

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM FILME DE CASEINATO DE SÓDIO/GLICEROL: APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES

Damianni Sebrão, Vanessa Dutra Silva, Maria da Graça Nascimento* e Marcelo Alves Moreira

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, 88040-900 Florianópolis – SC, Brasil

Recebido em 12/7/06; aceito em 1/12/06; publicado na web em 24/7/07

LIPASE IMMOBILIZATION IN SODIUM CASEINATE/GLYCEROL FILM: APPLICATION IN ESTER SYNTHESIS. Lipases from different sources were immobilized in sodium caseinate/glycerol film and used in the esterification reactions of aliphatic acids with alcohols in the presence of organic solvents. Lipases from *Pseudomonas* sp and *Rhizopus oryzae* were selected and the influence of several parameters was analyzed, including: lipase loading, organic solvent polarity, reaction temperature, chain length of alcohol and acid and enzyme/support reuse. For comparison, free enzymes were used under similar experimental conditions.

Keywords: sodium caseinate/glycerol; lipases; immobilization.

INTRODUÇÃO

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações, destacando-se o uso na indústria químico-farmacêutica. Estas proteínas são catalisadores versáteis, existindo em geral um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica¹⁻³.

A partir da década 80 tem sido observado um interesse crescente no desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas e/ou microrganismos, visando minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, tais como solventes orgânicos, variações no pH e/ou altas temperaturas^{1,4}. A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um período razoável de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e a exatidão do processo^{4,6}.

Um dos fatores que sempre deve ser considerado na utilização de um determinado sistema de imobilização é o tipo de interação entre o suporte e o biocatalisador, que pode influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise^{1,4,9}. Os processos de imobilização podem ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas^{10,11}, por confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos^{12,13}, por encapsulação em membranas poliméricas^{12,14} e em micelas reversas^{15,16}.

Outra técnica também utilizada, apesar de não manter uma barreira física entre a enzima e o meio reacional, é o sistema bi ou trifásico. Pesquisas recentes têm demonstrado a utilização de novos materiais para imobilização de enzimas, destacando-se os líquidos iônicos com formação de sistemas trifásicos¹⁷⁻²¹, as nanopartículas de sílica funcionalizada e nanocompósitos de sílica-ouro²²⁻²⁴.

Dois das técnicas de imobilização mais utilizadas são, provavelmente, as de inclusão ou microencapsulação através do confinamento dos biocatalisadores em polímeros insolúveis (formando filmes), ou em microcápsulas. Uma das principais vantagens da utilização destas técnicas é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando a desnaturação da mesma^{4,6,12}.

Diversos polímeros sintéticos e naturais têm sido utilizados, destacando-se o poli(óxido de etileno)²⁵, poli(álcool vinílico)^{13,26}, carboximetilcelulose^{12,13}, alginato de sódio²⁷ e quitosana²⁸.

A utilização de filmes produzidos a partir de proteínas ou polissacarídeos tem contribuído para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalisador, criando um microambiente favorável e mantendo, desta forma, a atividade enzimática¹². Dentre as vantagens de se utilizar estes biofilmes em síntese orgânica, destacam-se suas boas propriedades mecânicas, resistência a solventes de baixa polaridade, hidrofobicidade, atoxicidade e o fato de serem biodegradáveis e de baixo custo²⁹.

Os filmes de polissacarídeos podem ser obtidos a partir de derivados hidrossolúveis de celulose, amido, pectina, alginatos, carragena, dextrinas e outras gomas. Os filmes protéicos podem ser produzidos a partir de proteínas miofibrilares de peixe ou carne ou do glúten de trigo, zeína do milho, proteína de soja, colágeno, ovalbumina, proteínas do soro do leite, caseína e caseinatos³⁰⁻³³.

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no que se refere aos estudos das propriedades do gel ou filme de caseinato de sódio (CS) e, em especial, com aplicação em alimentos³⁴⁻³⁶. Este biopolímero é um sal de sódio derivado da caseína, principal proteína existente no leite de vaca, que precipita a pH 4,6 a 20 °C³⁷.

Neste trabalho foi empregado o filme de caseinato de sódio (CS) com glicerol (G), como suporte para imobilização de lipases. Foram avaliados diversos parâmetros em reações de esterificação de ácidos e álcoois alifáticos com as lipases livres ou imobilizadas no filme de CS/G. Estes incluíram o uso de lipases de diversas procedências e atividades, solvente orgânico, massa de lipase, imobilização simultânea de duas lipases, temperatura, influência da cadeia alquílica do ácido e álcool, reuso e tempo de estocagem.

