

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

JAME'S ALMADA DA SILVA

**PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES UTILIZANDO LIPASE DE
Candida antarctica TIPO B IMOBILIZADA PARA A SÍNTESE DE ÉSTERES
DE VITAMINA A**

**FORTALEZA
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JAME'S ALMADA DA SILVA

PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES UTILIZANDO LIPASE DE *Candida antarctica* TIPO B IMOBILIZADA PARA A SÍNTESE DE ÉSTERES DE VITAMINA A

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Grau Mestre em Engenharia Química

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

**FORTALEZA
2007**

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

S58p Silva, Jame's Almada da

Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada para síntese de ésteres de vitamina A [manuscrito] / Jame's Almada da Silva

102 f.: il. color.; enc.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007

Orientadora: Luciana Rocha Barros Gonçalves

Área de concentração: Biotecnologia

1. Quitosana 2. Alginato de sódio 3. Enzimas – Imobilização 4. Enzimas - Síntese 5. Retinol I. Gonçalves, Luciana Rocha Barros (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Mestrado em Engenharia Química III. Título

CDD 660

Dedico

Aos meus pais

Antônio Luiz da Silva, e

Antônia Ivonete Almada da Silva

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter nos presenteado com a sabedoria e com a capacidade de aprendermos cada vez mais. A minha família pela educação contínua e pelo amor que sempre esteve presente.

Às professoras Luciana Rocha Barros Gonçalves e Andrea Lopes de Oliveira Ferreira pela orientação, pelo conhecimento compartilhado e pela confiança depositada em mim.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo apoio.

À professora Raquel de Lima Camargo Giordano do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela colaboração e pelo Laboratório de Processos Bioquímicos cedido para que eu fizesse parte dos meus experimentos.

Aos meus amigos (as) de mestrado: Anayla, Antonino, Gilson, Edson, Maurício e Valderez, pelas tardes de estudo e descontração durante o primeiro ano de curso.

Aos amigos (as) do LabBio e dos outros laboratórios do Departamento de Engenharia Química por tornar o dia a dia muita mais leve. Em especial a Germana por sua contribuição e dedicação à pesquisa nesses dois anos de mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao GPSA por ter cedido os seus laboratórios, tornando possível o trabalho realizado.

"Seja qual for o teu sonho, comece,
ousadia tem genialidade, poder e
magia."

Goethe

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) imobilizada covalentemente em quitosana, uma matéria-prima abundante e de baixo custo no Ceará, em quitosana-alginato e em agarose, com o intuito de utilizá-los na síntese de ésteres de vitamina A. Diversas estratégias de imobilização foram realizadas com o intuito de obter um derivado com elevada atividade enzimática e com alta estabilidade térmica e operacional. Três tipos de suportes (agarose, quitosana e quitosana-alginato) foram preparados a partir de tais estratégias, sendo que um estudo aprofundado foi realizado com dois desses suportes (quitosana e quitosana-alginato). Apenas uma estratégia de imobilização foi realizada com agarose para testá-lo na síntese de palmitato de retinila, juntamente com dois derivados comerciais (lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) e lipase imobilizada de *Mucor miehei* (Lipozyme RM IM)), com o objetivo de definir algumas condições operacionais. Uma condição avaliada que apresentou bons resultados na síntese foi o uso de peneira molecular para a retirada de água no meio reacional, sendo, portanto, utilizada nos estudos posteriores. Após os estudos de imobilização e estabilidade térmica a 60 °C, dois derivados (J8: quitosana ativada com glicidol seguido de etilenodiamina (EDA) e glutaraldeído, e G10: quitosana-alginato ativada com glutaraldeído) foram escolhidos, por apresentarem maiores atividades específicas ($422,44 \pm 50,4$ U/g e $378,30 \pm 34,7$ U/g, respectivamente) e melhores estabilidades térmicas (fatores de estabilização de 10,25 e 29,00, respectivamente), para estudos de estabilidade operacional de hidrólise e para síntese de palmitato de retinila. O derivado que apresentou melhor estabilidade térmica a 60°C foi o G10, CALB imobilizada em quitosana-alginato, sendo aproximadamente 29 vezes mais estável que a enzima solúvel, e mais de 2 vezes mais estável do que a enzima comercial Novozyme 435. Porém, o derivado J8 apresentou melhor estabilidade operacional de hidrólise, semelhante ao derivado comercial Novozyme 435. Um planejamento experimental 2^2 foi realizado para se avaliar a síntese de palmitato de retinila. Avaliou-se a influência da temperatura (37 °C e 45 °C) e da razão entre os substratos, retinol:ácido palmítico (1:3 e 1:5), no rendimento de síntese, catalisada pelo derivado J8. Uma reação utilizando o derivado G10 utilizando a melhor condição do planejamento experimental foi realizada para ver o comportamento desse derivado. Com uma análise estatística dos resultados, pôde-se observar que a razão entre os substratos teve efeito significativo no rendimento de síntese. Maiores foram obtidos quando a razão entre substratos foi igual a 1:5. Como os resultados nas temperaturas de 37 °C e 45 °C foram semelhantes, selecionou-se a temperatura de 37 °C para reações posteriores, por necessitar de um menor gasto de energia para atingi-la.

