–166, 2019.

VAKILI, M.; MOJIRI, A.; ZWAIN, H. M.; YUAN, J.; GIWA, A. S.; WANG, W.; GHOLAMI, F.; GUO, X.; CAGNETTA, G.; YU, G. Effect of beading parameters on cross-linked chitosan adsorptive properties. **Reactive and Functional Polymers**, v. 144, p. 104354, 2019.

VEELAERT, S.; WIT, D. DE; GOTLIEB, K. F.; VERHÉ, R. Chemical and physical transitions of periodate oxidized potato starch in water. **Carbohydrate Polymers**, 1997.

VERMA, M. L.; KUMAR, S.; DAS, A.; RANDHAWA, J. S.; CHAMUNDEESWARI, M. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 2, p. 315–323, 2020.

VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L.; GÓMEZ, L. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 10, n. 5, p. 483–490, 2000.

VIMALA, K.; MOHAN, Y. M.; SIVUDU, K. S.; VARAPRASAD, K.; RAVINDRA, S.; REDDY, N. N.; PADMA, Y.; SREEDHAR, B.; MOHANARAJU, K. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 248–258, 2010.

WAHAB, R. A.; ELIAS, N.; ABDULLAH, F.; GHOSHAL, S. K. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, p. 104613, 2020.

WANG, Y.; ZHANG, D. H.; ZHANG, J. Y.; CHEN, N.; ZHI, G. Y. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Food Chemistry**, v. 190, p. 629–633, 2016.

WU, S.; SNAJDROVA, R.; MOORE, J. C.; BALDENIUS, K.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, p. 88-119, 2021.

YADAV, G. D.; BORKAR, I. V. Kinetic modeling of immobilized lipase catalysis in synthesis of n-butyl levulinate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 10, p. 3358–3363, 2008.

YANG, X.; CHEN, Y.; YAO, S.; QIAN, J.; GUO, H.; CAI, X. Preparation of immobilized lipase on magnetic nanoparticles dialdehyde starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 324–332, 2019.

YUAN, X.; OU, J.; ZHANG, P.; XU, W.; JIANG, B.; TANG, K. PEG-modified lipase immobilized onto NH2-MIL-53 MOF for efficient resolution of 4-fluoromandelic acid enantiomers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1793–1802, 2020.

ZANETTI, M.; CARNIEL, T. K.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, J. V. DE; OLIVEIRA, D. DE; ARAÚJO, P. H. DE; RIELLA, H. G.; FIORI, M. A. Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 115–121, 2017.

ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, 2018.

ZEYNIZADEH, B.; BEHYAR, T. Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with $NaBH_4$/wet SiO_2 under solvent free condition. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 A, p. 1200–1209, 2005.

ZHEN, Q.; WANG, M.; QI, W.; SU, R.; HE, Z. Preparation of β-mannanase CLEAs using macromolecular cross-linkers. **Catalysis Science & Technology**, v. 3, n. 8, p. 1937–1941, 2013.

ZIEGLER-BOROWSKA, M.; WEGRZYNOWSKA-DRZYMALSKA, K.; CHELMINIAK-DUDKIEWICZ, D.; KOWALONEK, J.; KACZMAREK, H. Photochemical reactions in dialdehyde starch. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.

ŽUŽA, M.; MILOSAVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Immobilization of modified penicillin G acylase on Sepabeads carriers. **Chemical Papers**, v. 63, n. 2, p. 117–124, 2009.