PARTE EXPERIMENTAL

Lipases, reagentes e solventes

Como biocatalisadores, foram utilizadas as lipases de *Pseudomonas* sp. (LPS – 30.000 u/g), *Rhizopus oryzae* (LRO – 150.000 u/g), *Mucor javanicus* (LMJ – 10.000 u/g), *Aspergillus niger* (LAN – 120.000 u/g) e de *Candida rugosa* (LCR – 30.000 u/g) da Amano Enzyme Inc. e as de *Thermomices lanuginosus* (LTL – 100.000 u/g) e *Mucor miehei* (LMM – 5-6BAUN/g) da

*e-mail: graca@qmc.ufsc.br

Novozymes A/S. Os solventes *n*-hexano, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, acetona, etanol, acetonitrila, cicloexano e 1,4 dioxano foram adquiridos da Grupo Química; o éter metil-*t*-butílico (MTBE) da Tedia Company, Inc.; e o tolueno da F. Maia Ind. e Com. Ltda. Os álcoois *n*-hexanol, *n*-decanol, *n*-octanol e os ácidos esteárico, palmítico e hexanóico foram obtidos da Sigma Chemical CO; os ácidos cáprico, octanóico da Aldrich Chemicals CO; o *n*-pentanol e *n*-dodecanol da Vetec Química Fina Ind. e Com. Ltda.; o *n*-propanol da Nuclear-Casa da Química Ltda; o *n*-octanol da General Purpose Reagent; o ciclo-hexanol da Riedel-Haën AG, e o glicerol foi obtido da Reagen – Quimibrás Indústria Química S.A.. O caseinato de sódio foi fornecido pela Tatuá CO-OP Dairy Ltda. Todos os solventes e reagentes foram adquiridos com grau de pureza analítica (PA).

Imobilização das lipases no filme de caseinato de sódio/glicerol (CS/G)

O filme de caseinato de sódio (CS/G) foi preparado pesando-se 1,5 g do sal de caseinato comercial e 0,5 g de glicerol, em um béquer de 50 mL. Adicionaram 15 mL de água destilada e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 2 h. A seguir, adicionaram-se quantidades variadas de lipases (0-100 mg). O sistema foi agitado por mais 10 min. A mistura foi transferida para uma placa de Petri e o solvente evaporado a temperatura ambiente por 24 h, obtendo-se o filme com a enzima imobilizada. Este foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 mm e utilizado nas reações de esterificação.

Reação de esterificação

Lipases de diferentes fontes imobilizadas em filme de CS/G foram transferidas para um erlenmeyer contendo quantidades equimolares do ácido e álcool (5 mmol). As reações de esterificação foram realizadas nas temperaturas de 25 a 50 °C, por 24 h, sob agitação constante em banho tipo Dubnoff. Nos experimentos de reutilização, após 24 h de reação, a mistura reacional foi decantada e o sistema enzima/filme lavado com 25 mL de *n*-hexano por várias vezes, até que todos os reagentes e produtos fossem retirados do filme. Para os estudos de estocagem, os filmes foram mantidos a -18 °C por 4, 46, 77 e 144 dias. Após este tempo de estocagem e estabilização à temperatura ambiente, quantidades equimolares dos substratos (5 mmol) foram novamente adicionadas e os sistemas colocados em banho termostatizado por mais 24 h, sob agitação.

Determinação das conversões em éster

A formação dos produtos foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) durante o decorrer da reação, utilizando-se como fase estacionária sílica gel (60HF 254 da Merck) e como eluente uma mistura *n*-hexano/acetato de etila (9:1v/v). Após 24 h de reação, foram retiradas alíquotas e o grau de conversão em produto obtido foi avaliado por análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H), por comparação da área dos picos referentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono da hidroxila do álcool (centrado em 3,5 ppm) com a dos hidrogênios metilênicos do carbono ligado ao oxigênio da carbonila do éster (centrado em 4,1 ppm para os ésteres alifáticos). Os espectros de RMN-¹H foram obtidos em um espectrômetro Bruker AC 200 MHz, com tetrametilsilano (TMS) como referência interna e clorofórmio deuterado (CDCl₃, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) como solvente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das lipases

Lipases de diferentes fontes e procedências foram imobilizadas em filme de caseinato de sódio/glicerol (CS/G) e estes sistemas utilizados como catalisadores na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol, em *n*-hexano (Tabela 1). Este solvente foi selecionado para os estudos iniciais por ter apresentado bons resultados em várias outras reações biocatalisadas por lipases^{18,20,38}.