Palavras-chave: quitosana, alginato de sódio, imobilização de enzimas, CALB, síntese enzimática, retinol.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the preparation of biocatalysts using lipase of *Candida antarctica* type B (CALB) covalently immobilized in agarose, chitosan, an abundant and low cost raw material, to be used in the synthesis of ester of Vitamin A. Several strategies of immobilization were studied in order to obtain a biocatalyst with good enzymatic activity and high thermal and operational stabilities. Three types of supports (agarose, chitosan and chitosan-alginate) were activated by different strategies, but most of attention was given to the supports chitosan and chitosan-alginate. Only one derivative was prepared by immobilizing CALB in agarose and results of synthesis were compared to commercial derivatives (immobilized lipase of *Thermomyces lanuginosus* - Lipozyme TL IM - and immobilized lipase of *Mucor miehei* - Lipozyme RM IM), for the definition of some operational conditions. The operational condition that presented good results in the synthesis was used in further studies, such as removal of water from the reacional media by molecular sieves. After immobilization and thermal stabilities at 60 °C tests, two derivatives (J8: chitosan actived with glicidol follow by EDA and glutaraldehyde; G10: chitosan-alginate actived with glutaraldehyde) were selected: the ones that presented higher specific activities (422.44 ± 50.4 U/g and 378.30 ± 34.7 U/g, respectively) and best thermal stabilities (factors of stabilization of 10.25 and 29.0, respectively). Operational hydrolytic stabilities and the performance of these biocatalysts on the synthesis of retinyl palmitate were evaluated. One factorial design 2^2 was carried out to evaluate the synthesis of retinyl palmitate. The influence of the temperature (37 °C and 45 °C) and ratio between substrates concentration, retinol: palmitic acid (1:3 and 1:5), in the yield of synthesis, catalyzed for the J8 derivative, were evaluated. A statistical analysis of the results showed that the the most significant effect was the rate of substrates concentration. Higher yields of synthesis were obtained when the ratio of substrates concentration was equal to 1:5. Results of reaction yields at 37°C and 45 °C were very similar. Therefore, 37 °C was selected for further studies. Best results for thermal stability at 60°C were obtained for G10, CALB immobilized in chitosan-alginate, being approximately 29-fold more stable than soluble enzyme, and 2-fold more stable than the commercial enzyme (Novozyme 435). On the other hand, J8, CALB immobilized in chitosan, presented higher operational hydrolysis stability, with a similar deactivation profile to Novozyme 435.

