

UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU - FURB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO ACADÊMICO EM QUÍMICA

SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DE CARBOIDRATOS
COM PROPRIEDADES SURFACTANTES UTILIZANDO
LIPASES IMOBILIZADAS EM SUPORTE SÓLIDO

IVETE COMUNELLO DE CARLI

BLUMENAU
2006

IVETE COMUNELLO DE CARLI

**SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DE CARBOIDRATOS
COM PROPRIEDADES SURFACTANTES UTILIZANDO
LIPASES IMOBILIZADAS EM SUPORTE SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Naturais, da Universidade Regional de Blumenau – FURB, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre Acadêmico em Química.

Prof. Renato Wendhausen Jr., Dr - Orientador
Prof. Paulo César de Jesus, Dr - Co-orientador

**BLUMENAU
2006**

IVETE COMUNELLO DE CARLI

**SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DE CARBOIDRATOS
COM PROPRIEDADES SURFACTANTES UTILIZANDO
LIPASES IMOBILIZADAS EM SUPORTE SÓLIDO**

Esta Dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do grau de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Regional de Blumenau.

Blumenau, 07 de abril de 2006.

Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo
Coordenador do PPGQ – FURB

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Wendhausen Jr -FURB
Orientador

Prof. Dr. Paulo César De Jesus - FURB
Co- orientador

Prof. Dr. Jair Juarez João - UNISUL
Examinador

Prof^a. Dra. Iêda Maria Begnini – FURB
Examinadora

Dedico este trabalho a minha
família, que esteve ao meu lado
por toda esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A FURB e a Central de Análise do Departamento de Química da UFSC, em especial a Professora Dra. Maria da Graça Nascimento, pela realização de análises espectroscópicas.

Ao Prof. Dr. Renato Wendhausen Júnior, pela oportunidade, compreensão, apoio e orientação.

Ao Professor Dr. Paulo César de Jesus, por ter dado a oportunidade e incentivo em todas as etapas para a realização deste trabalho.

Aos meus filhos, Ricardo, Fernanda Camila e Eduardo Matheus, minhas inspirações.

Ao meu grande companheiro e incentivador, meu esposo Pedro.

Aos meus pais pelo amor e exemplo de vida.

E, finalmente, a todos de maneira geral que contribuíram para que este trabalho se realizasse.

“Aprender para nós é construir, reconstruir,
constatar para mudar, o que não se faz sem
abertura ao risco e à aventura do espírito”.

Paulo Freire

RESUMO

Os ésteres de carboidratos constituem uma das principais classes de surfactantes naturais. Esses compostos, denominados de biossurfactantes, apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos como: são facilmente degradáveis no solo e na água, podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis como os carboidratos e ácidos graxos e sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Entretanto, ainda não são amplamente produzidos em nível industrial devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto. Os ésteres de carboidratos podem ser sintetizados via química ou enzimática. Porém, a produção de ésteres via química requer altas temperaturas e leva a uma baixa seletividade, formando pigmentos coloridos com produtos secundários. Este trabalho teve como objetivo estudar a obtenção de ésteres derivados de carboidratos a partir de diferentes substratos e enzimas. Na parte experimental, as reações foram realizadas com diferentes carboidratos, como sacarose, lactose, glicose, frutose e glucosamina e com os ácidos, láurico (dodecanóico), cáprico (decanóico) e caprílico (octanóico). Como biocatalisadores, foram utilizadas as lipases provindas dos microorganismos: *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e *Mucor javanicus*. Para uma melhor aplicação das enzimas, estas foram imobilizadas em crisotila natural, sendo obtidos resultados positivos com a acilação da sacarose, lactose e frutose com o ácido láurico, usando a lipase de *Candida antarctica*. O tamanho da cadeia carbônica nas moléculas do ácido graxo sugere que doze ou mais átomos de carbono são mais eficientes para a acilação de carboidratos, conforme já documentado na literatura. Os produtos formados na reação foram identificados por espectroscopia de infravermelho, mostrando as bandas de carbonila de éster por volta de 1740 cm^{-1} . Das análises realizadas, nada se pode afirmar acerca de qual das várias hidroxilas presentes nos carboidratos foi acilada. Entretanto, de acordo com a literatura, foram sugeridas algumas estruturas para os prováveis produtos. O método aqui utilizado mostrou boas possibilidades de acilação de carboidratos usando a lipase de *Candida antarctica* com ácidos graxos contendo pelo menos doze átomos de carbono.

Palavras-chaves: Biossurfactantes. Acilação enzimática. Lipases.

ABSTRACT

Sugar esters constitute one of the main kinds of natural surfactants. These called biosurfactants show different advantages related to the synthetic surfactants. They are easily degraded in the ground and water with low toxicity what allows their industrial use in pharmaceutical food and cosmetic products. A particular strategy about these compounds is that they can be synthesized from renewed substrate sources as carbohydrates and vegetal fatty acids. However, they still not widely used because of the high cost of large-scale production, associate to the inefficient methods of product recovery. Sugar esters can be synthesized by chemical or enzymatic methods. The chemical ester production requires high temperatures and leads to a low selectivity, forming colored pigments as side products. The enzyme application in the ester synthesis leads to regio and stereo selective products. The present work was focused on biosurfactant synthesis using biocatalysis with different carbohydrate, fatty acid and enzyme source. The experimental work was carried out employing different carbohydrates, as sucrose, lactose, glucose, fructose and glucosamina with lauric acid (dodecanoic), capric (decanoic) and caprylic (octanoic). The biocatalyst used were lipases from the microorganism source; *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* and *Mucor javanicus*. For a better application of enzymes they were immobilized on chrysotile as support. Positive results were found for lauric acid with fructose, sucrose and lactose using lipase from *Candida antarctica*. The size of carbon chain in the fatty acid molecule suggests that twelve carbon atoms are more efficient for the acylation of carbohydrate as already seen in the literature. The identification of reaction product was done by infrared spectroscopy showing the characteristic band around 1740 cm^{-1} . No idea about the right position of carbohydrate acylation was found. Wherever, according to the literature for analogue systems, some hypothetical structures for de products are suggested. These method show good possibilities of carbohydrate acylation using lipases from *Candida antarctica* with twelve chain fatty acid molecules.

Key words: Biosurfactant. Enzymatic acylation. Lipases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional da lactato desidrogenase	14
Figura 2 - Modelo da catálise enzimática-chave e fechadura	15
Figura 3 - Representação da biocatálise em síntese bifásica.....	15
Figura 4 - Exemplos de ésteres de sacarose	23
Figura 5 - Cinéticas de acilação da sacarose e maltose.....	32
Figura 6 - Regiosseletividade de diferentes enzimas na acilação da sacarose	34
Figura 7 - Estrutura da crisotila.....	41
Figura 8 - Preparação da crisotila.....	47
Figura 9 - Sistema utilizado para realizar as reações	48
Figura 10 - Estrutura dos monossacarídeos.....	52
Figura 11 - Espectro no IV do laurato de frutose em DMSO.....	54
Figura 12 - Estrutura dos dissacarídeos.....	55
Figura 13 - Espectro no IV do laurato de sacarose, com a lipase <i>Candida rugosa</i> em crisotila	56
Figura 14 - Espectro do laurato de sacarose em piridina	57
Figura 15 - Espectro do laurato de sacarose em DMSO	58
Figura 16 - Estruturas possíveis para a acilação enzimática da sacarose.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes	29
Tabela 2 - Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética	30
Tabela 3 - Valores do coeficiente de partição (Log P).....	39
Tabela 4 - Alguns biossurfactantes produzidos por microorganismos.....	40
Tabela 5 – Enzimas, reagentes e solventes utilizados nos experimentos	46
Tabela 6 - Comprimento de onda das enzimas, na água mãe.....	50
Tabela 7 - Rendimento do laurato de frutose, catalisado pela lipase de <i>Candida antarctica</i> ...	53
Tabela 8 - Carboidratos, ácidos alifáticos e enzimas testadas para a acilação de dissacarídeos.....	55
Tabela 9 - Ésteres de dissacarídeos formados e rendimentos obtidos com a lipase de <i>Candida antarctica</i> , utilizando-se ácido láurico (0,01 M).....	57
Tabela 10 - Espectro das bandas de carbonila dos ésteres obtidos.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

CMC- Concentração micelar crítica

DMSO- Dimetilsulfóxido

DMF- Dimetilformamida

EnzS- Complexo enzima-substrato

HLB- Balanço lipofílico e hidrofílico

pH- Potencial de hidrogênio

Log P- Coeficiente de partição

RPM- Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Apresentação.....	13
1.2 Aplicação de enzimas em síntese orgânica	16
1.2.1 Lipases em síntese orgânica	17
1.3 Aplicação de enzimas na acilação de carboidratos.....	19
1.4 Ésteres derivados de carboidratos produzidos por lipases.....	20
1.5 Propriedades e aplicações dos biossurfactantes.....	24
1.6 Influência da enzima na formação dos biossurfactantes	32
1.6.1 Efeito da proximidade da orientação	34
1.6.2 Efeito da imobilização do biocatalisador	35
1.6.3 Influência das condições operatórias	37
1.6.4 Influência do solvente na biocatálise	37
1.6.5 Biossurfactantes produzidos por microorganismos	39
1.7 Crisotila como suporte para a imobilização de biocatalisadores	40
1.8 Justificativa do trabalho	42
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
3 METODOLOGIA	45
3.1 Materiais e equipamentos	45
3.2 Métodos	46

3.2.1 Preparo e ativação da crisotila	46
3.2.2 Imobilização das enzimas.....	47
3.2.3 Preparo do meio reacional	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.1 Estudo da Produção de ésteres de carboidratos a partir de diferentes monossacarídeos.....	51
4.2 Estudo da produção de ésteres de carboidratos a partir de diferentes dissacarídeos.....	54
5 CONCLUSÕES.....	61
5.1 Publicações originadas deste trabalho.....	62
BIBLIOGRAFIA	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

A importância do estudo de métodos de aplicação de biocatalisadores em síntese orgânica é atualmente uma área de grande relevância, visto que esta área se tornou uma ferramenta prática na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria (JESUS, 1998).

O uso de biocatalisadores naturais como as enzimas para a conversão de compostos orgânicos não é uma técnica nova. Na verdade, essa técnica tem sido usada a mais de 100 anos na forma de células inteiras, organelas celulares ou enzimas isoladas (FABER 1997).

As enzimas são catalisadores de sistemas biológicos altamente eficientes na catálise de diversas reações químicas, porque têm capacidade de se ligar especificamente a uma grande variedade de moléculas. Essas enzimas aceleram as reações por fatores de, pelo menos, um milhão de vezes e são altamente específicas, tanto na reação catalisada como na sua escolha de reagentes, os quais são chamados de substratos. Uma enzima geralmente catalisa uma reação química única ou um conjunto de reações estreitamente relacionadas, sendo que reações colaterais, com formação de subprodutos, raramente ocorrem, em contraste com as reações não catalisadas por enzimas.

A formação de um complexo, enzima-substrato (ES), é a primeira etapa na catálise enzimática. Os substratos são ligados a uma região específica da enzima, chamada de centro ativo, ou sítio ativo, contendo os radicais de aminoácidos que participam diretamente na formação e quebra de ligações. Esses radicais são chamados grupamentos catalíticos (JOÃO, 1999). A Figura 1 mostra a estrutura tridimensional da lactato desidrogenase, uma oxirredutase ligada ao substrato específico, o piruvato, em seu sítio ativo pelos resíduos

arginina 171 e histidina 195 levando a formação do L-lactato (VOET, 1995). Essa enzima, idêntica ao álcool desidrogenase, é capaz de catalisar reações de redução de compostos carbonílicos formando derivados quirais (WENDHAUSEN, 1998, 2005) que são compostos muito importantes na síntese de fármacos quirais com elevados excessos enantioméricos (CHARTRAIN, 2001). As enzimas reagem via a formação de complexo enzima-substrato para posteriormente formar produtos.

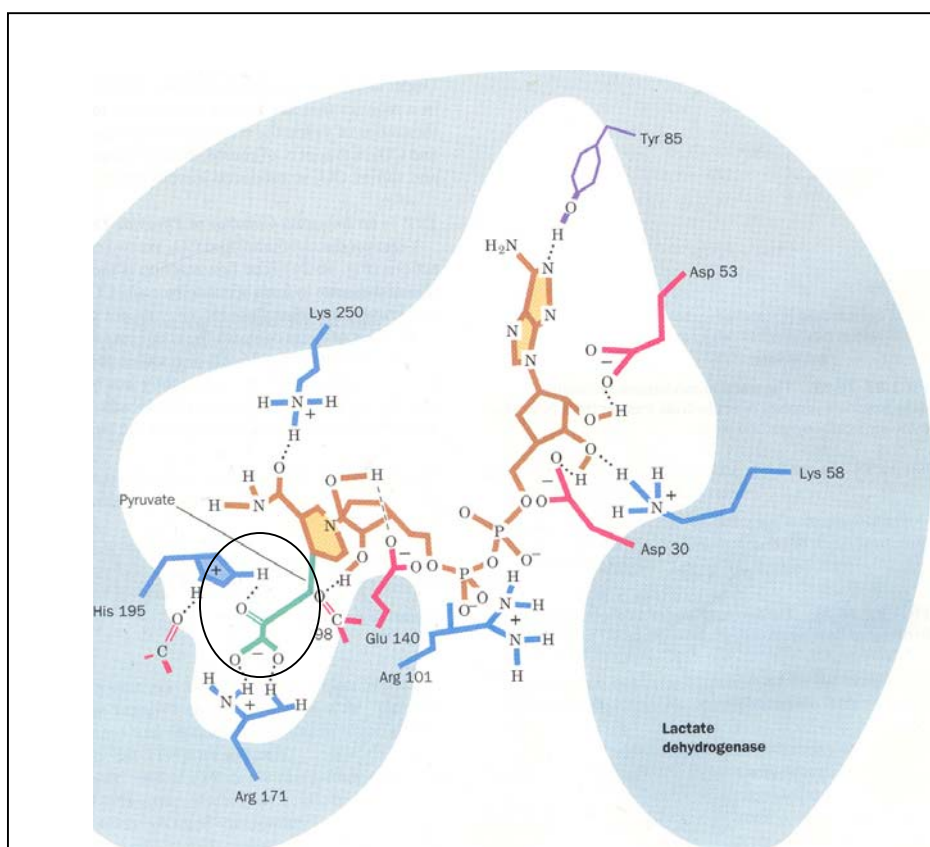


FIGURA 1- Estrutura tridimensional da Lactato desidrogenase

FONTE: VOET, D., VOET, J. **Biochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, INC, 1995. p. 465-469.