Tabela 1. Conversão em oleato de *n*-pentila catalisada por lipases de diferentes procedências, na forma livre e imobilizada, em filme de caseinato de sódio/glicerol

| Entrada | Fonte da lipase | Sigla | Conversão ^a (%) | |
|---------|-------------------------------|-------|----------------------------|-------------------|
| | | | Livre | Lipase/CS/G |
| 1 | <i>Pseudomonas</i> sp. | LPS | 63 | 66 |
| 2 | <i>Termomyces lanuginosus</i> | LTL | 38 | 45 |
| 3 | <i>Rhizopus oryzae</i> | LRO | 13 | 41 |
| 4 | <i>Mucor miehei</i> | LMM | 40 | 13 |
| 5 | <i>Mucor javanicus</i> | LMJ | 41 | 11 |
| 6 | <i>Candida rugosa</i> | LCR | 43 | n.d. ^b |
| 7 | <i>Aspergillus niger</i> | LAN | n.d. | n.d. |

(a) determinada por RMN-¹H; condições: solvente *n*-hexano (25 mL), ácido oleico (5 mmol), *n*-pentanol (5 mmol), lipase (100 mg), 35 °C, 24 h; (b) n.d. não detectado.

As conversões em oleato de *n*-pentila foram dependentes da procedência das lipases e da forma utilizada na reação (livre ou imobilizada em filme de CS/G). Os valores mais elevados de conversão foram obtidos com a lipase de *Pseudomonas* sp. tanto na forma livre como imobilizada, da ordem de 63 e 66%, respectivamente.

Usando as lipases de *T. lanuginosus* e *R. oryzae* imobilizadas, as conversões obtidas, de 45 e 41%, foram superiores àquelas apresentadas pelas lipases na forma livre, sendo da ordem de 38 e 13%, respectivamente.

Conversões satisfatórias foram também obtidas com a utilização das lipases de *M. miehei*, *M. javanicus* e *C. rugosa* na forma livre, atingindo respectivamente 40, 41 e 43%, valores esses superiores aos obtidos com estas lipases imobilizadas. A redução nos valores de conversão pode estar relacionada com interações desfavoráveis entre os resíduos laterais de aminoácidos destas lipases com o filme de CS/G, alterando a estrutura tridimensional, ou ainda devido à dificuldade de acesso dos substratos ao sítio catalítico das mesmas.

Quando a lipase de *A. niger* foi usada como biocatalisador na forma livre ou imobilizada, não houve formação do produto. Resultados análogos foram observados por Dalla-Vechia *et al.*¹³ na esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol, catalisada por lipases de diferentes fontes imobilizadas em filmes de carboximetilcelulose (CMC) e poli(álcool vinílico) (PVA). As conversões em laurato de *n*-pentila variaram dependendo da fonte da lipase e do suporte utilizado¹³.

Os dados obtidos neste trabalho também mostraram que a utilização de lipases de procedências diversas pode conduzir a resultados diferentes. Portanto, a partir dos melhores resultados obtidos nestes experimentos preliminares, as lipases de *Pseudomonas* sp., *T. lanuginosus* e *R. oryzae* foram selecionadas para estudos posteriores.

Efeito do solvente

Inicialmente, avaliou-se a estabilidade macroscópica do filme de CS/G em *n*-heptano, *n*-hexano, cicloexano, tolueno, diclorometano, *t*-butanol, MTBE, éter etílico, acetona e acetonitrila, por 24 h a tem-

peratura ambiente. Após este período, não foram observadas mudanças macroscópicas na maleabilidade e resistência destes filmes.

Para avaliar a influência do solvente orgânico, a lipase de *Pseudomonas* sp. foi imobilizada em filme de CS/G e este sistema foi usado como biocatalisador na esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol e *n*-propanol em solventes orgânicos de diferentes polaridades ($4,00 < \log P > -0,33$). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeito do solvente orgânico na conversão em oleatos de *n*-pentila e *n*-propila catalisada pelos sistemas LPS/CS/G

| Solvente ^a | log P ^b | Conversão ^c (%) | |
|-----------------------|--------------------|----------------------------|-------------------|
| | | (d) | (e) |
| Heptano | 4,00 | 58 | 53 |
| Hexano | 3,50 | 24 | 55 |
| Cicloexano | 3,20 | 31 | 60 |
| Tolueno | 2,50 | 39 | n.d. ^f |
| Diclorometano | 1,50 | 6 | n.d. |
| <i>t</i> -Butanol | 1,45 | 8 | 10 |
| MTBE | 1,43 | 8 | 35 |
| Éter etílico | 0,83 | n.d. | n.d. |
| Acetona | -0,23 | 8 | n.d. |
| Acetonitrila | -0,33 | 17 | 35 |

(a) 20,0 mL; (b) logaritmo do coeficiente de partição octanol/água; (c) determinada por RMN-¹H; condições: 35 °C, 24 h; (d) ácido oleico (5 mmol), *n*-pentanol (5 mmol), LPS (10 mg)/CS/G; (e) ácido oleico (5 mmol), *n*-propanol (5 mmol), LPS (50 mg)/CS/G; (f) n.d. não detectado.