Keywords: chitosan, sodium alginate, enzyme immobilization, CALB, enzymatic synthesis, retinol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	-	Substrato A
At _d	-	Atividade do derivado
At _f	-	Atividade final do sobrenadante
At _i	-	Atividade inicial do sobrenadante
At _r	-	Atividade recuperada
B	-	Substrato B
CALB	-	Lipase tipo B de <i>Candida antarctica</i>
CL-8B	-	“Cross-linked, 8 %”
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
E	-	Enzima
EA	-	Complexo enzima-substrato A
EA'	-	Complexo enzima-substrato A modificado
EA'B	-	Complexo enzima-substrato A modificado-substrato B
EA'P	-	Complexo enzima-substrato-produto 1
EDA	-	Etilenodiamina
EQ	-	Complexo enzima-produto 2
FORM	-	Formaldeído
G	-	Ácido gulurônico
G10	-	Derivado ativado com com glutaraldeído 2 % (v/v)
GLI	-	Glicidol
GLU	-	Glutaraldeído
J10	-	Derivado de quitosana ativado com glutaraldeído 2 % (v/v)
J11	-	Derivado de quitosana ativado com glutaraldeído 2 % (v/v), glicidol 48 %, (v/p), EDA e glutaraldeído 5 % (v/v)
J8	-	Derivado de quitosana ativado com glicidol 72 % (v/p), EDA e glutaraldeído 5 % (v/v)
Lipozyme RM	-	Lipozyme, lipase de <i>Mucor miehei</i> imobilizada
Lipozyme TL	-	Lipozyme, lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada
M	-	Ácido manurônico
Novozyme 435	-	Novozyme, lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada
P	-	Produto 1 da reação
pNP	-	<i>p</i> -nitrofenol
pNPB	-	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila
pNPP	-	Palmitato de de <i>p</i> -nitrofenila
PSA	-	Persulfato de amônio
Q	-	Produto 2 da reação
R _{imob}	-	Rendimento de imobilização
SDS	-	Dodecilsulfato de sódio
TEMED	-	Tetrametil-etileno-diamina
UV/Vis	-	Ultra-violeta/Vísivel

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura química do β -caroteno	7
Figura 2.2 - Estrutura química do retinol	7
Figura 2.3 - Esquema de reação realizada sem enzima (A) e catalisada com enzima (B).....	8
Figura 2.4 - Seqüência de reação enzimática ping-pong bi-bi.....	10
Figura 2.5 - Estrutura tridimensional da CALB disponível no Protein Data Bank (PDB)	14
Figura 2.6 - Esquema de enzimas imobilizadas empregando diferentes métodos	15
Figura 2.7 - Alguns suportes que podem ser utilizados na imobilização de enzimas. (a) Alginato, (b) quitosana, (c) agarose e (d) sílica	17
Figura 2.8 - Esquema da unidade básica da agarose	18
Figura 2.9 - Estrutura química do alginato. G é o grupo do ácido gulurônico e M é o grupo do ácido manurônico.....	19
Figura 2.10 - Estrutura da quitina e da quitosana.....	20
Figura 2.11 - Complexo polieletrólito quitosana-alginato.....	20
Figura 3.1 - Fluxograma mostrando a 1ª etapa de ativação com glicidol, de um suporte que contem grupos hidroxila em sua estrutura.....	24
Figura 3.2 - Fluxograma mostrando a 2ª etapa de ativação, levando a oxidação dos grupos gliceril, formados na etapa anterior, a glioxil, tornando o suporte ativo para a ligação da enzima.....	25

Figura 3.3 - Fluxograma mostrando a ativação, com glutaraldeído, de um suporte que contem grupos amino em sua estrutura	26
Figura 3.4 - Fluxograma mostrando uma das etapas de ativação utilizando EDA	26
Figura 3.5 - Esquema de imobilização utilizando glicidol na ativação do suporte	28
Figura 3.6 - Esquema de imobilização utilizando glicidol e glutaraldeído na ativação do suporte	28
Figura 3.7 - Esquema de imobilização em duas etapas, utilizando glicidol e glutaraldeído na ativação do suporte	29
Figura 3.8 - Esquema de imobilização, utilizando glicidol e formaldeído na ativação do suporte	30
Figura 3.9 - Esquema de imobilização, utilizando glutaraldeído na ativação do suporte	30
Figura 3.10 - Esquema de imobilização, utilizando glicidol na ativação do suporte	31
Figura 3.11 - Esquema de imobilização, utilizando glicidol e EDA na ativação do suporte	32
Figura 3.12 - Esquema de imobilização, utilizando glicidol, glutaraldeído e EDA na ativação do suporte	32
Figura 3.13 - Reações de ativação da quitosana, com glicidol, glutaraldeído, EDA e uma combinação deles, realizadas neste trabalho	33
Figura 3.14 - Reação de imobilização multipontual que acontece entre o grupos amino, presente na enzima, e os grupos aldeídicos presentes no suporte ativado.....	33