Entre as teorias e racionalizações que tem sido desenvolvida para entender catálise enzimática, o modelo mais ilustrativo é o mecanismo da chave e fechadura desenvolvido por Emil Fischer em 1894, e o mecanismo do encaixe induzido de Koshland Jr. desenvolvido no

final da década de sessenta (Figura 2). A regra de três pontos foi outra teoria criada por A. G. Ogston para explicar a enantiosseletividade das enzimas (FABER 1997).

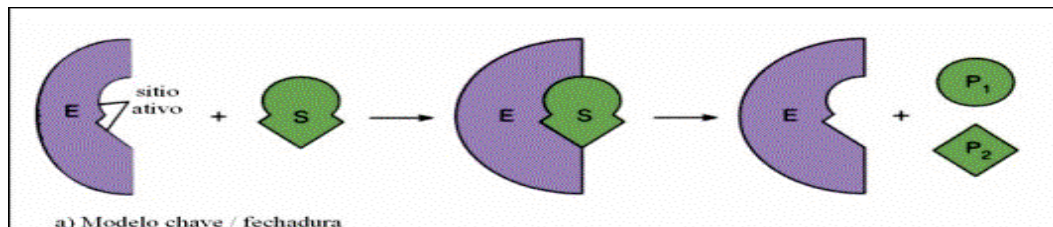


FIGURA 2: Modelo da catálise enzimática do mecanismo da chave e fechadura, desenvolvido por Emil Fischer.

FONTE: JESUS, Paulo C. Enzimas imobilizadas em crisotila e organo-gel: aplicação na resolução de ácidos racêmicos. 1998. Florianópolis, p. 12

Como toda reação catalítica, uma enzima acelera a velocidade de reação diminuindo a barreira energética entre reagentes e produtos. Grande parte de seu poder catalítico ocorre por elas aproximarem os substratos em orientações favoráveis no complexo enzima-substrato (ES).

A biocatálise em síntese bifásica esta representada na Figura 3.

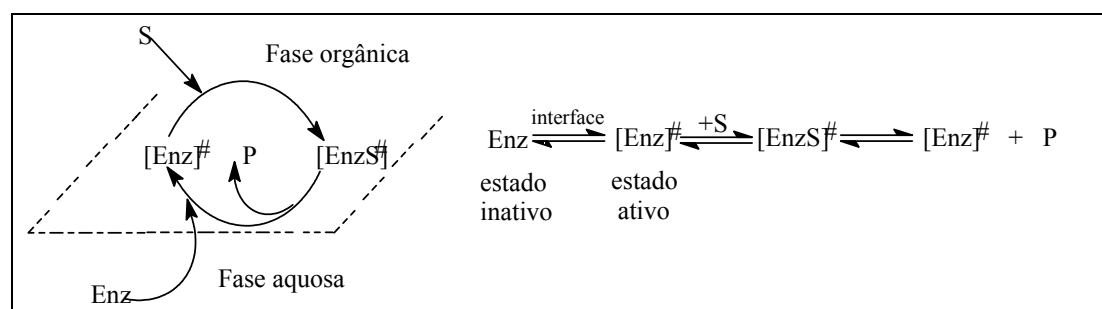


FIGURA 3- Representação da biocatálise em síntese bifásica. S = substrato, P = produto, Enz = enzima, [EnzS] = complexo enzima-substrato, # denota estado de transição.

FONTE: JESUS, Paulo C. Enzimas imobilizadas em crisotila e organo-gel: aplicação na resolução de ácidos Racêmicos. 1998. p. 09.

Muitas são as vantagens em se utilizar enzimas em métodos sintéticos, mas três características são as mais importantes:

a) Quimiosseletividade: uma vez que o propósito de uma enzima é atuar em um único tipo de grupo funcional, outras funcionalizações sensíveis, que deveriam reagir normalmente com certo grau sob catálise química, são preservadas.

b) Regiosseletividade: devido a sua complexa estrutura tridimensional, enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em regiões diferentes no mesmo substrato.

c) Enantiosseletividade: toda enzima é feita de L-aminoácidos e assim são catalisadores quirais. Como consequência, alguns tipos de quiralidade presentes no substrato são reconhecidos. Assim um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo, e ambos enantiômeros de um substrato, podem reagir a diferentes velocidades, dispondo de uma resolução cinética.

Apesar da habilidade das enzimas em agir como catalisadores seletivos para uma série de reações orgânicas, foi a partir da década de 80 que esses biocatalisadores começaram a ser aplicados na preparação de compostos quirais (JESUS,1998.; SCHMID;VERGER, 1998.; SILVA,2000).

1.2 Aplicação de enzimas em síntese orgânica

O uso de enzimas, como catalisadores em síntese orgânica, tem sido extensamente documentada. Problemas com sua utilização, no entanto, têm aparecido como a característica de instabilidade em meio orgânico, faixa limitada de substrato específico e o alto custo que tem sido superado pelo crescente número de publicações na área. A percepção, portanto, que elas são intrinsecamente limitadas, como catalisadores, mudou devido aos novos desenvolvimentos em química e biologia e as novas exigências industriais. Atualmente, um

grande número de reações orgânicas pode ser realizado com o uso de enzimas, como, por exemplo: síntese de intermediários quirais, transformação de açúcares, síntese de compostos importantes no metabolismo e análogos destes metabólitos (aminoácidos, açúcares e seus fosfatos, entre outros), síntese de peptídeos e proteínas, bem como outras transformações nas quais o emprego da metodologia da química clássica é dificultado. Enzimas podem ainda ser desnaturadas por alterações do meio ambiente como temperatura, pressão e pH (MATSUMOTO *et al.* 1997).

A utilização de enzimas em síntese orgânica requer que a mesma seja protegida do contato com o solvente orgânico, pois o mesmo pode desnaturá-la. Diferentes técnicas de imobilização tais como ligação covalente com um suporte, por aprisionamento em uma matriz polimérica porosa ou em gel tem sido usado para protegê-la do contato do solvente não polar, meio no qual se realiza a transformação (REBELO *et al.* 1999; RAMOS *et al.* 1999; CABRAL *et al.* 2003).

As enzimas aceleram as reações por um fator da ordem de 10^6 a 10^{14} . Um estudo estimou que a enzima ácido orótico descarboxilase aumenta a velocidade reacional em 10^{17} vezes relativamente à reação não catalítica, cujo tempo de meia-vida, para condições ambientais, foi avaliado em 78 milhões de anos. Eis um exemplo notável da importância dos biocatalisadores (FERREIRA, 2002).

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. Nessa classe, estão incluídas as amidases, proteases, esterases, nitrilases, fosfatases, epoxidases e as lipases.

1.2.1 Lipases em síntese orgânica

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que hidrolisam triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol. Estão presentes em diversos organismos, incluindo animais (GBEKELOLUWA *et al.* 1993), plantas (BALLESTEROS *et*

al. 2000), microorganismos (SCHMID; VERGER, 1998), fungos e bactérias. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo além de não requererem cofatores (JESUS, 1998), por atuarem em uma faixa de pH relativamente grande e serem muito estáveis (RAMOS *et al.* 1999). O uso de lipases está diretamente relacionado com a sua seletividade frente aos substratos, e a sua habilidade para discriminar entre um ácido graxo específico ou um grupo acila em particular (RAMOS *et al.* 1999).

Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificações e transesterificações, amidação, síntese de peptídeos e formação de lactonas macrocíclicas. Embora as lipases possam hidrolisar e formar ésteres como as proteases e esterases, seu mecanismo molecular é diferente, cuja diferença mais importante entre as lipases e esterases é a interação físico-química com seus substratos. Em comparação com as esterases que mostram uma atividade “normal” segundo Michaelis-Menten, um aumento de [S] conduz a um aumento na atividade. As lipases não mostram atividade quando a concentração de substrato é baixa. Quando a concentração é gradualmente aumentada acima de sua solubilidade limite, é observado um aumento repentino na sua atividade. O fato de lipases não hidrolisarem substratos abaixo da concentração micelar crítica (CMC), exibindo, porém, uma alta atividade acima dela tem sido chamada de “ativação interfacial”(BOSSI, 2004). O mecanismo de ativação interfacial está associado à mudança conformacional na enzima (COSTA; AMORIM, 1999).

Lipases têm sido sucessivamente utilizadas na acilação estereo e regioseletiva de várias moléculas incluindo açúcares. Em especial, as moléculas de carboidratos representam um desafio para a acilação regioseletiva devido aos seus vários grupos hidroxilas.

No estudo feito por Hang (1995), a esterificação enzimática de açúcares com ácidos graxos em álcool terc-butílico com a lipase de *Bussochlamys fulva* NTG 9, mostrou que o ácido linoléico teve a melhor porcentagem de esterificação para os açúcares (65%). A frutose esterificou 71,3%, glicose 47,8% e a sacarose 36,6%. A sacarose apresentou uma baixa porcentagem, por não ter boa solubilização em álcool terc-butílico. Já a glicose, quando no meio reacional de benzeno e a lipase de *Candida antarctica*, apresentou 52% de esterificação.

1.3 Aplicação de enzimas na acilação de carboidratos

A preparação de biossurfactantes, que são compostos de origem microbiana ou enzimática, pela ação enzimática sobre moléculas hidrofóbicas promoveu um novo direcionamento na produção de compostos como hidratantes em cremes faciais e cabelo e, principalmente, para utilização em produtos de higiene e cosméticos.

A síntese de ésteres de açúcar catalisada por enzimas leva a produção de produtos régio e estereosseletivos o que pode ter grande impacto na síntese de adoçantes, ingredientes de alimentos e produtos farmacêuticos, bem como terapias para a AIDS e câncer (OKABE *et al.* 1999). Na presença adequada de solvente orgânico anidro (exemplo: piridina, dimetilformamida, dimetilsufóxido, entre outros), açúcares são acilados nas posições do carbono primário e secundário (RICH *et al.* 1994; POLAT *et al.* 1997).

Métodos enzimáticos para a monoacilação de carboidratos com ácidos graxos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sendo que uma das razões é que a preparação por métodos químicos não está sendo seletiva; outra razão é que surfactantes não-iônicos puros com estrutura molecular definida estão sendo utilizados como adjuvantes para propósitos farmacêuticos.

Oostertom *et al* (1995) realizaram a acilação de vários dissacarídeos com butanoato de etila e dodecanoato de etila catalisadas pela lipase de *Candida antarctica* em álcool tert-butílico, em uma escala de temperatura entre 40° a 82° C . A acilação da lactose e sacarose que são menos solúveis foi lenta, mas uma conversão moderada (37%) da sacarose foi observada depois de 07 dias de reação.

Várias outras lipases e proteases foram testadas, e a lipase de *Candida antarctica* foi a única a promover a catálise da acilação da sacarose em refluxo com álcool tert-butílico. Foi usado álcool tert-butílico, que é um solvente ligeiramente polar e não é tóxico. Esse álcool não é um substrato para a lipase porque ele é também estericamente impedido para entrar no sítio ativo. O dissacarídeo é parcialmente solubilizado no álcool tert-butílico, e com a reação prosseguindo, o substrato é completamente dissolvido devido sua alta solubilidade no produto (BOSCOLO, 2003).

1.4 Ésteres derivados de carboidratos produzidos por lipases

Ésteres derivados de açúcares e ácidos graxos com variados graus de esterificação constituem interessante grupo de surfactantes não-iônicos (TSUZUKI *et al.* 1999; SCHLOTTERBECK, 1993; GBEKELOLUWA *et al.* 1993; VLAHOV *et al.* 1997). Eles consistem de uma parte que possui um carboidrato como grupo hidrofílico e um ou mais ácidos graxos como componente lipofílico (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Pelo controle do grau de esterificação e a natureza do ácido graxo, é possível sintetizar ésteres de açúcares com uma larga variedade de balanços hidrofílico, lipofílico (HLB) com diferentes propriedades surfactantes (FERRER *et al.* 2002).

A solubilidade de ambos os substratos carboidrato e ácidos graxos criou dificuldades nos casos das reações mais hidrofílicas. Na solução desse problema Therisod e Klibanov usaram piridina e ativaram o ácido graxo. Entretanto, para aplicações em alimentos é recomendado o uso do hexano no meio reacional, porque este é menos tóxico que a piridina e o benzeno (MUTUA; AKOH, 1993).

Os ésteres de açúcares podem ser sintetizados via química ou enzimática, porém, a produção de ésteres via química requer altas temperaturas e leva a uma baixa seletividade formando pigmentos coloridos como produtos secundários (TSUZUKI *et al.* 1999; SCHLOTTERBECK, 1993).

Os ésteres de sacarose ou sucroésteres obtidos a partir de ácidos graxos são compostos anfifílicos, atóxicos, compatíveis com a pele e digestíveis quando o grau de esterificação for menor ou igual a 3. O balanço entre a hidrofílicidade e a lipofílicidade dos sucroésteres (HLB) não é significativamente alterado por variações na temperatura, mas pode ser regulado pelo grau de substituições e pelo tamanho e número de insaturações das cadeias alquílicas. Dessa forma, é possível conseguir uma grande variação nas características surfactantes dos sucroésteres. Outra característica importante dos sucroésteres é o alto grau de biodegradabilidade desses compostos o que os tornam de baixo impacto ambiental (BOSCOLO, 2003).

Ainda para o referido autor, monoésteres de sacarose com cadeias alquílicas entre oito e dezesseis carbonos são excelentes surfactantes não-iônicos, enquanto os sucroésteres com cadeias alquílicas maiores que dezoito carbonos apresentam pouca ou nenhuma solubilidade em água, o que inviabiliza suas aplicações como tensoativos.

Sucroésteres geralmente apresentam uma baixa capacidade de formar microemulsões, o que é possível somente na presença de co-surfactantes, como álcoois com oito e doze carbonos, podendo assim levar à solubilização até 45% de água em óleo, o que é

muito desejável na indústria de cosméticos. O monolaurato de sacarose apresenta HLB igual a 16 e o HLB do dilaurato de sacarose é igual a 5 (BOSCOLO, 2003). Os sucroésteres com HLB entre 2 a 6 têm sido usados na prevenção da separação de fases em produtos compostos de misturas água/óleo como margarina, chocolate, patê e outros, além de melhorar a textura de pães, bolos e similares (BOSCOLO, 2003).

A dificuldade em se controlar o grau de seletividade das reações envolvendo as hidroxilas da sacarose tem sido um problema na sucroquímica. As hidroxilas primárias são as mais reativas apenas nas reações em que fatores estéricos sejam importantes, sendo a hidroxila da posição 2 a mais ácida dentre todas e, conseqüentemente, a mais reativa. Isso ocorre tanto em solventes orgânicos, devido às fortes ligações de hidrogênio envolvendo O-2 e H-1' ou OH-3, como em meio aquoso, com a incorporação de uma molécula de água (BOSCOLO, 2003).