O log P, definido como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água³⁹, é o parâmetro mais frequentemente utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas. Segundo Laane *et al.*³⁹ os solventes que possuem $\log P \leq 2$ são hidrofílicos, não sendo adequados para biocatálise porque alteram fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando a desnaturação. Os solventes com log P entre 2 e 4 são também hidrofílicos, mas perturbam menos a interação água/biocatalisador. Os solventes com log P acima de 4 são hidrofóbicos, não alteram estas interações e deixam o biocatalisador no seu estado ativo.

Os resultados obtidos neste trabalho, em geral, corroboram com os de Laane *et al.*³⁹ mostrando que a conversão a produto foi dependente do solvente orgânico e, também, da massa de lipase. Os solventes com log P acima de 2,50, ou seja, os menos polares, foram os mais eficientes na catálise enzimática, formando os oleatos de *n*-pentila e de *n*-propila com conversões entre 24-58% e 53-60%, respectivamente. Usando solventes com log P menores que 2,50, ou seja os mais polares, os produtos foram obtidos em menores conversões (0-17% para o oleato de *n*-pentila e 0-35% para o oleato de *n*-propila). A baixa conversão em éster nos solventes mais polares deve-se provavelmente ao fato destes retirarem a camada de água essencial ao redor da enzima, causando distorção na conformação nativa e, portanto, alterando a atividade catalítica do biocatalisador^{1,6,13,39}.

Deve-se salientar que com a acetonitrila, apesar de ser o solvente mais polar (log P -0,33), as conversões em oleatos de *n*-pentila e *n*-propila, 17 e 35% respectivamente, foram maiores que com os outros solventes polares, tais como acetona ou éter etílico (<10%). Este resultado é interessante, considerando-se que muitos substratos são insolúveis em solventes pouco polares, podendo assim a acetonitrila também ser utilizada em reações biocatalisadas.

Efeito da massa de lipase

O efeito da quantidade de biocatalisador no percentual de conversão em oleato de *n*-pentila foi estudado variando-se de 0-100 mg a massa das lipases de *Pseudomonas* sp. (LPS) e *R. oryzae* (LRO) imobilizadas em filme de CS/G. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 1.

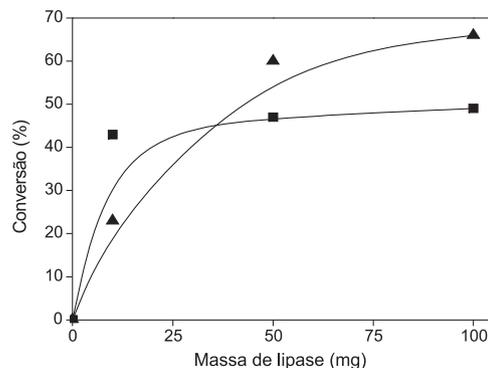


Figura 1. Efeito da variação de massa de LPS (▲) e LRO (■) imobilizadas em filme de CS/G na porcentagem de conversão enzimática em oleato de *n*-pentila. [Ácido oleico (5 mmol), *n*-pentanol (5 mmol), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 24 h]

Este estudo mostrou que a lipase de *Pseudomonas* sp. foi mais efetiva que a *R. oryzae*. A análise dos dados mostrou que em 24 h de reação ocorreu um aumento da conversão com o aumento da massa de LPS e LRO utilizada. Com a LPS, a partir de 50 mg a conversão foi constante, mantendo-se próxima a 60%, indicando que o número de sítios disponíveis é suficiente para a quantidade de substrato utilizado. Com a LRO, independente da massa de lipase, as conversões foram menores e variaram de 43 a 49%. Utilizando-se LPS e LRO não imobilizadas, as conversões em éster foram menores. Com 50 mg de LPS a conversão foi de 33% e não houve formação de produto com a LRO, nas mesmas condições. Estes resultados salientam os efeitos positivos da imobilização e conforme será discutido posteriormente estes sistemas podem ser estocados e reutilizados, sendo esta mais uma vantagem do método.

A partir destes dados, nos estudos subsequentes foram utilizados preferencialmente 50 mg de enzima, o que corresponde a aproximadamente 2% em massa nos suportes.

As lipases de *Pseudomonas* sp. e de *R. oryzae* foram imobilizadas simultaneamente em quantidades variáveis em filme de CS/G, para avaliar se havia ou não um efeito aditivo, e estes sistemas foram usados como catalisadores na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol. Cada sistema foi preparado mantendo-se constante a massa total, em diferentes proporções das duas lipases. Quando dois ou mais biocatalisadores são usados simultaneamente na forma livre ou imobilizados no mesmo suporte, emprega-se o termo "coquetel enzimático"^{40,41}. Os resultados de conversão em éster estão apresentados na Tabela 3.