- Figura 4.1 - Eletroforese capilar da preparação enzimática de CALB: Pista 1: padrão proteína de soro bovino (BSA) com massa molar de 66 kDA; Pistas 2 e 3: preparado enzimático em diferentes concentrações, 2 % e 4 %, respectivamente..... 43
- Figura 4.2 - Perfil da imobilização de CALB em glioxil-agarose 8BCL, em tampão fosfato 100 mM, pH 10,5, T=18 °C, sob agitação suave por 4 horas, A atividade inicial do sobrenadante é 124,97 U/mL de enzima 44
- Figura 4.3 - Curvas de desativação térmica a 60 °C e pH 8,0 para a CALB livre e imobilizada em diferentes suportes: enzima livre $At_0 = 1945,69$ U/mL (■), Novozyme 435 $At_0 = 529,78$ U/g (▲), CALB imobilizada em quitosana utilizando a estratégia IX - derivado J8 $At_0 = 211,23$ U/g (▼), CALB imobilizada em quitosana utilizando a estratégia XI - derivado J10 $At_0 = 205,23$ U/g (◆), CALB imobilizada em quitosana utilizando a estratégia XII - derivado J11 $At_0 = 210,36$ U/g (◆) e CALB imobilizada em quitosana-alginato utilizando a estratégia XI - derivado G10 $At_0 = 190,86$ U/g (●). As linhas representam as tendências dos dados experimentais 54
- Figura 4.4 - Estabilidade operacional na hidrólise do pNPB para Novozyme 435, derivado J8 (quitosana ativado com glicidol 72 % (v/p), ligado com etilenodiamina entrecruzada com glutaraldeído 5 % (v/v)) e derivado G10 (quitosana-alginato ativado com com glutaraldeído 2 % (v/v)). Cada ciclo teve duração de 8 minutos, na temperatura de 25 °C e pH 8,0 57
- Figura 4.5 - Síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa..... 58
- Figura 4.6 - Análise cromatográfica da síntese de palmitato de retinila por hidrolise reversa, partindo de retinol e ácido palmítico..... 58
- Figura 4.7 - Curso da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa. Condições: 0.1 mmol de retinol, 0.5 mmol ácido palmítico, 100 mg de

CALB-A, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular. Agitação na ausência de oxigênio e protegidos da luz a 37 °C.....	61
Figura 4.8 - Curso da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa. Condições: 0.1 mmol de retinol, 0.5 mmol ácido palmítico, 50 mg de Lipozyme RM, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular. Agitação na ausência de oxigênio e protegidos da luz a 37 °C.....	61
Figura 4.9 - Curso da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa. Condições: 0.1 mmol de retinol, 0.5 mmol ácido palmítico, 50 mg de Lipozyme TL, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular. Agitação na ausência de oxigênio e protegido da luz a 37 °C	62
Figura 4.10 - Diagrama para interpretação dos resultados do planejamento fatorial	65
Figura 4.11 - Diagrama de Pareto para o planejamento experimental	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Aplicações industriais das lipases	12
Tabela 3.1 - Preparação dos géis de separação e de empilhamento para a eletroforese	35
Tabela 3.2 - Variáveis e Níveis do planejamento fatorial 2 ²	39
Tabela 3.3 - Planejamento experimental 2 ² : Matriz experimental	39
Tabela 4.1 - Valores de atividade da CALB frente a butirato de p-nitrofenila (pNPB) e palmitato de de p-nitrofenila (pNPP)	42
Tabela 4.2 - Parâmetros de imobilização de CALB em quitosana ativada por diversas estratégias (atividade do derivado (At _d), atividade recuperada (At _r) e rendimento de imobilização (R _{imob})) e atividade do sobrenadante antes (At _i) e após a imobilização (At _f). Condições de imobilização: 10 mL de solução enzimática, em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05, foram colocados em contato com 1 g de suporte a 25 °C durante 6 horas.....	45
Tabela 4.3 - Parâmetros de imobilização de CALB em quitosana ativada por diversas estratégias (atividade do derivado (At _d), atividade recuperada (At _r) e rendimento de imobilização (R _{imob})) e atividade do sobrenadante antes (At _i) e após a imobilização (At _f). Condições de imobilização: 10 mL de solução enzimática, em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05, foram colocados em contato com 1 g de suporte a 25 °C durante 6 horas.....	48
Tabela 4.4 - Parâmetros de imobilização de CALB em quitosana-alginato ativada por diversas estratégias (atividade do derivado (At _d) atividade recuperada (At _r) e rendimento de imobilização (R _{imob})) e atividade do sobrenadante antes (At _i) e após a imobilização (At _f) e Condições de imobilização: 10 mL de solução enzimática, em tampão bicarbonato	