A sacarose ou 1-O-(β -D-Fructofuranosil)- α -D-glicopiranosose é composta por frutose e glicose unidas por uma ligação glicosídica sendo classificada como um poliol, com oito grupos hidroxilas reagentes, três primários, na glicose 6, e na frutose e 1',6', cinco secundários, 2,3,4, no anel da glicose e, 3' e 4' no anel da frutose (BOSCOLO, 2003). A estrutura de um mono e di-éster de sacarose é mostrada na Figura 4.

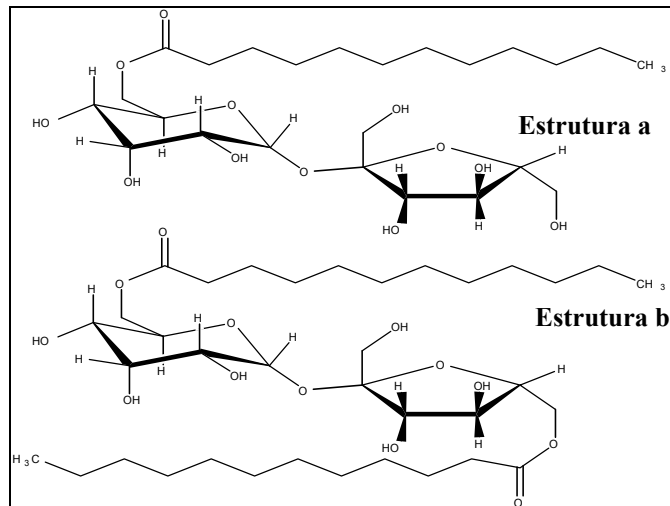


FIGURA 4 – Exemplos de ésteres de sacarose, (a) 6-O- Laurato de sacarose, (b) 6,6'- O-dilaurato de sacarose.

FONTES: BOSCOLO, Maurício; **Sucroquímica: Síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose.** Química Nova, v.26, n. 6, 2003. p. 907.

A acilação química da sacarose ocorre preferencialmente nos grupos de álcool primário, $6\text{-OH} \geq 6'\text{-OH} > 1'\text{-OH}$ (PEDERSEN *et al.*, 2002), cujos ésteres são usados na indústria de alimentos, detergentes, cosméticos (MURRAY *et al.* 2000), petrolífera e farmacêutica (REIS, 2003; TSUZUKI *et al.* 1999; SCHLOTTERBECK, 1993; RICH *et al.* 1994; CRUCES *et al.* 2000; PLOU *et al.* 1995). Além disso, suas propriedades como antibióticos antitumorais (CRUCES *et al.* 2000) e inseticidas são muito bem publicadas e podem abrir um novo mercado.

Com o uso de ésteres de sacarose, é possível aumentar o tempo de prateleira de muitos vegetais. No Brasil, já foram realizadas pesquisas com resultados positivos na utilização de sucroésteres no amadurecimento de bananas, tomates e pêssegos (BOSCOLO, 2003). Sucroésteres aromáticos são também encontrados em diversos vegetais. A partir da *Phyllanthus niruri*, conhecida no Brasil como quebra-pedra, pode-se extrair a nirurisida, um poliéster de sacarose caracterizado como inibidor do HIV (BOSCOLO, 2003).

Espécies de *Polygonum sp* (erva-de-bicho) e *Poygala sp* (timutu) contêm sucroésteres com unidades dos ácidos ferúlico e cumárico em diversas posições na sacarose e

são caracterizados como promissores agentes anticarcinogênicos. Sucroésteres derivados do ácido gálico (ácido 3,4,5,-tri-hidroxibenzóico) são agentes antioxidantes e podem ser empregados tanto em farmacologia como na indústria alimentícia. E, em função da atividade biológica sobre alguns insetos e de serem encontrados em vegetais, alguns sucroésteres são classificados como pesticidas naturais (BOSCOLO, 2003).

A sacarose tem mostrado ser uma matéria-prima versátil, de crescente interesse tecnológico. Entretanto, observa-se que a pesquisa feita por pesquisadores brasileiros não condiz com a importância do açúcar de cana na economia nacional. A reversão desse quadro pode ser um caminho para a geração de uma promissora atividade agroindustrial com novas perspectivas para os profissionais da área de química. Ésteres de sacarose são comercialmente os mais importantes ésteres de açúcares (BOSCOLO, 2003), e, cuja produção atual de ésteres de sacarose, de longe o mais utilizado, tem sido estimada em torno de 4000 compostos por ano (PLOU *et al.* 2002).

1.5 Propriedades e aplicações dos biossurfactantes

Os compostos de origem microbiana ou enzimática (BANAT, 1995), que exibem propriedades surfactantes, de estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos e que possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes, os quais consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (GOVEIA *et al.* 2003; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A porção hidrofóbica é geralmente constituída por ácidos graxos hidroxilados, ou compostos da classe dos peptídeos hidrofóbicos (BANAT, 1995). A porção apolar é freqüentemente uma cadeia de hidrocarboneto enquanto a porção polar pode ser iônica

(aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. A maioria dos biossurfactantes é neutra, ou aniônica, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Alquil glucosídeos é um grupo de surfactantes não-iônicos, sendo que eles também exibem atividade antimicrobiana e são biodegradáveis (OTTO *et al.* 1998).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial, concentração micelar crítica (CMC) e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Essas propriedades criam microemulsões, nas quais a formação de micelas ocorre quando os hidróxidos podem solubilizar em água (BANAT, 1995).

As propriedades comuns à maioria dos biossurfactantes podem ser listadas como: emulsificantes e dispersantes, em cosméticos e tintas, solubilizantes, agentes molhantes e penetrantes em produtos farmacêuticos e de higiene, como agentes espumantes na flotação de minério e atuam também como fungicidas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Quanto à atividade superficial e interfacial, os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante. A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg.L⁻¹, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN.m⁻¹ respectivamente (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Nas propriedades superficiais de uma série de ésteres sintetizados enzimaticamente, com diferentes cadeias hidrofóbicas (12 a 16 carbonos), poucos dos ésteres de açúcares tiveram redução significativa da tensão superficial em água 31,0 - 43,0 mN.m⁻¹

(MURRAY *et al.* 2000) e 24,5 a 36,5 mN.m⁻¹, havendo redução da concentração micelar crítica (CMC) quando aumentada a cadeia carbônica (FERRER *et al.* 2002).

Quanto à tolerância à temperatura, pH e força iônica, alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Diferentes dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (GOVEIA *et al.* 2003; BANAT, 1995; NITSCHKE; PASTORE, 2002, PLOU *et al.* 2002; VLAHOV *et al.* 1997).

Os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, causando menos irritação para a pele, além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em cosméticos (KJELLIN *et al.* 2001), produtos farmacêuticos e alimentos (VELRAEDS *et al.* 1996; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Além disso, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência. Outra vantagem reside no fato de que estes compostos não são derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

O interesse mundial dos biossurfactantes tem aumentado muito devido a sua capacidade de substituir os surfactantes sintéticos (BANAT, 1995).

A preferência dos consumidores por produtos naturais tem estimulado estudos com a finalidade de se obter abundantemente precursores extrativos naturais através de métodos enzimáticos. Esses métodos têm capacidade de produzir grandes quantidades de substâncias aromáticas, que não seriam acessíveis por processos extrativos. Os produtos obtidos dessa forma são de fato considerados naturais pela legislação (DE CONTI *et al.* 2001).

A área de biocatálise emergiu como uma ferramenta poderosa para a chamada “química ecologicamente correta” (*green chemistry*), a qual levará cada vez mais a processos industriais comprometidos com o controle ambiental (DE CONTI *et al.* 2001).

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em biorremediação de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada do petróleo. Atualmente, porém as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Uma das áreas que envolvem também o uso dos biossurfactantes são os compostos de antibióticos, que tem a capacidade de romper a membrana celular dos microorganismos promovendo sua morte, como exemplo pode-se citar os lipopeptídeos produzidos por “*Bacillus subtilis*”, o qual tem um grande poder antifúngico. *Candida antarctica*, tem atividade antimicrobial como também o *Bacillus licheniformis*, o qual exibe atividade antibacteriana e antifúngica (BANAT, 1995; BALLESTEROS, 2005).

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral. O biossurfactante produzido por *R. erythropolis* inibiu o vírus do herpes simples e vírus parainfluenza (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras. A inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biossurfactante produzido por *Lactobacillus* foi relatada. Os autores sugeriram o desenvolvimento de agentes antiadesivos para uso em cateteres, visando diminuir a formação de biofilmes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem a indústria de papel, têxtil e cerâmica. Os biodispersantes têm aplicação na indústria de tintas, pois geram maior espalhabilidade e aumentam as propriedades de mistura. As propriedades de estabilização de espuma são necessárias na fabricação de extintores de incêndio (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A Tabela 1 mostra um resumo das funções e aplicações industriais dos biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

TABELA 1 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

FUNÇÕES	CAMPOS DE APLICAÇÃO
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos.
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene.
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas.
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura.
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios.
Agentes espessantes	Tintas e alimentos.
Seqüestrantes de metais	Mineração.
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas.
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos.
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo.
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos.
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água.
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos.
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR).

FONTE: NITSCHKE, Márcia; PASTORE Gláucia, M. **Biossurfactantes: propriedades e aplicações**. Química Nova, v. 25, n. 5, 2002. p. 775.

Ésteres de sacarose são produtos hidrofóbicos e, estima-se que mais de 4000 t/a desses ésteres são aplicados em alimentos e cosméticos como emulsificantes (RHODE; HILL, 1999).

A produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de t/a e atualmente, nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que, nos países em desenvolvimento, os compostos de origem natural predominam (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser utilizados em uma gama de aplicações industriais. Entretanto, ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados aos métodos

ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros (PASTORE, NITSCHKE, 2002; VELRAEDS *et al.* 1996).

Na Tabela 2, estão descritos os principais grupos desses surfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002; RHODE; HILL, 1999).

TABELA 2 - Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética

NATURAIS	SINTÉTICOS
Alquil poliglicosídeos	Alcanolamidas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucaminas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e éteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de ácidos graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

FONTES: NITSCHKE, Márcia. PASTORE, Gláucia, M. **Biossurfactantes: propriedades e aplicações**. Química Nova, v. 25, n. 5, 2002. p.772.

Os dissacarídeos são solubilizados em dimetilsufóxido (DMSO), sendo este um poderoso desnaturante de enzima e daí ser geralmente considerado incompatível com atividade enzimática (PEDERSEN *et al.* 2002). Entretanto, os solventes, unindo-se ao hidrogênio imitam a função da água, introduzindo novas propriedades catalíticas na enzima significativamente diferente daquelas na água (PEDERSEN *et al.* 2002).

As três formas de controlar a reação de esterificação via enzimática são o meio reacional, o tipo de enzima e o suporte (PLOU *et al.* 2002).

A acidulação regiosseletiva de carboidratos é uma tarefa árdua nas reações catalisadas por enzimas, há possibilidade de manipulação não apenas da reatividade, mas também da seletividade pela escolha apropriada do solvente, por isso, sendo de grande interesse. Por essa razão, o efeito da porcentagem de dimetilsufóxido (DMSO) foi estudado

(PLOU *et al.* 2002). O uso de um cossolvente como dimetilformamida (DMF), dimetilsufóxido (DMSO) ou piridina aumenta a solubilidade dos carboidratos. Além disso, permite ainda um aumento no potencial catalítico da lipase, assim como um aumento da solubilização dos carboidratos (BALLESTEROS *et al.* 2000).

O uso de pequena quantidade de dimetilsufóxido (10%) dissolve inicialmente o açúcar, e então, é adicionado a uma porção maior de álcool terciário. Esse procedimento aumenta substancialmente a solubilidade do carboidrato, permitindo, assim, que a acilação se conclua. Como a maior parte do meio reacional é formada por terc-butanol, ocorre pouca inativação, pois as enzimas são bastante resistentes a esses solventes (PLOU *et al.* 2002).

Quando 5% de dimetilsufóxido (DMSO) estavam presentes na reação da mistura final (Figura 5), a formação de diésteres foi muito significativa, especialmente usando sacarose como substrato. Em contraste, com a reação contendo 20% de dimetilsufóxido (DMSO), a acilação foi muito lenta, mas, interessantemente, a presença de diésteres foi quase negligenciável (menor que 1%), acima de 30% de dimetilsufóxido (DMSO) a taxa de reação não é observada, provavelmente devido à inativação da lipase por dimetilsufóxido (DMSO), resultando em uma desrupção da concha de hidratação na superfície da lipase. É bem conhecido também que dimetilsufóxido (DMSO) pode causar desdobramento de proteínas. Isso permite controlar a produção seletiva de monoésteres ou diésteres, simplesmente modificando a porcentagem de dimetilsufóxido (PLOU *et al.* 2002).

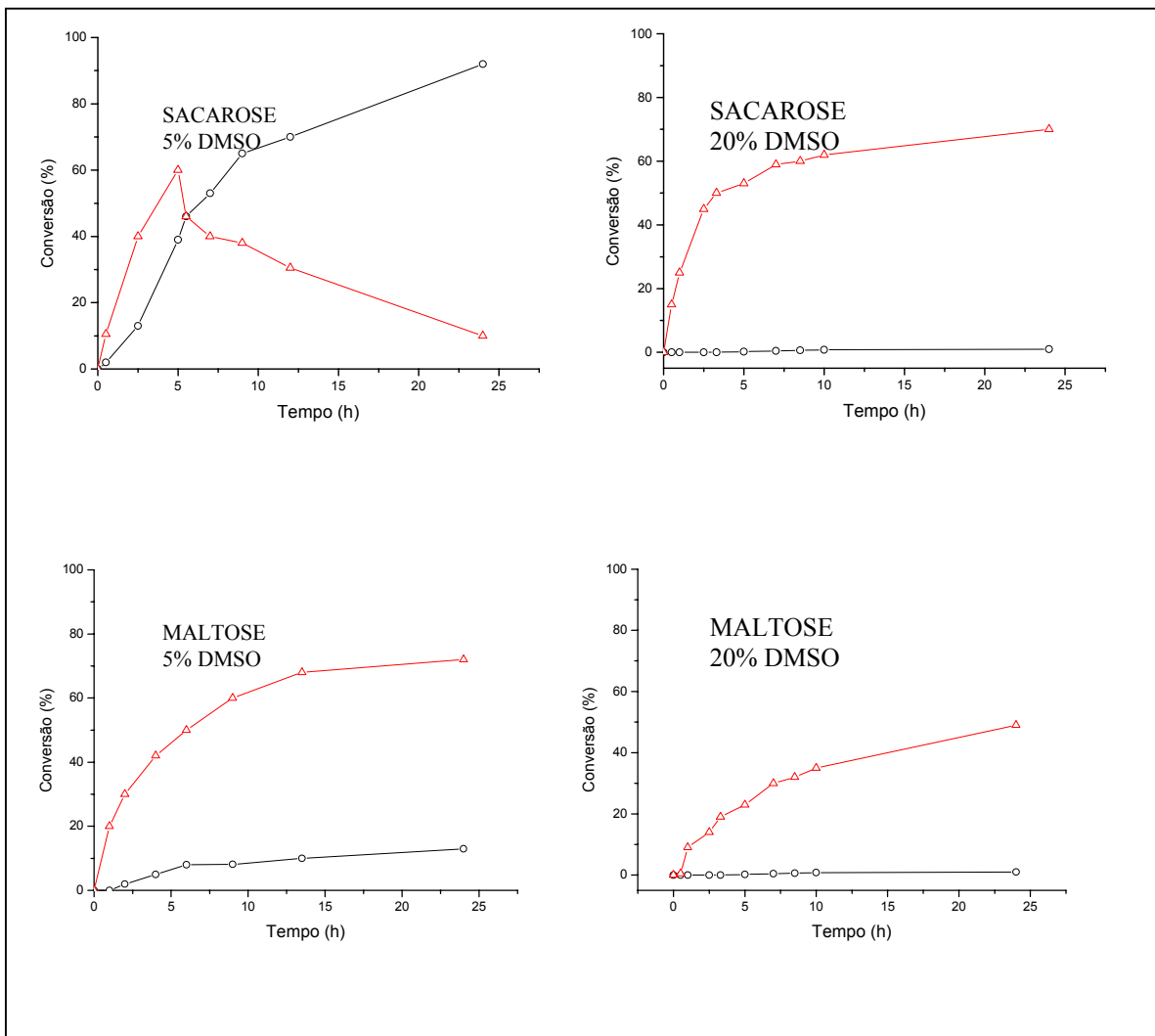


FIGURA 5- Cinéticas de acilação da sacarose e maltose com laurato de vinila variando a porcentagem de DMSO, em 2-metil-2-butanol. Conversão de (▽) monolaurato e (○) dilaurato.
 FONTE: PLOU, F.J et al. *Journal of Biotechnology*. n. 96, 2002. p. 58.