As conversões em éster foram de 47-60% e pode-se observar que com a imobilização simultânea destas lipases não houve variação marcante na formação do produto. Contudo, ao utilizar 50% de cada lipase, a conversão foi de 52%, sendo um pouco superior à obtida com apenas 25 mg de LPS que é da ordem de 45% (valor obtido da Figura 1), mostrando uma pequena contribuição da lipase de *R. oryzae*.

Embora estes dados não sejam muito satisfatórios, não é excludente que a imobilização simultânea de lipases de outras procedências e em diferentes suportes possam conduzir a resultados mais relevantes.

Tabela 3. Efeito da imobilização simultânea de duas lipases na conversão em oleato de *n*-pentila

| Massa da Lipase (mg) | | Conversão ^a (%) |
|----------------------|-----|----------------------------|
| LRO | LPS | |
| 0 | 50 | 60 |
| 10 | 40 | 53 |
| 20 | 30 | 55 |
| 25 | 25 | 52 |
| 30 | 20 | 49 |
| 40 | 10 | 49 |
| 50 | 0 | 47 |

(a) determinada por RMN-¹H; condições: solvente *n*-hexano (25 mL), ácido oleico (5 mmol), *n*-pentanol (5 mmol), 35 °C, 24 h.

Influência da temperatura

Investigou-se o efeito da temperatura na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol catalisada pelas lipases de *Pseudomonas* sp., *T. lanuginosus* e *R. oryzae* imobilizadas em filme de CS/G e pela LPS livre, a 25, 30, 35, 40 e 50 °C (Figura 2).

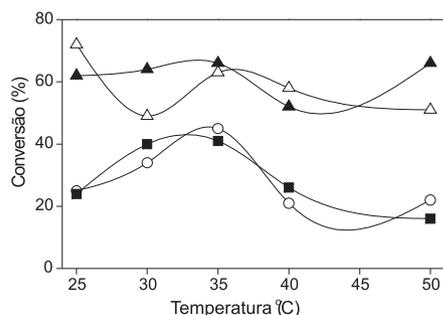


Figura 2. Influência da temperatura na conversão em oleato de *n*-pentila catalisada por LPS livre (Δ), LPS/CS/G (▲), LTL/CS/G (○) e LRO/CS/G (■). [ácido oleico (5 mmol), *n*-pentanol (5 mmol), *n*-hexano (25 mL), lipases (50 mg), 24 h]

As maiores conversões em éster foram obtidas quando a lipase de *Pseudomonas* sp. foi utilizada, não sendo observadas diferenças marcantes ao utilizá-la nas formas livre ou imobilizada. Os valores variaram de 52 a 72%, na faixa de temperatura estudada. Utilizando as outras lipases imobilizadas, as conversões variaram de 16-41% e de 21-45% com os sistemas LRO/CS/G e LTL/CS/G, respectivamente. Com os sistemas LPS/CS/G, LTL/CS/G e LRO/CS/G, as maiores conversões foram obtidas entre 30 e 35 °C, sendo de 66, 45 e 41%, respectivamente. Com a LPS na forma livre, a maior conversão foi obtida a 25 °C, sendo de 72%. Estes resultados são também concordantes com os valores citados para as temperaturas ótimas destas lipases^{41,42}.

Embora boas conversões tenham sido obtidas acima de 40 °C com a lipase de *Pseudomonas* sp. na forma livre e com o sistema LPS/CS/G, não é recomendada sua utilização nestas condições, pois pode ocorrer desnaturação da lipase, além da evaporação do solvente orgânico. Com esta lipase foi também observado um pequeno aumento na conversão a éster após a imobilização, mostrando o efeito de proteção do biocatalisador neste suporte.

Influência do comprimento das cadeias alquílicas do ácido e álcool

Neste estudo foi avaliado o efeito do comprimento das cadeias alquílicas de ácidos e álcoois nas reações de esterificação catalisadas

pela lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada no filme de CS/G.

Primeiramente, realizou-se a reação do ácido oleico com os álcoois alquílicos de cadeia normal, tais como *n*-propanol (C3), *n*-pentanol (C5), *n*-hexanol (C6), *n*-octanol (C8), *n*-decanol (C10), *n*-dodecanol (C12) e *n*-octadecanol (C18). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.