100 mM, pH 10,05, foram colocados em contato com 1 g de suporte a 25 °C durante 6 h.....	51
Tabela 4.5 - Atividade dos derivados antes A_{t_0} (U/g) e depois A_{t_f} (U/g) da secagem com hexano.....	53
Tabela 4.6 - Desativação térmica a 60 °C e pH 8,0, da CALB, Novozyme 435, derivado J8 e derivado G10, por um período de até 21 horas.....	56
Tabela 4.7 - Produção de palmitato de retinila a 37 °C, após 45 horas de reação sob agitação, protegidos da luz e na ausência de oxigênio. Concentração inicial de retinol: 50 mM, concentração inicial de ácido palmítico: 250 mM, quantidade de enzima imobilizada: 100 mg. *Para os derivados J8 e G10 a reação teve duração de 24 horas.....	59
Tabela 4.8 - Resultados do planejamento experimental 2 ² da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa, tendo como parâmetros a temperatura e a razão entre os substratos. As reações foram conduzidas utilizando 100 mg de derivado J8, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular sob agitação, na ausência de oxigênio e protegidos da luz.....	63
Tabela 4.9 - Resultados da síntese de palmitato de retinila, utilizando o derivado G10 e as razões entre os substratos 1:3 e 1:5. As reações foram conduzidas utilizando 100 mg de derivado, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular sob agitação, na ausência de oxigênio e protegidos da luz, à 37 °C.....	66

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Abreviaturas e Siglas	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	viii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	6
2.1. Vitaminas	7
2.1.1. Vitamina A.....	7
2.2. Catalisadores enzimáticos	8
2.3. Lipases.....	10
2.3.1. Mecanismo de ativação para lípases	13
2.3.2. Lipase de <i>Candida antarctica</i> do tipo B.....	13
2.4. Métodos de imobilização de enzimas.....	14
2.5. Suportes para imobilização de lípases.....	16
2.5.1. Agarose	18
2.5.2. Alginato	19
2.5.3. Quitosana.....	19
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1. Materiais.....	22
3.2. Métodos	23
3.2.1. Preparação do gel de quitosana 4 % e quitosana-alginato 2,5% - 2,5%	23
3.2.2. Ativação com glicidol.....	24
3.2.3. Ativação com glutaraldeído	25
3.2.4. Reação com ligação cruzada utilizando EDA.....	26
3.2.5. Reticulação com formaldeído	27
3.2.6. Estratégias de imobilização.....	27
3.2.7. Análise qualitativa da CALB por eletroforese	34
3.2.8. Medida de atividade da lipase	35