Cruces *et al* (2000), usando a lipase *Humicola lanuginosa*/Celite, na acilação da maltose com uma mistura de álcool terc-amílico e dimetilsufóxido (DMSO) à 40°C, observaram que a 10% de dimetilsufóxido (DMSO) houve a maior formação de monoéster.

1.6 Influência da enzima na formação de biossurfactantes

Para a transesterificação dos açúcares catalisados por enzimas, diferentes regioisômeros podem ser obtidos, com a seleção apropriada do biocatalisador. Isso é

importante devido as diferentes propriedades apresentadas por cada tipo diferente de monoéster.

Plou *et al* (2002) estudaram diferentes lipases e proteases para acilação de sacarose e maltose com laurato de vinila em uma mistura de 2-metil-2-butanol e dimetilsufóxido (DMSO) 4:1 (v/v). Dentre esses biocatalisadores testados, pelo menos 4 lipases, foram capazes de catalisar a reação.

A lipase *Thermomyces lanuginosus* foi a mais eficiente, resultando em monoéster isolado. Nessas condições, uma análise de RMN de ^1H da sacarose mostrou que a hidroxila na posição 6 do anel de glicose foi seletivamente acilada. A lipase de *Candida antarctica* também rendeu uma conversão significativa da sacarose, mas foram formados dois monoésteres em razão equimolar.

A reatividade química dos grupos OH de sacarose seguem a seguinte ordem 6-OH > 6'-OH > 1'-OH > OH secundários, que se encontra na Figura 6 (PLOU *et al.* 2002). As reações de acilações catalisadas por lipases acontecem via formação de um intermediário acil-enzimas. Como consequência, a natureza de um doador acil tem um notável efeito na reatividade (ambos o ácido graxo e o grupo de saída) (PLOU *et al.* 2002).

Ainda, segundo os referidos autores, a maioria das acilações de açúcares usando proteases como biocatalisadores tem sido realizadas com cadeias médias e longas de ácidos graxos. Para a acilação de açúcares com ácidos graxos de cadeias longas, a diversidade e a natureza das lipases que as convertem como a maioria dos catalisadores é promissoras.

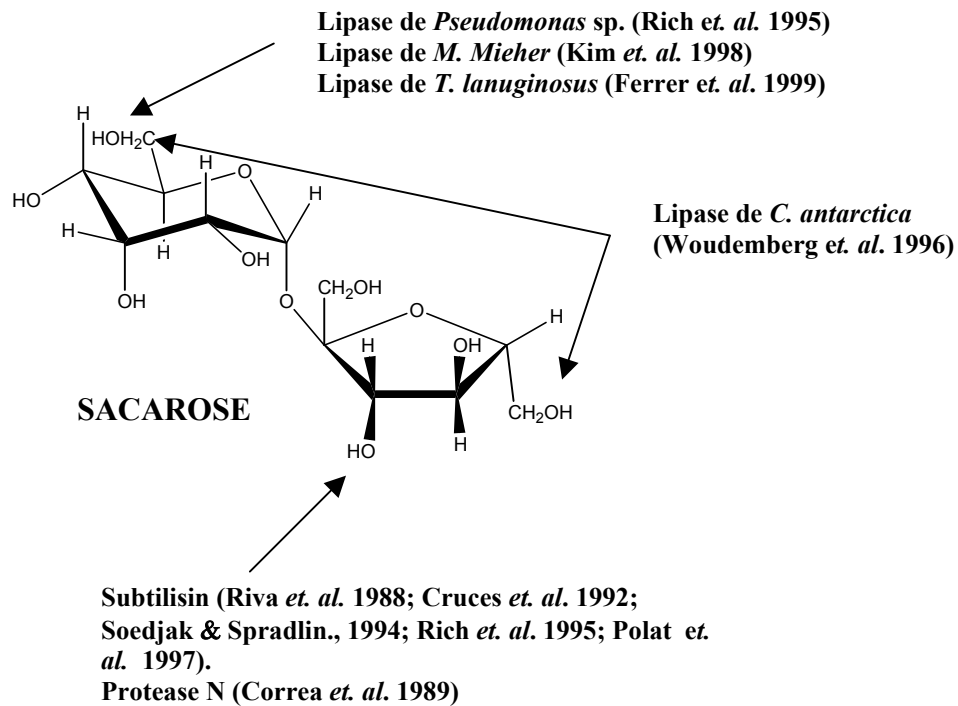


FIGURA 6 – Regioseletividade de diferentes enzimas na acilação da sacarose.
 FONTE: PLOU, F.J *et al.* **Journal of Biotechnology.** n. 96, 2002. p. 61.

1.6.1 Efeito da proximidade da orientação

Considerando uma reação bimolecular, os dois reagentes têm de se encontrar, sendo a velocidade proporcional ao produto das concentrações. Na mesma reação catalisada por uma enzima, os substratos formam eventualmente um complexo com ela. Assim os dois reagentes vão estar muito próximos um do outro, isto é, a sua “concentração efetiva” vai ser elevada. Além disso, os seus grupos reativos vão estar na orientação adequada para a reação. Esses efeitos promovidos pelas enzimas designam-se efeitos de proximidade e de orientação (FERREIRA, 2002).

Ainda, segundo o mesmo autor, em processos enzimáticos, a ligação do substrato à enzima, elimina os movimentos de translação, rotação molecular e de rotação interna nos substratos.

Em termos de interpretação termodinâmica, a formação do complexo enzima-substrato representa uma grande diminuição de entropia em relação à enzima e substrato

livres na solução. Daí, esses efeitos serem conhecidos por efeitos antientrúpicos, pois há uma diminuição de entropia corresponde um aumento na energia de Gibbs. Assim, esses efeitos elevam a energia do complexo ES, reduzindo deste modo a energia de ativação. Como são óbvios, eles têm maior expressão em reações envolvendo simultaneamente mais de um substrato. Por último refira-se que, para além do substrato ou enzima, os efeitos antientrúpicos podem advir de outras moléculas, particularmente do solvente. Sabe-se que a reação entre duas espécies em solução só ocorre após um rearranjo das moléculas de solvente à volta, isto é, após se originar um micro-ambiente particular, etapa que pode mesmo ser limitante do processo (FERREIRA, 2002).

Ainda, para o autor, no centro ativo das enzimas, micro-ambientes favoráveis são providenciados à partida, com a presença de moléculas de solvente estritamente necessárias e com orientações adequadas para catálise.

1.6.2 Efeito da imobilização do biocatalisador

Segundo Plou *et al* (2002), a imobilização é uma forma simples de facilitar ao substrato alcançar o sítio ativo catalítico da enzima, minimizando o contato proteína-proteína, que está, normalmente, presente quando é usada enzima suspensa em solventes orgânicos. A imobilização promove fácil separação e reutilização do biocatalisador, também promove uma fácil recuperação de produto e é capaz de aumentar a resistência contra a inativação de diferentes desnaturantes (CABRAL, 2003).

Para a acilação de sacarose com ésteres ativados, um significativo aumento da velocidade da reação pela imobilização da enzima tem sido documentado. Na verdade, a maioria das acilações enzimáticas de açúcares documentada na literatura tem sido realizada usando lipases comerciais imobilizadas.

Os efeitos da imobilização sobre atividades das enzimas resultam da interação de diferentes fatores:

- modificação da estrutura tridimensional da enzima, sob a ação de injunções devidas à fixação;

- modificações do micro-ambiente; pH local, interações eletrostáticas;

- fenômeno de difusão no interior do complexo e;

- impedimento estérico.

Esse conjunto de fatores vai representar um papel determinante na atividade e estabilidade da enzima (ANDRADE, 1992).

As condições ótimas de ação das enzimas imobilizadas, freqüentemente diferem daquelas das enzimas em solução e precisam ser perfeitamente conhecidas para evitar todo risco de erros de interpretação.

A comissão internacional de Hennicker, em 1971, propôs caracterizar a atividade dos complexos pela velocidade inicial de reação expressa em microkatal (kct): quantidade de produtos fornecidos em micromoles por segundo e por microgramas (matéria seca) ou por unidade de superfície do suporte, mencionado especialmente as condições de determinação da matéria seca, o teor em proteínas fixadas e a atividade específica da enzima antes da imobilização.

A imobilização ocasiona, freqüentemente, uma perda de atividade bastante variável de acordo com a natureza da enzima e o modo de fixação, mas casos de aumento de atividades foram igualmente registrados. Essas variações, tanto em um, como em outro, podem ser explicados por uma modificação estérica do sítio ativo da enzima, sob o efeito de uma mudança de conformação da cadeia polipeptídica (ANDRADE, 1992).

1.6.3 Influência das condições operatórias

Se a atividade residual de enzimas imobilizadas é mais fraca que a das enzimas nativas, em contrapartida, a sua estabilidade geralmente aumenta. Entretanto, a duração de vida dos complexos é muito variável. A estabilidade das preparações comerciais é um fator primordial para a exploração industrial dos reatores de enzimas (ANDRADE, 1992).

As quantidades de proteínas retidas são também muito variáveis e dependem da enzima considerada, do suporte utilizado, do método de imobilização empregado. Não existe, devido aos fenômenos de impedimento estérico, uma relação linear entre a atividade relacionada à unidade de massa do complexo e a quantidade de biocatalisador fixado (ANDRADE, 1992).

Ainda, segundo o referido autor, a imobilização da enzima, na presença do substrato ou de um inibidor competitivo, protege o sítio ativo e impede a criação de ligações entre o suporte e os aminoácidos que intervêm na catálise. Uma vez que a imobilização foi realizada, observa-se, freqüentemente, que a enzima fixada resiste melhor a variação de pH e aos tratamentos térmicos do que as espécies em solução.

1.6.4 Influência do solvente na biocatálise

O mais importante critério observado na seleção de um solvente não-aquoso está na conservação da catálise e especificidade do substrato para a enzima. Conseqüentemente, o solvente não poderá ter interações com a camada de hidratação da enzima, sendo esta necessária para a conservação da conformação nativa (BOSSI, 2004).

A principal característica no processo de modificação enzimática de carboidratos em solvente apolar aparece pela baixa solubilidade nesses solventes. Já solventes orgânicos polares, como piridina, dimetilsulfóxido ou álcoois terciários de cadeias curtas, são usados

nos processos da acilação enzimática de mono, di e trissacarídeos para uma série de solventes orgânicos (SERETI *et al.* 1998).

Para Bossi (2004), os solventes mais comuns usados em reações catalisadas por lipases são: benzeno, tolueno, n-hexano, ciclohexano, n-octano, iso-octano, nonano entre outros.

Os estudos realizados sobre a influência dos solventes na velocidade da reação enzimática estão fortemente ligados ao efeito da polaridade do meio orgânico. Cada resultado segue o consenso que a alta atividade biocatalítica está relacionada a solventes hidrofóbicos e a baixa atividade a solventes hidrolíticos. Muitas maneiras diferentes têm sido descritas na literatura para quantificar a hidrofobicidade do solvente (BOSSI, 2004), sendo que Log P apresenta a melhor correlação com a atividade enzimática. Dessa maneira, o Log P, definido como logaritmo de partição em um sistema bifásico padrão octanol/água foi introduzido como uma medida da polaridade do solvente (BARROS, 2002) como mostra a Tabela 3, a seguir.

TABELA 3 – Valores do coeficiente de partição (Log P) de alguns solventes

SOLVENTE	LOG P	SOLVENTE	LOG P
Dimetil Sulfoxido	-1,30	Ácido Benzoico	1,90
Dioxano	-1,10	Éter Dipropílico	1,90
Metanol	-0,76	Clorofórmio	2,00
Acetonitrila	-0,33	Benzeno	2,00
Etanol	-0,24	Heptanol	2,40
Acetona	-0,23	Tolueno	2,50
Acetato de Etila	0,16	Estireno	3,00
Propanol	0,28	Xileno	3,10
Tetrahidrofurano	0,49	Hexano	3,50
Butanol	0,80	Decanol	4,00
Éter Dietílico	0,85	Heptano	4,00
Ciclo Hexanona	0,96	Octano	4,50
Hexanona	1,30	Dodecanol	5,00
Pentanol	1,30	Ftalato de Dibutil	5,00
Fenol	1,50	Undecano	6,10
Ciclohexanol	1,50	Tetradecano	7,60
Trietilamina	1,60	Hexadecano	8,80
Hexanol	1,80	Oleato de Butila	9,80

FONTE: BOSSI Liliun K.F. **Aplicação da lipase de *Rhizopus oryzae* na síntese de ésteres com propriedades de aromas, derivados do ácido butírico** – 2004. Blumenau, p. 16.

Para Lima e Angnes (1999), geralmente a atividade enzimática é baixa em solventes relativamente hidrofílicos que apresentam $\text{Log P} < 2$, é moderada em solventes tendo Log P entre 2 e 4 e é alta em solventes apolares, onde $\text{Log P} > 4$.