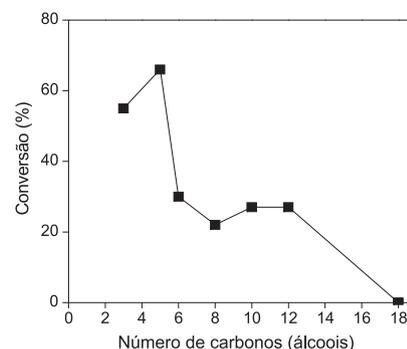


Figura 3. Efeito do comprimento da cadeia do álcool na porcentagem de conversão enzimática em oleatos de *n*-alquila. [ácido oleico (5 mmol), álcool (5 mmol), LPS (50 mg)/1,5 g filme CS/G, *n*-hexano (25 mL), 30 °C, 24 h]

Observou-se que os melhores resultados foram obtidos nas reações nas quais foram utilizados os álcoois de cadeias alquílicas contendo três e cinco carbonos, obtendo-se os produtos com conversões de 55 e 72%, respectivamente. Ao utilizar o *n*-hexanol, *n*-octanol, *n*-decanol e *n*-dodecanol, as conversões em éster foram de 30, 23, 25 e 25%, respectivamente. Na reação do ácido oleico com *n*-octadecanol não foi detectada formação do produto. Estes resultados podem estar associados a efeitos estéreos devido ao aumento da cadeia alquílica e à dificuldade de acesso destes álcoois ao sítio ativo da enzima⁴⁴⁻⁴⁶.

Posteriormente, foram estudadas as reações de esterificação de ácidos de cadeias alquílicas com tamanhos variados. Foram usados os ácidos metanóico (C1), butanóico (C4), hexanóico (C6), octanóico (C8), cáprico (C10), láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16) e esteárico (C18) com o *n*-pentanol, e a reação foi catalisada pela LPS imobilizada em filme de CS/G. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

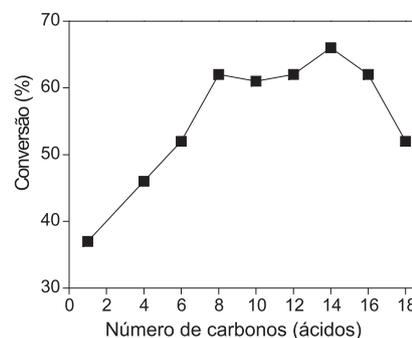


Figura 4. Efeito do comprimento da cadeia alquílica na porcentagem de conversão enzimática na reação de esterificação de ácidos graxos com *n*-pentanol. [ácido carboxílico (5 mmol), *n*-pentanol (5 mmol), 50 mg LPS/1,5 g filme CS/G, 25 mL *n*-hexano, 30 °C, 24 h]

Os resultados mostraram uma influência moderada da cadeia alquílica dos ácidos insaturados na conversão aos correspondentes ésteres. As conversões aumentaram com o aumento da cadeia dos ácidos, sendo que o maior valor (66%) foi obtido na reação de esterificação do ácido mirístico (C14). Este resultado pode ser explicado considerando-se que os ácidos de cadeia alquílica menor tendem a inibir a atividade catalítica das lipases através da reação

com o resíduo da serina no sítio ativo, formando os produtos em menores conversões⁴⁶. Deve-se também considerar que estes ácidos podem interagir com a micro-camada aquosa das lipases, causando diminuição ou perda da atividade^{13,46}.

Na reação dos ácidos palmítico (C16) e esteárico (C18) com *n*-pentanol, as conversões foram um pouco menores que a obtida para o ácido mirístico (66%), sendo de 62 e 52%, respectivamente. Deve-se considerar a influência dos efeitos estéreos causados pelo aumento da cadeia alquílica, dificultando a formação do complexo acil-enzima, que é a primeira etapa do mecanismo proposto para as reações catalisadas por lipases⁴⁷.

Reutilização e estocagem do sistema LPS/CS/G

A reutilização e a estocagem de catalisadores imobilizados são parâmetros importantes e que, em geral, determinam a viabilidade econômica de processos biocatalisados^{11-13,48}.

Para avaliar este parâmetro, o sistema LPS/CS/G foi utilizado na reação de esterificação do ácido oleico com diversos álcoois de cadeia alquílica normal e ciclíca, por vários ciclos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.

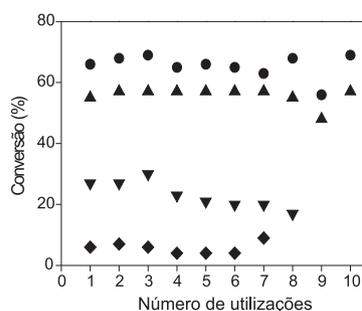


Figura 5. Reutilização do sistema LPS/CS/G em reações de esterificação do ácido oleico com *n*-propanol (▲), *n*-pentanol (●), *n*-hexanol (▼) e ciclo-hexanol (◆). [ácido oleico (5 mmol), álcool (5 mmol), LPS (50 mg)/1,5 g filme CS/G, *n*-hexano (25 mL); 30 °C, 24 h]

Os resultados mostraram que o sistema LPS/CS/G pode ser reutilizado pelo menos por oito vezes consecutivas, considerando que os valores mantiveram-se praticamente constantes, sendo de 56-69, 48-57, 17-27 e 4-9% para os oleatos de *n*-propila, *n*-pentila, *n*-hexanoíla e ciclo-hexanoíla, respectivamente.