3.2.9. Medida de atividade do derivado.....	36
3.2.10. Atividade recuperada	36
3.2.11. Rendimento de imobilização	37
3.2.12. Secagem dos derivados	37
3.2.13. Estudo da estabilidade térmica a 60 °C.....	37
3.2.14. Estudo da estabilidade operacional.....	38
3.2.15. Planejamento fatorial 2 ²	39
3.2.16. Síntese enzimática de ésteres de vitamina A.....	40
3.2.17. Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .	41
4. Resultados e Discussões.....	42
4.1. Determinação da atividade enzimática.....	42
4.2. Análise qualitativa da CALB por eletroforese	43
4.3. Perfil de imobilização da lipase em glioxil-agarose	44
4.4. Estudo da imobilização de lipase em quitosana.....	45
4.5. Estudo da imobilização de lipase em quitosana-alginato	50
4.6. Secagem dos derivados	52
4.7. Estabilidade térmica dos derivados a 60 °C	53
4.8. Estabilidade operacional de derivados na reação de hidrólise do butirato de <i>p</i> -nitrofenila (pNPB)	56
4.9. Síntese enzimática de ésteres de vitamina A utilizando lipase imobilizada	57
4.9.1. Influência do tipo de lipase e da peneira molecular.....	57
4.9.2. Influência do tipo de derivado utilizado, temperatura e razão entre substratos	63
5. Conclusões	68
6. Referências Bibliográficas	71
Anexos.....	79

1. INTRODUÇÃO

A vitamina A, também conhecida como retinol, vitamina antinfeciosa ou antixeroftálmica, foi a primeira vitamina a ser identificada. Esta vitamina lipossolúvel, essencial para o ser humano, é encontrada na natureza na forma livre ou esterificada e só se apresenta em alimentos de origem animal. Nos alimentos de origem vegetal são encontradas as pró-vitaminas A ou carotenóides, cujo principal exemplo é o β -caroteno. A vitamina A tem várias funções, sendo importante para a visão normal, expressão dos genes, reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e função imune. A sua deficiência pode causar dificuldade de adaptação da visão ao escuro (cegueira noturna), podendo até levar à cegueira, em casos mais graves (Penteado, 2003).

Desde a completa elucidação da estrutura de vitamina A por Karrer em 1930, foram realizados vários esforços para a síntese da vitamina A. Em 1937 Kuhn e Morris sintetizaram a vitamina A, mas com rendimento de apenas 7,5%. O material inicial era a β -ionona, que pode ser obtida de fontes naturais ou sintéticas. Dos procedimentos comerciais destacam-se os de Hoffman-La Roche e o de Badish Anilin-und Soda-Fabrik (BASF) (Penteado, 2003). Atualmente, alguns autores (Cao *et al.*, 1999; Bonrath e Netscher, 2005; Rejasse *et al.*, 2003) vêm estudando novas rotas de síntese com o intuito de se obter produtos puros, através de processos menos dispendiosos do ponto de vista econômico e com uma redução da produção de resíduos, que são prejudiciais ao meio ambiente.

Reações de esterificação são comercialmente importantes com produções que variam de algumas centenas de quilogramas até milhões de toneladas por ano, sendo interessante o estudo de novos processos com o intuito de aperfeiçoá-los. Ésteres servem como precursores e/ou aditivos para uma variedade de perfumes e sabores, fármacos, cosméticos, agro-químicos, plastificantes e polímeros, e também como solventes. Atualmente muitos ésteres são produzidos por métodos tradicionais que incluem síntese química e

extração de fonte natural. Ésteres extraídos de plantas ou alimentos de origem animal são freqüentemente escassos ou com elevados custos para uso comercial, enquanto aqueles sintetizados por métodos químicos têm menor custo. Porém estes métodos usam ácidos como catalisadores, os quais apresentam problemas como: corrosão de equipamentos, perigo no manuseio, não reutilização, necessidade de neutralização da massa resultante da reação gerando grandes quantidades de sal dissolvido, perda de conversão, rendimento e seletividade, bem como, poluição e alto custo de manufatura (Yadav e Trivedi, 2003). Portanto, a pressão de órgãos legislativos, e ambientais, como por exemplo, a ONG greenpeace, contribui para o desenvolvimento de intensivas pesquisas a fim de implementar novos processos ecologicamente corretos (Yadav e Lathi, 2003). Segundo Song e Wei (2002), reações catalisadas por enzimas, do ponto de vista ambiental, são superiores aos métodos químicos convencionais por causa das condições amenas de reação e alta eficiência catalítica, e da inerente seletividade dos catalisadores naturais aos substratos.