1.6.5 Biossurfactantes produzidos por microorganismos

Muitos tipos de biossurfactantes têm sido isolados e caracterizados, incluindo, glicolipídeos, fosfolipídeos, lipídeos neutros, ácidos graxos, peptidolipídicos. Alguns microorganismos capazes de produzir biossurfactantes e a estrutura correlacionada podem ser observados na Tabela 4 (BANAT, 1995).

TABELA 4 - Alguns biossurfactantes produzidos por microorganismos

Microorganismos	Biossurfactantes	Referência
<i>Arthrobacter</i> MIS38	Lipopeptídeo	Morikawa <i>et al.</i> (1993)
<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2	Lipopeptídeo	McInerney <i>et al.</i> (1990)
<i>Bacillus licheniformis</i> 86	Lipopeptídeo	Horowitz <i>et al.</i> (1990)
<i>Bacillus pumilus</i> A1	Surfactina	Morikawa <i>et al.</i> (1992)
<i>Bacillus sp.</i> AB-2	Ramnolipídeos	Banat (1993)
<i>Candida antarctica</i>	Lipídeo manosilertritol	Kitamoto <i>et al.</i> (1992)
<i>Corynebacterim insidisum</i>	Fosfolipídeos	Akit <i>et al.</i> (1981)
Strain MM1	Glicose, lipídeo e ácidos hidroxí decanóico	Passeri (1992)
<i>Nocardia erythropoli</i>	Lipídeos neutros	MacDonald <i>et al.</i> (1981)
<i>Ochrobactrum anthropii</i>	Proteína	Wasko and Bratt (1990)
<i>Penicillium spiculisporum</i>	Ácido spiculospórico	Ban and Sato (1993)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeo	Neu <i>et al.</i> (1990)
<i>Rhodococcus sp.</i> ST-5	Glicolipídeo	Abu-Ruwaida <i>et al.</i> (1991a)
<i>Rhodococcus sp.</i> 33	Polissacarídeo	Neu <i>et al.</i> (1992)

FONTE: BANAT, I.M; **Biosurfactants production and applications: a review**, v. 51,1995. p. 2.

1.7 Crisotila como suporte para a imobilização de biocatalisadores

Matéria prima de baixo custo e abundante no Brasil, a crisotila, uma das principais fontes de asbesto, surge como um novo suporte de biocatalisadores. É maciçamente usada na construção civil, nas indústrias de confecção de roupas e de bebidas, e tem se mostrado um excelente adsorvedor devido à uniformidade estrutural em suas fibras (JESUS, 1998, NASCIMENTO *et al.* 1996).

A crisotila é um silicato magnésiano hidratado do grupo das serpentinas, apresentado como fórmula molecular $Mg_3(Si_2O_5)(OH)_4$, que possui 43% de MgO, 44,1% de SiO₂, 12,9% de H₂O (JESUS, 1998). A Figura 7 mostra um modelo para a estrutura da crisotila (PARIZOTO, 1995).

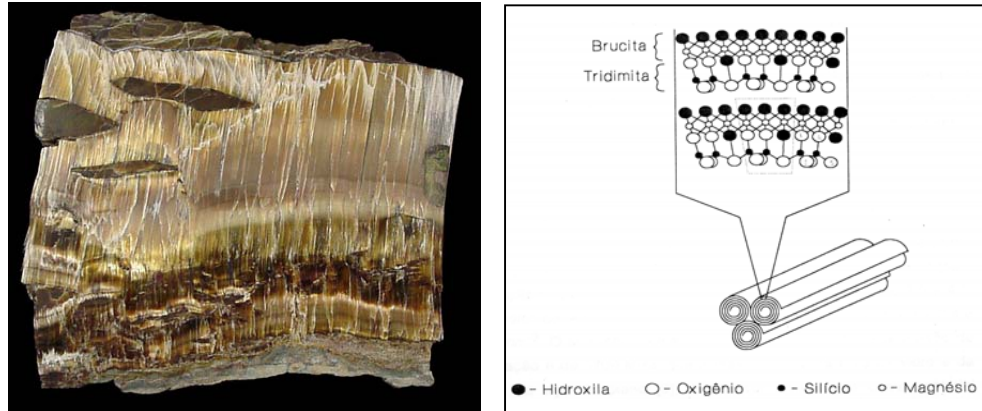


FIGURA 7 - Estrutura da crisotila

FONTE: WENDEHAUSEN, Renato. Jr. **Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae* para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções**. 1998. Campinas. p. 20.

A estrutura da crisotila consiste de uma camada de sílica tetraédrica que é coberta com uma camada de hidróxido de magnésio (brucita), a qual é ligada a camada de sílica por dois dos três grupos MgO (JESUS, 1998; WENDHAUSEN, *et al.* 2005).

Atualmente vem-se estudando a utilização da crisotila como um novo suporte para adsorção de proteínas, analisando os possíveis efeitos biológicos induzidos por essas fibras (JESUS, 1998, 2003).

A crisotila natural ativada serviu como suporte de células provindas de fermento de pão comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* de linhagens isoladas, para utilização em processos de fermentação alcoólica, (WENDHAUSEN, *et al.* 2001), para a obtenção de álcoois quirais com elevado excesso enantiomérico (WENDHAUSEN, 1998), para empacotamento de reatores no processo de obtenção de fármacos (WENDHAUSEN, *et al.* 2002, 2005).

1.8 Justificativa do trabalho

Nos últimos dez anos, os biossurfactantes têm despertado grande interesse pela indústria devido a sua vasta aplicabilidade nos mais variados setores industriais. Esses biossurfactantes, entre eles ésteres de açúcar, constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, cuja preparação pela ação enzimática, principalmente as lipases, sobre as moléculas hidrofóbicas, promoveu um novo direcionamento na produção de compostos como, hidratantes em cremes faciais e cabelo e, principalmente, para utilização em produtos de higiene e cosméticos.

As propriedades comuns à maioria dos biossurfactantes são: emulsificantes e dispersantes, solubilizantes, agentes espumantes, molhantes e penetrantes. Além disso, não são derivados do petróleo, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas dos surfactantes sintéticos o que os torna comparáveis ou superiores em termos de eficiência, podendo ser utilizados em uma gama de aplicações industriais. Entretanto, ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros.

Sendo uma matéria-prima de fonte renovável e de baixo custo, a sacarose vem despertando um crescente interesse como reagente na síntese de surfactantes não-iônicos, polímeros, adoçantes, emulsificantes, entre outros.

Um indicador do potencial tecnológico da sacarose como substrato é o elevado número de patentes de aplicações somente para os ésteres de sacarose, contrastado com os poucos artigos científicos publicados com o tema.

O açúcar de cana tem grande importância na economia nacional, mas observa-se que são poucas as pesquisas feitas por pesquisadores brasileiros. Este pode ser o caminho para a geração de uma promissora atividade agro-industrial com novas perspectivas para os profissionais na área de química.

Diante desses fatores, buscou-se a obtenção de ésteres derivados de açúcar com atividade biossurfactante, avaliando o efeito de diferentes cadeias hidrocarbônicas de ácidos, bem como diferentes substratos e diferentes enzimas imobilizadas ou não em crisotila.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Explorar a obtenção de ésteres derivados de carboidratos na obtenção de compostos com propriedades surfactantes, utilizando diferentes lipases imobilizadas.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a imobilização de diferentes lipases em crisotila, verificando a porcentagem de enzimas retidas neste suporte;
- aplicar as enzimas imobilizadas na obtenção de ésteres derivados de açúcar com atividade surfactante;
- avaliar o efeito de diferentes cadeias hidrocarbônicas de ácidos, bem como diferentes carboidratos na obtenção dos biossurfactantes;
- determinar as melhores condições de reação e reprodutividade dos resultados;
- comparar este método de obtenção de biossurfactantes com outros métodos já explorados na literatura.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais e equipamentos

As enzimas utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram a lipase Amano 10 (*Mucor javanicus*) com atividade específica de 10.000 u/g de sólido, a lipase AY Amano 30 (*Candida rugosa*), com atividade específica de 30.000 u/g de sólido, a lipase A Amano 12 (*Aspergillus niger*) com 12.000 u/g de sólido e a lipase F-AP 15 (*Rhizopus oryzae*) com atividade específica de 150.000 u/g de sólido, de procedência da Amano Enzyme USA Co, (*Candida antarctica*)435 do Tipo B, de procedência da Novozyme, imobilizada em resina acrílica (*Thermomyces lanuginosus*), de procedência da Novo Nordisk.

Os carboidratos utilizados foram sacarose, lactose, glicose e frutose de procedência da Vetec, e glucosamina de procedência da Fluka e os ácidos octanóico, decanóico e láurico também foram de procedência da Fluka. Os solventes, hexano, terc-butanol, dimetilsufóxido (DMSO), piridina e acetato de etila de procedência da Vetec. A crisotila tipo 5RL foi de procedência da Mineradora Sama (Goiás), sonicada em equipamento de ultrassom 25 Mz da marca Odontobras modelo 2840 DA. Os espectros de IV foram feitos utilizando um espectrofotômetro IR-prestige-21 da Shimadzu. As reações foram realizadas em uma incubadora termostatizada com agitação orbital TE-420 da Tecnal, e as leituras de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro Cary 50 Bio da Varian.

A Tabela 5 mostra as enzimas que foram utilizadas nas formas livres e imobilizadas em crisotila, os reagentes e os solventes e as enzimas fornecidas imobilizadas pelo fabricante, com os carboidratos e ácidos testados.

TABELA 5 – Enzimas, reagentes e solventes utilizados nos experimentos.

Lipases	Carboidratos	Ácidos	Solventes
<i>Rhizopus oryzae</i> ^(a)	Sacarose	Láurico(dodecanóico)	Hexano
<i>Aspergillus niger</i> ^(a)	Lactose	Caprílico(octanóico)	DMSO
<i>Mucor javanicus</i> ^(a)	Frutose	Cáprico (Decanóico)	Álcool terc-butílico
<i>Cândida rugosa</i> ^(a)	Glicose		Álcool etílico
<i>Cândida antarctica</i> ^(b)	Glucosamina		
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ^(b)			

(a)imobilizada em crisotila; (b) adquirida imobilizada pelo fabricante.

FONTE: Dados primários (2004)

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo e ativação da crisotila

A crisotila, como é vendida comercialmente, apresenta-se com uma certa quantidade de pó de rocha aderido às fibras, bem como pó de fibra, ocupando completamente os sítios superficiais. O processo de purificação e fibrilização para a crisotila têm a finalidade de eliminar essas impurezas e aumentar a superfície livre para adsorção das enzimas. O tratamento dado a crisotila bruta seguiu a metodologia empregada por Nascimento *et al* (1996), ou seja, a crisotila bruta foi colocada em uma peneira e lavada com jatos de água até a água sair com aparência límpida. Logo em seguida, ela foi colocada em um recipiente com tampão fosfato (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , a 0,1 M) em pH 7,0 e sonicada por aproximadamente 45 minutos, filtrada a vácuo e seca em estufa a 100° C por 24 horas (Figura 8).

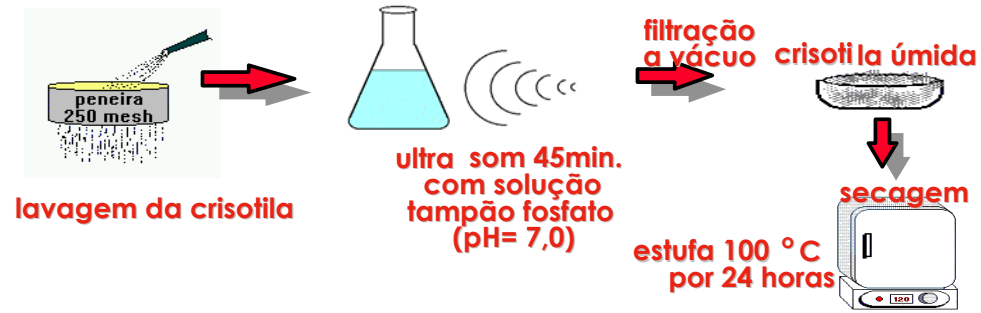


FIGURA 8 - Preparação da crisotila.

FONTE: BOSSI Liliun K.F. *Aplicação da lipase de *Rhizopus oryzae* na síntese de ésteres com propriedades de aromas, derivados do ácido butírico* – 2004. Blumenau, p. 23.

3.2.2 Imobilização das enzimas

Para o processo de imobilização das enzimas, foram colocados 1g de crisotila e 200 mg de uma das lipases em um erlenmeyer de 125 e adicionados 100 mL de tampão fosfato pH 7,0. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 24h a 37 °C. O complexo crisotila/enzimas formado foi filtrado e a quantidade de enzimas adsorvidas foi determinada por espectroscopia de UV-visível, com leitura da absorbância da solução remanescente no comprimento de onda da enzima em estudo.

3.2.3 Preparo do meio reacional

As reações foram realizadas em uma mistura de solventes orgânicos contendo terc-butanol/DMSO na proporção de 10% de DMSO [(CH₃)₂SO], sendo que o DMSO foi adicionado ao meio devido a baixa solubilidade dos carboidratos em solventes pouco polares. Por outro lado, os solventes muito polares tendem a desnaturar as enzimas e não podem ser adicionadas em quantidades superiores a 20%. Os carboidratos foram adicionados inicialmente ao DMSO e então submetidos a um campo de ultra-som de 25 Mz por 1 hora. As enzimas na forma livre ou imobilizadas foram colocadas em um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL da mistura de solventes e 200 mg de enzima, segundo Figura 11. Os

substratos foram adicionados em quantidades equimolares utilizando 0,01 mol de substratos ácido e carboidratos (1:1), e o sistema foi mantido a 37 °C e 150 RPM.

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (ccd), utilizando misturas de eluentes como hexano: acetato de etila (15:1), (1:20), (50:50), hexano: diclorometano (50:50) e hexano: etanol (90:10). Os produtos foram isolados por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 60 (70-230 *mesh*), utilizando sílica para cromatografia em camada delgada em sistema de vácuo.

Na verificação da influência do suporte, as reações foram realizadas nas mesmas condições experimentais, utilizando crisotila na ausência de enzimas.

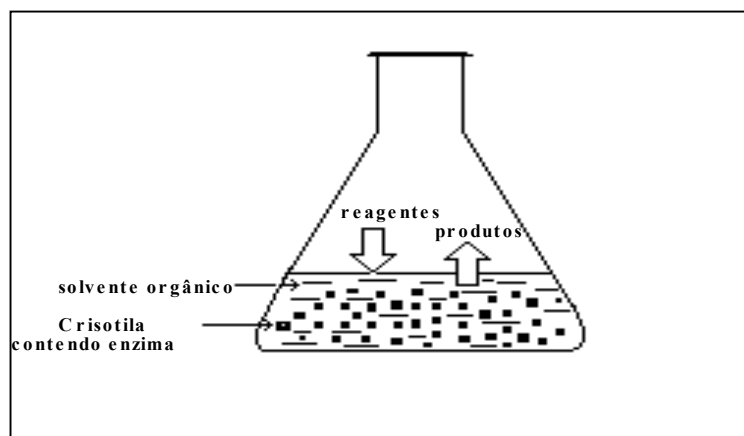


FIGURA 9 - Sistema utilizado para realizar as reações.