A porcentagem de conversão nas bateladas consecutivas foi também dependente da estrutura do álcool. Na reação do ácido oleico com ciclo-hexanol, os valores de conversão em éster foram baixos (~7%) quando comparados com os de cadeia alquílica normal. Resultados similares foram observados por Dalla-Vecchia⁴², Pereira⁴³ e Langrand⁴⁴ que mostram a importância de efeitos estéreos em reações biocatalisadas.

Um outro parâmetro avaliado foi a influência do tempo de estocagem sob baixa temperatura na manutenção das propriedades catalíticas do filme de CS/G com as lipases de *Pseudomonas* sp. e de *R. oryzae* imobilizadas. Os suportes foram armazenados em freezer a -18 °C durante 144 dias, sendo periodicamente retirados e utilizados para catalisar a reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol a 35 °C. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Ao utilizar o sistema LPS/CS/G, os valores de conversão em éster permaneceram praticamente constantes (46-49%) após 144 dias de estocagem, evidenciando a estabilidade do biocatalisador neste filme mesmo após de ter sido submetido à baixa temperatura por um tempo relativamente longo. Ao utilizar o sistema LRO/CS/G, houve uma pequena diminuição (15%) nos valores após o armazenamento. Após 4 dias, a conversão foi de 45% e após 77

Tabela 4. Influência do tempo de estocagem na conversão em oleato de *n*-pentila catalisada pelos sistemas LPS/CS/G e LRO/CS/G

| Tempo (dias) ^a | Conversão ^b (%) | |
|---------------------------|----------------------------|----------|
| | LPS/CS/G | LRO/CS/G |
| 4 | 48 | 45 |
| 46 | 48 | 47 |
| 77 | 49 | 29 |
| 144 | 46 | 30 |

(a) Estocagem a -18 °C; (b) determinada por RMN-¹H; condições: solvente *n*-hexano (25 mL), ácido oleico (5 mmol), *n*-pentanol (5 mmol), lipases (50 mg), 35 °C, 24 h.

dias diminuiu para 29%, permanecendo constante após 144 dias. Estes resultados são importantes e mostraram os efeitos positivos da imobilização. Após o armazenamento do filme, as lipases permaneceram ativas e não foram observadas alterações nas propriedades macroscópicas do mesmo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o biofilme de CS/G é um material eficiente e promissor para imobilização de enzimas. Lipases de diferentes fontes e procedências foram imobilizadas neste suporte e os sistemas foram utilizados para catalisar reações de esterificação em diversos solventes orgânicos. Os resultados mostraram que o carregamento de 50 mg/1,5 g de filme de CS é suficiente para obter os produtos com boas conversões (~60%). As maiores conversões em éster foram obtidas quando a LPS foi utilizada na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol (63-66%). O filme apresentou elevada estabilidade com relação as suas propriedades macroscópicas nos solventes orgânicos, sendo que com os apolares obtiveram-se as maiores conversões (30-60%). A conversão em oleato de *n*-pentila foi influenciada pela temperatura e os melhores resultados foram obtidos a 25 e 35 °C.

As reações foram dependentes do tamanho da cadeia alquílica do álcool e do ácido. Ácidos contendo mais de cinco carbonos e álcoois contendo menos de cinco carbonos na cadeia alquílica foram considerados os melhores reagentes, formando os ésteres em maiores conversões (>50%). O sistema LPS/CS/G pôde ser reutilizado até 8 vezes, ou armazenado por 144 dias a -18 °C, sem perda da atividade catalítica e das propriedades macroscópicas.

Finalmente, salienta-se que o caseinato de sódio mostrou ser um bom suporte para imobilização de lipases com posteriores aplicações em síntese orgânica.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Química da UFSC, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro, à Amano Enzyme Inc. e à Novozymes A/S pela doação das lipases, e aos Profs. Drs. P. L. M. Barreto e V. Soldi pela doação do caseinato de sódio.

REFERÊNCIAS

- Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag: Berlin, 1997, cap. 1.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth Publishers: New York, 2000.
- Roberts, S. M.; *Biocatalysis for Fine Chemical Synthesis*, John Wiley & Sons, Ltda: England, 1999.
- Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Hoss, M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *9*, 113.
- Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M.; *Engenharia Enzimática*, LIDEL-Edições Técnicas Ltda: Lisboa, 2003.

6. Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 623.
7. <http://www.icp.csic.es/biocatalisis/web3/eng/lineas.html>, acessada em Julho 2006.
8. <http://www.rohmhaas.com/ionexchange/Pharmaceuticals/enzymes.htm>, acessada em Julho 2006.
9. Petkar, M.; Lali, A.; Caimi, P.; Daminati, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 83.
10. Oliveira, I. R. W. Z.; Vieira, I. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *38*, 449.
11. Ye, P.; Xu, Z. -K.; Wu, J.; Innocent, C.; Seta, P.; *Biomaterials* **2006**, *27*, 4169.
12. Lopez, F.; Venditti, F.; Cinelli, G.; Ceglie, A.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 114.
13. Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2677.
14. Ye, P.; Xu, Z. K.; Che, A. F.; Wu, J.; Seta, P.; *Biomaterials* **2005**, *26*, 6394.
15. Baron, A. M.; Sarquis, M. I. M.; Baigori, M.; Michell, D. A.; Krieger, N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *34*, 25.
16. Fernandes, M. L.; Krieger, N.; Baron, A. M.; Zamora, P. P.; Ramos, L. P.; Michell, D. A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *30*, 43.
17. Chiappe, C.; Leandri, E.; Lucchesi, S.; Pieracino, D.; Hammock, B. D.; Morisseau, C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *27*, 243.
18. Yuan, Y.; Bai, S.; Sun, Y.; *Food Chem.* **2006**, *97*, 324.
19. Souza, R. F.; Padilha, J. C.; Gonçalves, R. S.; Dupont, J.; *J. Electrochem. Comm.* **2003**, *5*, 728.
20. Pilissão, C.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 428.
21. Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 565.
22. Kim, M. I.; Ham, H. O.; Oh, S. D.; Park, H. G.; H. G., Chang, H. N.; Choi, S. H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 62.
23. Drechsler, U.; Fischer, N. O.; Frankamp, B. L.; Rotello, V. M.; *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 271.
24. Huang, S. H.; Liao, M. H.; Chen, D. H.; *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1095.
25. Crespo, J. S.; Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 401.
26. Yildiz, H. B.; Kiralp, S.; Toppare, L.; Yagci, Y.; *React. Funct. Polym.* **2005**, *63*, 155.
27. Morana, A.; Mangione, A.; Maurelli, L.; Fiume, I.; Paris, O.; Cannio, R.; Rossi, M.; *Enzym. Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1205.
28. Altun, G. D.; Cetinus, S. A.; *Food Chem.* **2007**, *100*, 964.
29. Barreto, P. L. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2003.
30. Dave, R.; Madamwar, D.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 951.
31. Sangeetha, K.; Abraham, T. E.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *38*, 171.
32. Hilal, N.; Kochkodan, V.; Nigmatullin, R.; Goncharuk, V.; Al-Khatib, L.; *J. Membr. Sci.* **2006**, *268*, 198.
33. Konsoula, Z.; Liaskopoulou-Kyriakides, M.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 343.
34. Barreto, P. L. M.; Pires, A. T. N.; Soldi, V.; *Polym. Degrad. Stab.* **2003**, *79*, 147.
35. Barreto, P. L. M.; Roeder, J.; Crespo, J. S.; Maciel, G.; Terenzi, H.; Pires, A. T. N.; Soldi, V.; *Food Chem.* **2003**, *82*, 425.
36. Jang, W.; Nikolov, A.; Wasan, D. T.; Chen, K.; Campbell, B.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 4855.
37. Coultate, T. P.; *Food - The Chemistry of its Components*, 4th ed., The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1988.
38. Vidinha, P.; Augusto, V.; Almeida, M.; Fonseca, I.; Fidalgo, A.; Ilharco, L.; Cabral, J. M. S.; Barreiros, S.; *J. Biotechnol.* **2006**, *121*, 23.
39. Laane, C.; Boeren, S.; Veger, C.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81.
40. Braun P.; Sutherland, J. P.; *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95*, 169
41. Abbas, H.; Comeau, L.; *Enzym. Microb. Technol.* **2003**, *32*, 58.
42. <http://www.novozymes.com>, acessada em Outubro 2006.
43. <http://www.amano.com>, acessada em Outubro 2006.
44. Dalla-Vecchia, R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2004.
45. Pereira, E. B.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *98-100*, 977.
46. Langrand, G.; Rondot, N.; Triantaphylides, C.; Baratti, J.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 581.
47. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D.; *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 67.
48. Ye, P.; Xu, Z. -K.; Wu, J.; Innocent, C.; Seta, P.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 30.