Enzimas são proteínas que agem como catalisadores, aumentando a velocidade nas quais as reações bioquímicas acontecem, sem serem consumidas e, sem alterar a direção ou natureza dessas reações. Elas permitem a síntese de produtos, como por exemplo, ésteres e intermediários, cuja síntese por processos químicos convencionais é bastante limitada, devido a pouca seletividade dos catalisadores ácidos empregados (Pereira *et al.*, 2003). Enzimas hidrolíticas, tal como as lipases, têm se tornado cada vez mais populares em síntese química, especialmente nas indústrias de cosméticos e indústrias farmacêuticas, onde a pressão reguladora tem incentivado o desenvolvimento e “marketing” de compostos naturais. Devido à alta seletividade enzimática, chegando a produzir um dos isômeros ópticos de um determinado composto, ao invés da mistura deles, essa rota pode ser utilizada para a síntese de drogas quirais onde apenas uma das formas enantioméricas possui a atividade farmacológica desejada (Arroyo *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2001; Wandrey *et al.*, 2000).

Outra vantagem do uso de enzimas para a síntese de compostos é que, em geral, a energia requerida em processos que empregam enzimas é menor, em relação àquela requerida por catalisadores químicos. O emprego de elevadas temperaturas pode levar a perda do produto por volatilização ou reações secundárias (Paiva *et al.*, 2000). O uso de lipase imobilizada, em processo de esterificação, leva a altos rendimentos no reator sob suaves condições de operação, dispensando etapas posteriores de purificação (Garcia *et al.*, 2000). As lipases também podem ser utilizadas em processos de transesterificação e interesterificação.

A função natural das lipases (triacilglicerol hidrolases E.C. 3.1.1.3) é a hidrólise de triglicerídeos. Contudo, elas podem ser usadas *in vitro* para catalisar muitas reações diferentes. Industrialmente, são usadas na modificação de óleos e gorduras, síntese de ácidos graxos como cosméticos ou surfactantes, e para produzir muitos intermediários diferentes para síntese orgânica (por exemplo: na resolução de misturas racêmicas) (Palomo *et al.*, 2002). Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode-se citar ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade de uso porque não necessitam de co-fatores e ampla especificidade para substratos. O uso desses catalisadores é crescente em escala industrial, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, entre outras (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Os catalisadores enzimáticos apresentam, como principais vantagens, elevada especificidade e atuação em condições suaves de temperatura e pH. Entretanto, devido à difícil extração ou produção e purificação de enzimas, existem poucas empresas no mundo que comercializam estes catalisadores. Desta forma, a necessidade na indústria química de obter produtos com elevado grau de pureza, em processo economicamente viável, têm despertado no meio científico o interesse no desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas como uma forma de facilitar sua recuperação para posterior reutilização (Rodrigues, 2005).

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas que estão numa forma insolúvel no meio em que serão utilizadas como catalisadores. Essa forma insolúvel é adquirida por processos no qual há uma retenção de sua atividade catalítica podendo ser utilizada repetida e continuamente. A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação em membrana polimérica (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Para que o emprego de enzimas imobilizadas se torne um processo economicamente viável, deve-se considerar o tipo de suporte empregado, assim como o método de imobilização. Muitas técnicas de imobilização têm sido reportadas, usando suportes de natureza orgânica e inorgânica com diferentes características (Dumitriu *et al.*, 2003).