FONTE: JESUS, Paulo C. **Enzimas imobilizadas em crisotila e organo-gel:** aplicação na resolução de ácidos racêmicos. 1998. Florianópolis, p.40.

As lipases de *Candida antarctica* e *Thermomyces lanuginosus*, já imobilizadas pelo fabricante, foram adicionadas ao meio reacional, perfazendo um total de 50 mL de solvente orgânico. Foram preparados diferentes meios reacionais, utilizando o álcool terc-butílico como solvente principal e um cossolvente com uma maior polaridade como o DMSO, DMF, piridina, entre outros, na proporção de 10%.

As reações foram realizadas com os substratos em quantidades equimolares, utilizando 0,01 mol de substrato ácido e carboidratos ou derivados de carboidratos a (37°C). Os carboidratos foram inicialmente dissolvidos no cossolvente e submetidos a sonicação por

30 minutos para aumentar a solubilização dos mesmos antes de serem adicionados ao solvente principal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente foram preparados os biocatalisadores para serem utilizados nas reações de acilação de sacarídeos. Geralmente os biocatalisadores para serem utilizados em meio orgânico são previamente imobilizados ou devem ser preparados pelo uso de algum suporte que tenha esta propriedade. Algumas lipases como as de *Candida antarctica* e *Thermomyces lanuginosa* que foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram adquiridas comercialmente imobilizadas. As demais lipases (lipase de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* e *Mucor javanicus*) foram imobilizadas em crisotila.

Os estudos de imobilização de lipases em crisotila como suporte para a imobilização de biocatalisadores e posterior aplicação em meio orgânico, tem sido bem documentada (WENDEHAUSEN, *et al.* 2005; SILVA, *et al.* 2003; COMERLATO, 1995).

A adsorção das lipases na crisotila foi verificada através de leituras da absorvância da água-mãe, no comprimento de onda máximo das enzimas, conforme Tabela.

TABELA 6 - Comprimento de onda máximo das enzimas, na água mãe.

LIPASES	λ MÁXIMO (nm)
<i>Candida rugosa</i>	280,0
<i>Aspergillus niger</i>	275,0
<i>Rhizopus oryzae</i>	276,0
<i>Mucor javanicus</i>	265,0

FONTE: Dados primários (2004)

Previamente, foi construída uma curva de calibração e então se interpolou a absorvância obtida nas leituras, determinando-se a quantidade de enzima adsorvida. O percentual de adsorção ficou em 23% para a lipase de *Mucor Javanicus* (46 mg/g de suporte), 26% para a lipase de *Rhizopus oryzae* (52 mg/g de suporte) e 40% para a lipase de *Candida rugosa* (80 mg/g de suporte). Para a lipase de *Aspergillus niger* não foi observada a adsorção.

Em outros trabalhos, foi verificado que a adsorção das diferentes lipases na crisotila chegou a percentuais maiores (BOSSI, 2004). Devido a essa baixa adsorção, o processo de imobilização foi repetido várias vezes, com especial atenção na purificação da crisotila e a preparação do tampão-fosfato pH 7,0. Mesmo assim, os percentuais continuaram baixos.

A adsorção resulta de interações favoravelmente energéticas entre o adsorvente e o adsorbato, é muitas vezes um processo complexo visto que ela pode ser influenciada pelo sólido, solvente e componentes do soluto do sistema. Várias interações tais como atração eletrostática, ligação covalente, ligação de hidrogênio ou interações não polares entre o adsorvente e as espécies adsorbato e interações laterais entre espécies adsorvidas, bem como sua desolvatação podem contribuir para os processos de adsorção e dessorção.

O complexo formado crisotila/enzimas contendo as lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* e *Rhizopus oryzae*, foi utilizado no estudo da acilação de diferentes carboidratos. Para uma melhor discussão, os estudos para a obtenção dos ésteres de carboidratos foram separados por classe estrutural, a saber: **a)** Estudo da produção de ésteres de carboidratos a partir de diferentes monossacarídeos; **b)** Estudo da produção de ésteres de carboidratos a partir de diferentes dissacarídeos.

4.1 Estudo da produção de ésteres de carboidratos a partir de diferentes monossacarídeos.

As lipases de *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* e *Candida rugosa* na forma livre e imobilizadas em crisotila foram testadas com os monossacarídeos

glicose, frutose e glucosamina com os ácidos láurico, decanóico e octanóico. A estrutura dos monossacarídeos encontra-se na Figura 10.

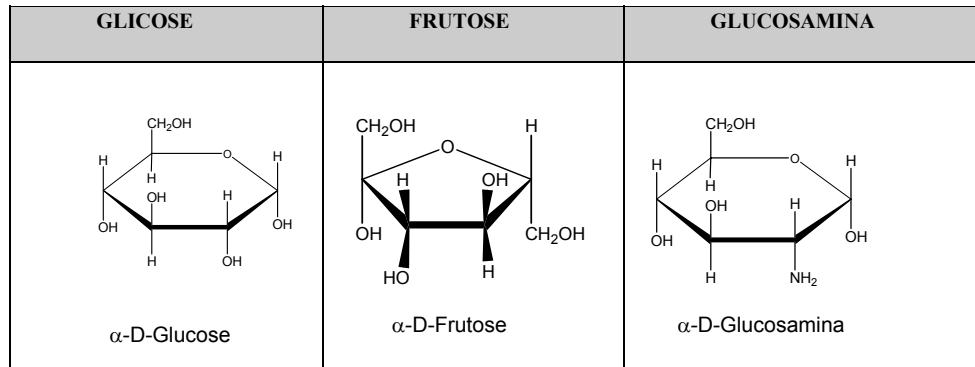


FIGURA 10 – Estrutura dos Monossacarídeos

FONTE: Dados primários (2004)

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada. Variaram-se os eluentes, em diferentes concentrações utilizando os solventes, hexano e acetato de etila nas proporções de (50:50), (15:1), (20:1), acetato de etila e álcool etílico (9:1), diclorometano e hexano (50:50), sendo que o melhor desempenho foi encontrado para a mistura hexano e acetato de etila (50:50).

Com relação à mistura do solvente, optou-se por uma porcentagem de 10% (de dimetilsufóxido (DMSO) como co-solvente e álcool terc-butílico como solvente principal), seguindo o resultado encontrado na literatura, para variações entre 5 e 20%, tendo em vista uma melhor solubilização dos carboidratos nessa porcentagem.

As reações foram mantidas por períodos variados de até 30 dias. Não foi observada a formação de éster para nenhum dos casos testados por cromatografia em camada delgada bem como os espectros de infravermelho, que mostravam sempre apenas a presença do ácido ou carboidrato.

De maneira geral, as lipases de *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* e *Aspergillus niger* quando imobilizadas em crisotila e livres, não se mostraram eficientes para a acilação dos monossacarídeos testados.

Com a ausência de resultados positivos para as lipases acima citadas foram utilizadas outras enzimas previamente imobilizadas. Segundo Plou (2002), *Candida antarctica* e de *Thermomyces lanuginosas* fornecidas imobilizadas pelo fabricante produzem ésteres de carboidratos na presença de DMSO nas porcentagens de 5% e 20%.

Buscou-se obter ésteres dos monossacarídeos, na presença de DMSO e alternativamente utilizou-se piridina no lugar do DMSO, mantendo-se a porcentagem de 10% desses solventes. Foram obtidos resultados positivos para a reação de esterificação, utilizando ácido láurico com frutose e *Candida antarctica*, sendo que os resultados estão mostrados na Tabela 7. Não foi observado resultado positivo para a reação com lipases de *Thermomyces lanuginosas*.

TABELA 7 – Rendimento do laurato de frutose, catalisado pela lipase de *Candida antarctica* ^(a).

SUBSTRATO (0,01M)	SOLVENTE	ÉSTER	RENDIMENTO (%) ^(b)
Frutose	DMSO	Laurato de frutose	16,00

(a) condições: ácido láurico 0,01 M, solvente terc-butanol e DMSO, 7 dias de reação.

(b) rendimento determinado por gravimetria.

FONTE: Dados primários (2004)

O rendimento do éster foi calculado pela massa obtida após sua separação por cromatografia em coluna. A caracterização do éster obtido foi realizada através de análise de espectroscópica no IV (infravermelho). A Figura 11 mostra o espectro de IV para o laurato de frutose obtido em DMSO. Pode-se observar a banda de deformação axial característica de carbonila de éster em $1743,72\text{ cm}^{-1}$. Entre 2900 e 3000 cm^{-1} observa-se a deformação axial de C-H alifático, sendo que, em 1400 cm^{-1} aparece a banda de deformação angular de CH_2 . Em

1250 cm^{-1} aparece a banda de deformação axial de C-C(=O)-O e em 1100 cm^{-1} a banda de deformação axial assimétrica de O-C-C.

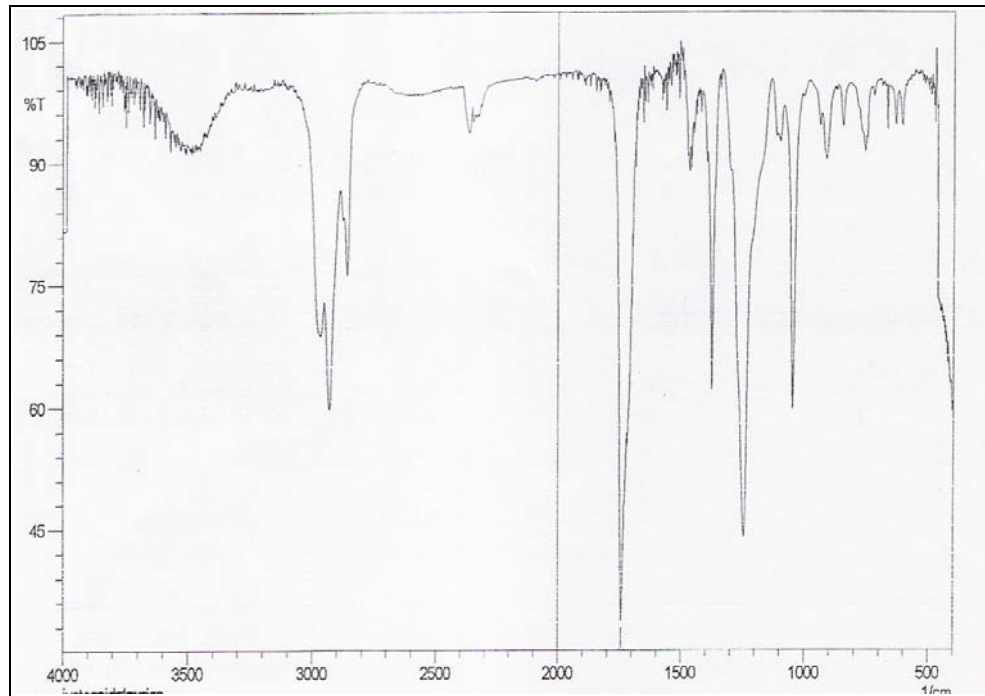


FIGURA 11 – Espectro no IV do laurato de frutose em filme DMSO.
 FONTE: Dados primários (2004)

4.2 Estudo da produção de ésteres de carboidratos a partir de diferentes dissacarídeos

Como dissacarídeos foram utilizados os compostos de sacarose e lactose. A sacarose é formada por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose, ligadas através de uma ligação glicosídica tendo as hidroxilas disponíveis nas posições 2, 3, 4 e 6 na molécula de glicose e nas posições 1', 3', 4' e 6' na unidade de frutose. Portanto, a questão é em qual posição da sacarose ela irá ocorrer. Para a lactose, esse dissacarídeo é formado por duas unidades de glicose, tendo as hidroxilas disponíveis nas posições 2, 3, 4 e 6 no anel 1 e nas posições 1', 2', 3', e 6' no anel 2. As estruturas dos dissacarídeos encontram-se na Figura 12.

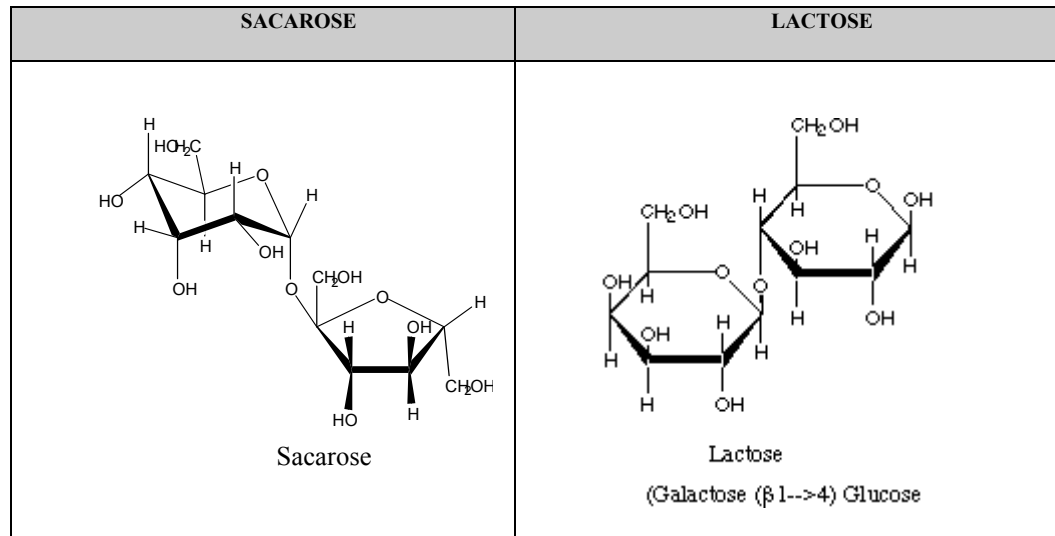


FIGURA 12 – Estrutura dos dissacarídeos

FONTE: Dados primários (2004)

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada como já mencionado para os monossacarídeos e foram feitas também variações nas proporções da mistura solvente álcool terc-butilico/ DMSO.

As lipases, carboidratos e ácidos testados encontram-se na Tabela 8. De maneira geral as lipases de *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* e *Aspergillus niger* imobilizadas em crisotilas livres não se mostraram eficientes para a acilação dos dissacarídeos testados.

TABELA 8 - Carboidratos, ácidos alifáticos e enzimas utilizadas na acilação de dissacarídeos

LIPASE	CARBOIDRATOS	ÁCIDO
<i>Rhizopus oryzae</i>	sacarose lactose	láurico caprílico
<i>Aspergillus niger</i>	sacarose	láurico
<i>Mucor javanicus</i>	sacarose	láurico
<i>Candida rugosa</i>	sacarose sacarose sacarose lactose lactose	láurico decanóico caprílico caprílico láurico

FONTE: Dados primários (2004)

A Figura 13 mostra o espectro de infravermelho obtido para o estudo da acilação de sacarose com ácido láurico, utilizando-se lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada em crisotila, no qual podemos observar uma banda larga de deformação axial de O-H em 3400 cm^{-1} , deformação axial de C-H entre 2856 a 2974 cm^{-1} e não se observou a banda de deformação axial de carbonila de éster que deveria aparecer entre 1730 a 1740 cm^{-1}

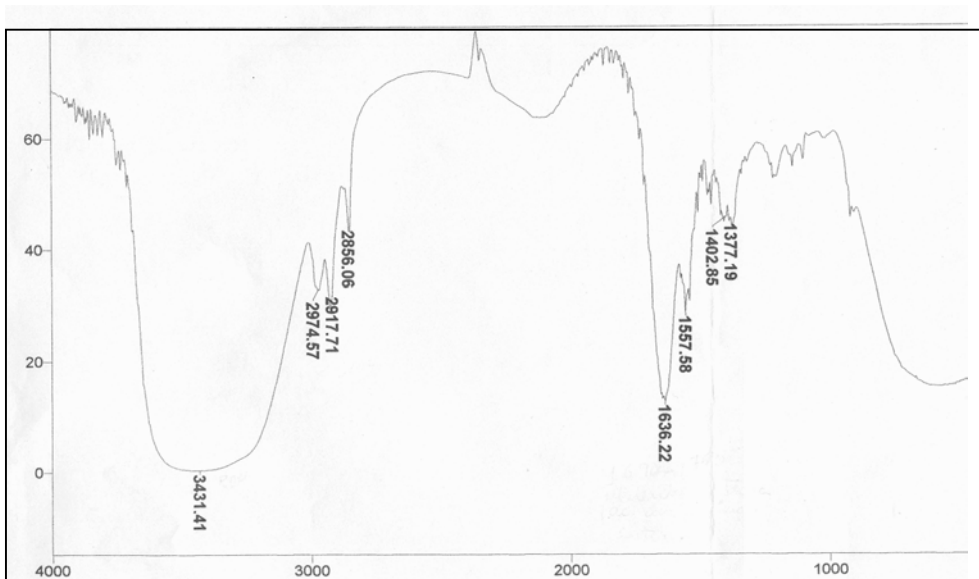


FIGURA 13 - Espectro do meio reacional de sacarose, ácido láurico, DMSO, álcool terc-butílico, crisotila e lipase de *Candida rugosa*.
 FONTE: Dados primários (2004)

Com a ausência de resultados positivos para as lipases acima citadas, testamos as lipases de *Candida antarctica* e de *Thermomyces lanuginosus* na presença de DMSO e alternativamente utilizou-se piridina no lugar do DMSO, com a porcentagem de 10% desses solventes. Foram obtidos resultados positivos para as reações de esterificação, utilizando ácido láurico, sacarose e lactose, os resultados estão mostrados na Tabela 9.

TABELA 9 - Ésteres formados e rendimentos, obtidos com a lipase de *Candida antarctica*, utilizando-se ácido láurico (0,01 M).

CARBOIDRATO (0,01 M)	ÉSTER FORMADO	SOLVENTE	RENDIMENTO (%) ^(a)
Sacarose	Laurato de sacarose	Piridina	20,0
Sacarose	Laurato de sacarose	DMSO	22,2
Lactose	Laurato de lactose	DMSO	12,5

(a) Rendimento determinado por gravimetria.

FONTE: Dados primários (2004)

O rendimento dos ésteres foi calculado pela massa obtida após sua separação por cromatografia em coluna. A caracterização dos ésteres obtidos foi realizada através de análises espectroscópicas no IV (infravermelho). As Figuras 14 e 15 mostram os espectros de IV dos ésteres formados.

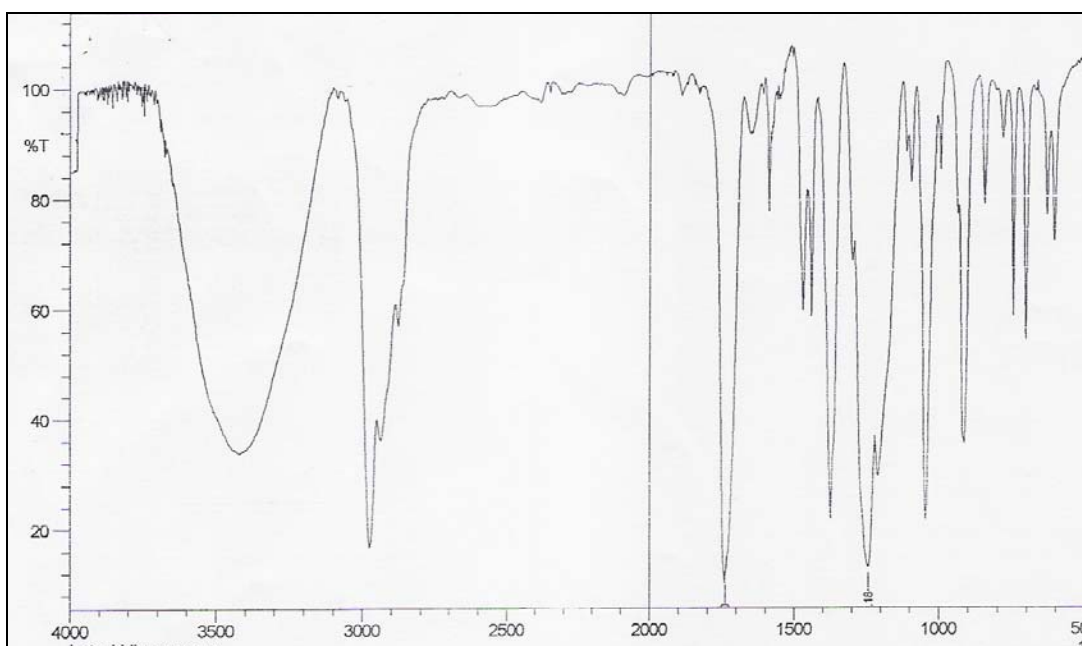


FIGURA 14 – Espectro de IV do laurato de sacarose em piridina.

FONTE: Dados primários (2004)

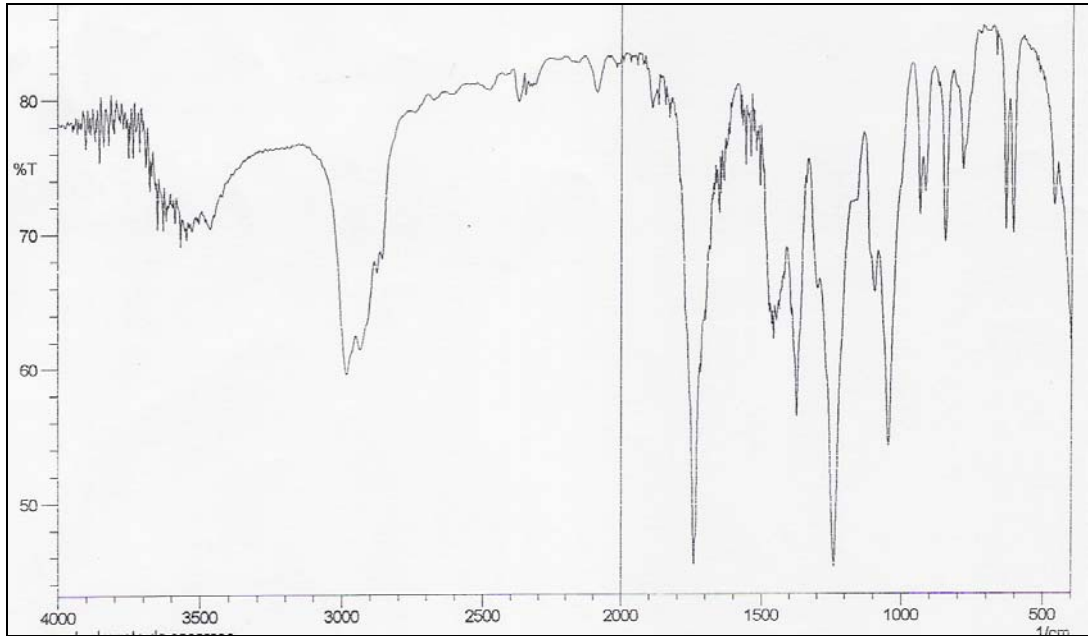


FIGURA 15 – Espectro de IV do laurato de sacarose em DMSO.
 FONTE: Dados primários (2004)

A figura 14, mostra o espectro de IV para o laurato de sacarose obtido em piridina. Pode-se observar a banda de deformação axial característica de carbonila de éster em $1738,90\text{ cm}^{-1}$. Entre 2900 e 3000 cm^{-1} observa-se a deformação axial de C-H alifático, sendo que, em 1400 cm^{-1} aparece a banda de deformação angular de CH_2 . Em 1200 cm^{-1} aparece a banda de deformação axial de C-C(=O)-O e em 1060 cm^{-1} a banda de deformação axial assimétrica de O-C-C. Em 3400 cm^{-1} podemos observar a banda de deformação axial de O-H ligado a cadeia alifática proveniente das hidroxilas da sacarose. Espectro similar foi observado na figura 15, apresentando uma banda em 3500 cm^{-1} não muito bem definida para deformação axial de O-H.

Em todos os espectros pode-se observar a banda característica de carbonila de éster. A Tabela 10 mostra os valores da banda da carbonila para cada éster obtido.

TABELA 10 - Espectro das bandas de carbonila dos ésteres obtidos

ÉSTER FORMADO	BANDA DA CARBONILA DE ÉSTER (cm⁻¹).
Laurato de sacarose (DMSO)	1739.79
Laurato de sacarose (piridina)	1738.90
Laurato de lactose (DMSO)	1743.72

FONTE: Dados primários (2004)

Com relação ao tamanho da cadeia carbônica, foram observados resultados positivos apenas para os ésteres com cadeias de pelo menos 12 átomos de carbonos. Esse fato foi documentado na literatura por Plou (2002), da influência a partir no aumento da cadeia dos ácidos de 12 e 18 átomos de carbono, na preparação de biossurfactantes.

O fato da molécula de glicose não ter sido acilada, sugere que a acilação da sacarose ocorre apenas na porção frutose. Dados de RMN de ¹H e de cromatografia, portanto, seriam necessários para confirmar essa sugestão.

Observando quimicamente a molécula de sacarose, Figura 16 os carbonos mais suscetíveis à acilação ocorrem nas posições 6 da glicose 1' e 6' da frutose, o que daria origem aos compostos 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Porém, de acordo com a literatura e considerando que a monoacilação ocorreu apenas com a frutose utilizando o ácido láurico catalisado pela lipase de *Candida antarctica*, as estruturas 4, 5 e 6 poderiam ser as possíveis.

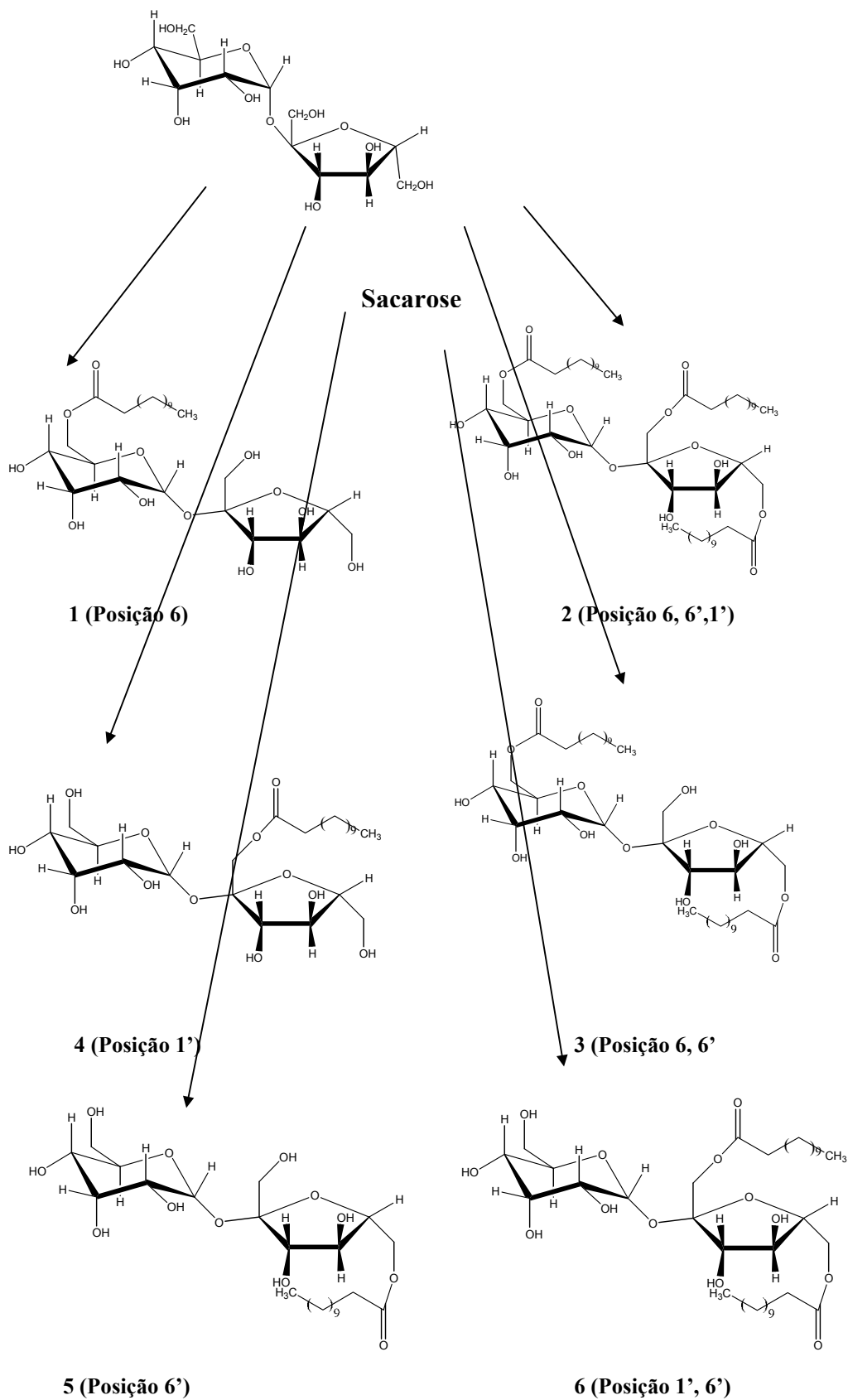


FIGURA 16 - Estruturas possíveis para a acilação enzimática da sacarose
 FONTE: Dados primários (2004)

Devido a glicose não ter sido acilada, sugerimos que a acilação da sacarose pode ter ocorrido na porção frutose da molécula, com esta observação sugerimos que seja a estrutura 4, seja a de maior probabilidade de se ter obtido.

Porém dados de RMN de H^1 e cromatografia gasosa serão necessárias para a afirmar estas suposições.

5 CONCLUSÕES

Com relação ao estudo da imobilização das lipases em crisotila, foi alcançada uma porcentagem de 20 a 40%, de adsorção, que, comparado com a literatura, pode-se considerar uma adsorção não eficiente.

Apesar da baixa eficiência da crisotila em imobilizar as lipases, estas foram utilizadas, na obtenção de ésteres derivados de açúcares. Não se obteve resultados positivos para acilação dos carboidratos testados, o que pode ser visualizado na Figura 13. No entanto, essas mesmas enzimas foram utilizadas na forma não imobilizada, apresentando os mesmos resultados, permitindo-se desconsiderar qualquer influência da crisotila nessas reações.

O solvente DMSO (dimetilsulfóxido) e piridina foram usados na porcentagem de 10% para todas as reações e em ambos caracterizou-se a formação de éster. Apesar de a piridina ser citada na literatura por desnaturar mais as enzimas, não se observou uma diferença no rendimento utilizando-se DMSO.

As melhores condições para a obtenção dos ésteres foram observadas para ácidos com cadeia igual a 12 átomos de carbono com a utilização da lipase de *Candida antarctica* 435 do tipo B.

Com relação aos carboidratos utilizados, foram observados resultados positivos para o monossacarídeo de frutose (IV com banda característica de éster em $1743,72\text{ cm}^{-1}$). Já para os dissacarídeos, foi observada a formação de éster para a lactose (IV com banda característica de éster em $1743,72\text{ cm}^{-1}$), e sacarose (IV com banda característica de éster em $1739,79\text{ cm}^{-1}$ e $1738,90\text{ cm}^{-1}$).

O fato de a glicose não ter sido acilada, sugere que a acilação da sacarose pode ter ocorrido na porção frutose da molécula.

Com relação às posições de acilação, sugere-se que tenha se formado uma mistura de mono e diésteres, tendo como base a porcentagem de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO),

que segundo a literatura, situa-se nos extremos 5% para di e 20% para monoéster. Porém dados de RMN de ^1H e cromatografia gasosa serão necessários posteriormente para afirmar estas suposições.

5.1 Publicações originadas deste trabalho

Síntese de Ésteres derivados de Carboidratos com propriedades Surfactantes utilizando Lipases Imobilizadas. 28^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

Synthesis of Sucrose Derived Esters Using Immobilized Lipases. 11^o BMOS – Brazilian Meeting on Organic Synthesis. De 29/08 a 02/09/2005.

BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, Glaci Neusa de. **Adaptação de suportes para imobilização enzimática**. Blumenau, 1992. Monografia (Bacharel em Química). Universidade Regional de Blumenau.

BALLESTEROS, Antonio; PLOU, Francisco J.; FERRER, Manuel; NUERO, Oscar, M.; REVES, Fuensanta. Purification and properties of a lipase from *penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. 75, 2000, p. 569-576.

BANAT, I.M. **Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review**, bioresource technology, n. 51, 1995. p. 1-12.

BARROS, Maria R.A. **Biocatálise em Solventes Orgânicos**. Ensino em Biotecnologia. Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. n. 72, 2002. p. 22-29.

BOSCOLO, M., **Sucroquímica: síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose**. Química Nova, n. 26, 2003. p. 906-912.

BOSSI Liliun K.F. **Aplicação da lipase de *Rhizopus oryzae* na síntese de ésteres com propriedades de aromas, derivados do ácido butírico** – Blumenau, 2004. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Química, Universidade Regional de Blumenau.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia enzimática LIDEL** – Edições Técnicas, Lisboa PT, setembro 2003, p. 121-140.

CHARTRAIN, M.; GREASHAM, R.; MOORE, J.; REIDER P.; ROBSON, D.; BUCKLAND, B. Asymetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** n. 11, 2001. p. 503–512.

COMERLATO, Maria Helena. **Imobilização de Enzimas no Suporte Crisotila**. Campinas, 1995. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Química, Universidade Estadual de Campinas.

COSTA, E.V.; MORIM, H.L.N. **O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente**. Química Nova, v. 22, n.6, 1999. p. 863-873.

CRUCES, Angeles; FERRER, Manuel; PLOU, Francisco; BERNABÉ, Manuel; BALLESTEROS, Antonio. **A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and *n*-dodecyl maltosides.** Tetrahedron, v. 56, 2000. p. 4053-4061.

DE CONTI, Roseli; RODRIGUES, José. A.R.; MORAN, Paulo. J.S. **Biocatálise:** avanços recentes. Química Nova, v. 24, n. 5, 2001. p. 672-675.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry.** 3. ed. Berlin: Springer Verlag, 1997. p. 160-187.

FEREIRA, João P.M. **Segredos da catálise enzimática.** Ensino em Biotecnologia. Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. n. 72, 2002. p. 22- 29.

FERRER, Manuel; COMELLES, Francisco; PLOU, Francisco J. ;CRUCES, Angeles .M.; FUENTES,Gloria; PARRA, Jose .L.; BALLESTEROS, Antonio. **Comparative surface activities of di- and trisaccharide fatty acid esters.** Langmuir, n.18, 2002. p. 667-673.

GBEKELOLUWA, Oguntimein B.; ERDMANN, Helmut; SCHMID, Rolf D. **Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents.** Biotechnology Letters. v.15, n.2, 1993.

GOVEIA, Ester. R.; LIMA, Danielle.P.A.; DUARTE, Maria.S.; LIMA,Gláucia M.S; ARAÚJO, Janete. M. **Bactéria produtoras de biossurfactantes.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n.30, 2003. p.1-39.

HANG, Y.D.; U, M. A. **Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssochlamys fulva*.** Biotechnology Letters. v. 17, 1995. p. 1081-1084.

JESUS, Paulo C. **Enzimas imobilizadas em crisotila e organo-gel:** aplicação na resolução de ácidos racêmicos. Florianópolis, 1998. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

JESUS, Paulo C.; JOÃO, Jair J.; SILVA, Pedro L. F. ; BURLIN, Giovani; NASCIMENTO, Maria G. **Organo-Gel:** um novo sistema para imobilização de lipases e suas aplicações orgânica. Química Nova, 20(6). 1997.

JESUS, Paulo C.; SILVA, J.E. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** 75 (2) 1-6, 2003.

JOÃO, Jair Juarez. **Estudos de reações de transesterificação com lipases imobilizadas e determinação de coeficiente de difusão de ésteres em organo-gel.** Florianópolis, 1999. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

KJELLIN, Mikael, U.R.; CLAEISSON, Per. M.; VULFSON, Evgeny N. **Studies of N-dodecylactobionamide, maltose 6'-O-dodecanoate, and octyl- β -glucoside with surface tension, surface force, and wetting techniques.** Langmuir, n. 17, 2001. p. 1941-1949.

LIMA, Antônio W.O.; ANGNES, Lúcio. **Biocatálise em meio aquoso restrito: fundamentos e aplicações em Química Analítica.** Química Nova, v. 22, n. 2, 1999. p. 229-245.

MATSUMOTO, Michiaki; KIDA, Koji; KONDO, Kazuo. Effects of polyols and organic solvents on thermostability of lipase. **Journal Chemical Technol. Biotechnol.** v. 70, 1997. p. 188-192.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica.** 11. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1994.

MURRAY, Brent S.; SARNEY, Douglas B.; CAROFALAKIS, Gorgias. Surface activity and critical aggregation concentration of sugar esters with different sugar headgroups. **Journal of Colloid and Interface Science.** n. 229, 2000. p. 391-398.

MUTUA, Lydia N; AKOH, Casimir C. **Synthesis of alkyl glucoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida sp*-lipase.** JAOCS, v. 70, n.1, 1993.

NASCIMENTO, Maria G.; LIMA, Carmen; SILVA, PedroL.F.; REZENDE, Marcos C. The Use immobilized lipases on chrysolite for esterification reactions. **Journal Braz. Chem. Soc.,** v. 7, n. 3, 1996. p. 173-175.

NITSCHKE Márcia; PASTORE, Gláucia. M. **Biossurfactantes: propriedades e aplicações.** Química Nova, v. 25, 2002. p. 772.

OKABE, Sachiko; SUGANUMA, Masami; TAADA, Yukiko; MIZUTANI, Masaaki. Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents. **Journal J. Cancer Res.** n. 90, 1999. p. 669-675.

OOSTERTOM, Woudenberg-van; RANTWIJK, Fredvan; SHELDON, Roger. A. **Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase.** Biotechnology and Bioengineering, v. 49, 1995. p. 328-333.

OTTO, Ralf T.; BORNSCHEVER, Uwe T.; SYLDATK, Cristoph; SCHIMID, Rolf.D. **Synthesis of aromatic n-alkyl-glucoside esters in a coupled β -glucosidase and lipase reaction.** *Biotechnology Letters*, v. 20, n. 4, 1998. p. 437-440.

PARIZOTO Jr, **Crisotilas Brasileiras:** caracterização dos sítios ativos superficiais por cromatografia inversa, microscopia de força atômica e espectroscopia no infravermelho. Campinas, 1995. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Química, Universidade Estadual de Campinas.

PEDERSEN, Ninfa. R.; HALLING, Meter.J., WIMMER, Reinhard., MATTHIESEN, Rune., VELTMANN, Oene R., PEDERSEN, Lars H., **Efficient transesterification of sucrose catalysed by the metalloprotease thermolysin in dimethylsulfoxide.** *Federation of European Biochemical Societies Letters (FEBS)*, n. 519, 2002. p. 181-184.

PLOU, Francisco J.; FERRER, Manuel; SOLIVERI, Juan; NIEVES López-Cortés; DOLORES Reyes-Duarte, CHRISTENSEN, Morten; José L. COPA-PATIÑO; BALLESTEROS, Antonio. **Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Cândida antarctica B*, and their antimicrobial properties.** *Enzyme and Microbial Technology*. n. 36, 2005. p. 392-398.

PLOU, Francisco; CRUCES, Angeles; BERNABÉ, Manuel; BALLESTEROS, Antonio; PARRA, José L; MARTIN-LOMAS,M. Enzymatic synthesis of partially acylated sucroses. **Annals New York academy of sciences.** v. 750, 1995. p. 332-337.

PLOU, Francisco J.; CRUCES, Angeles; FERRER, Manuel; BERNABÉ, Manuel; BALLESTEROS, Antonio; FUENTES, Glória; PASTOR, Eitel; CHRISTENSEN, Morten; COMELLES, Francisco; PARRA, José.L. Review: ezymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. **Journal of Biotechnology**, n. 96, 2002. p. 55-66.

POLAT, Tulay; BAZIN. Hélène G; LINHARDT, Robert. J. **Enzime Catalyzed Regioselective.** *J.Carbohydrate Chemistry*, 16(9), 1997. p. 1319-1325.

RAMOS, Caroline; VECCHIA, Roberto D; RODRIGUES, Clóvis A. **Esterificação do ácido láurico catalisado por diferentes lipases frente à variação de temperatura, utilizando dois sistemas diferentes de proteção da enzima.** Livro de Resumos da 22^a. Reunião Anual da SBQ, QO-016. Poços de Caldas (MG), 1999.

REBELLO, A. M; VECCHIA, Roberto D.; RODRIGUES, Clóvis A..**Livro de Resumos da 22^a Reunião Anual da SBQ, QO-171, Poços de Caldas (MG), 1999.**

REIS, Martha. **Interatividade química: cidadania, participação e transformação**. São Paulo: FTD, 2003.

RHODE, Oliver; HILL, Karlheinz. **Sugar-based surfactants for consumer products and technical applications**. *Fett/Lipid* 101, n. 1, 1999. p. 25-33.

RICH, Joseph; BEDELL, Bruce. A.; DORDICK, Jonathan. S. **Controlling enzyme-catalysed regioselectivity in sugar ester synthesis**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 45, 1994.

SCHLOTTERBECK, Andrea; LANG, Siegmund; WRAY, Victor.; WAGNER, Fritz. **Lipase-catalyzed monoacylation of fructose**. *Biotechnology Letters*, v.15, n.1, 1993.

SCHMID, Roef. D.; VERGER, Robert. **Lipases: interfacial enzymes with attractive applications**. *Angew Chem. Int.* v. 37, 1998. p. 1608-1633.

SERETI, V.; KOLISIS, F.N.; STAMATIS, E.; KOUKIOS, E. Enzymatic acylation of cellulose acetate in organic media. **Journal of Biotechnology**, n. 66, 1998. p. 219-223.

SILVA, Jane E. S. **Lipases imobilizadas em crisotila: aplicação na obtenção de álcoois opticamente ativos e aromas para a indústria de alimentos**. Blumenau, 2000. Monografia (Bacharel em Química)- Universidade Regional de Blumenau.

TSUZUKI, Wakako; UZAWA, Hirotaka; OHRUI, Hiroshi; SUZUKI, Tateo. **Synthesis of sugar fatty acid esters by modified lipase**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64, n.3, 1999.

WENDHAUSEN, R.; FREGONESI, A.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; JOEKES, I. TONELLA, E. J. **Biosc. And Bioeng.** n. 1, 2001. p. 48 - 52.

WENDHAUSEN, R., A.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; JOEKES, E. Continuous process for large-scale preparation of chiral alcohols with baker's yeast. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 5, 1998. p. 69-73.

WENDHAUSEN Jr. R.; FERNANDES, P.; CRUZ, A.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. **Chrysotile as a support for immobilization of *Mycobacterium sp.* cells for bioconversion of β -sitosterol in a non conventional medium**. BIOCOT 2002, 1^o International Congress on Biocatalysis. Hamburg, Germany, 28-31 July, 2002.

WENDHAUSEN Jr. R.; CRUZ, A.; FRIGATO, M. E.; PINHEIRO, H.; FERNADES, P.; CABRAL, J. M. S. Chrysotile as a support for the immobilization of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 cells for the bioconversion of beta-sitosterol in an organic-aqueous two-liquid phase system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, Delft**, v. 32, 2005. p. 61-65.

WENDEHAUSEN, Renato. J. **Estudo sobre utilização de Crisotila como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae* para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções**. Campinas, 1998. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Estadual de Campinas.

WENDHAUSEN Jr, R., RISCH, D. H., HODAPP, M. J. **Biorredução da 4-aminoacetofenona intermediada por células de *saccharomyces cerevisiae* CCT 3174, conduzida em regime contínuo em biorreatores**. In: 28. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Poços de Caldas MG. Livro de Resumos. 2005. p. TC 042.