Deve-se ressaltar que, dependendo das condições de imobilização e dos suportes empregados, a enzima apresentará diferentes propriedades finais, podendo mudar sua estabilidade frente a pH e/ou temperatura. Quando se desenvolve um biocatalisador imobilizado, as características mais desejáveis são elevadas estabilidade operacional e eficiência catalítica. A estabilidade operacional é uma avaliação da perda de atividade do biocatalisador. Nesta avaliação, bateladas consecutivas da reação de interesse são realizadas, a qual depende de uma série de fatores, tais como: desprendimento da enzima do suporte, obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários e perda de suporte por atrito ou dissolução (Soares *et al.*, 2000). Já a eficiência catalítica é a razão entre as unidades de atividade enzimática, medida no suporte após imobilização da enzima e as unidades de atividade oferecidas ao mesmo. Baixos valores de eficiência catalítica podem estar relacionados a mudanças conformacionais na enzima durante a imobilização ou, a propriedades físicas e químicas do suporte, as quais podem mudar a afinidade da enzima pelo substrato e torná-la menos acessível ao mesmo. A eficiência catalítica pode, também, ser seriamente diminuída por causa de restrições difusionais, comuns em biocatalisadores imobilizados (Blanco *et al.*, 2004).

Neste contexto, esta dissertação de mestrado utilizou metodologias de imobilização de lipase, com o objetivo geral de preparar biocatalisadores utilizando a lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) imobilizada em quitosana, matéria-prima abundante em nossa região e de baixo custo, e testar seus desempenhos na síntese de ésteres de vitamina A.

Os objetivos específicos foram: utilizar diferentes agentes ativantes, ou uma combinação deles, para ativar os suportes preparados com quitosana e quitosana-alginato e avaliá-los calculando atividade dos derivados, atividade recuperada, rendimento de imobilização, bem como estabilidade térmica e operacional. E com isso selecionar os melhores derivados e testá-los na síntese de um éster de vitamina A, o palmitato de retinila.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vitaminas

O termo vitamina foi utilizado pela primeira vez em 1911, para designar um grupo de substâncias que eram consideradas vitais, e todas elas continham o elemento nitrogênio na forma de aminas. Embora saibamos que várias das vitaminas hoje conhecidas não possuem grupos aminas em suas estruturas químicas, o termo é usado até hoje. A grande maioria das vitaminas não pode ser sintetizada pelos animais e mesmo as que são sintetizadas, não o são em quantidade suficiente. As vitaminas, portanto, devem ser obtidas na dieta alimentar ou em suplementos. Por esse motivo são chamadas de nutrientes essenciais. E é daí que vem a definição mais atual do termo vitamina: "compostos orgânicos obtidos em uma dieta normal e capaz de manter a vida e promover o crescimento". O papel das vitaminas no organismo é extremamente importante. Sempre que uma vitamina está ausente em uma dieta, ou não possa ser corretamente absorvida, surge uma doença específica. Muitas vezes ingerimos não a vitamina, mas uma provitamina: uma substância com estrutura similar a uma vitamina específica, e que pode ser convertida a esta, via reações metabólicas. Exemplos são beta-caroteno (precursor da vitamina A) e 7-deidrocolesterol (precursor da vitamina D3). O triptofano é um aminoácido, um dos tijolos fundamentais das proteínas, e é também um precursor do ácido nicotínico, a vitamina B4. Existem substâncias que impedem o funcionamento normal de uma vitamina: são chamados anti-vitaminas. As anti-vitaminas podem se ligar às vitaminas (a anti-vitamina avidina, por exemplo, impede a função da vitamina tiamina), destruir as vitaminas (a anti-vitamina tiaminase destrói a tiamina) ou inibirem a função co-enzimática de uma vitamina (<http://quark.qmc.ufsc.br>).

2.1.1. Vitamina A

Em 1915 foi adotado o termo “lipossolúvel A” para um composto, hoje conhecido como vitamina A (retinol), que estimulava o crescimento em ratos. Esse composto foi encontrado inicialmente no leite, na manteiga e na gema do ovo. Hoje se sabe de várias fontes onde é encontrada a vitamina A. Ela só se apresenta em alimentos de origem animal, onde uma das fontes mais ricas é o fígado de peixes marinhos e de mamíferos. Nos alimentos de origem vegetal são encontradas as pró-vitaminas A ou carotenóides, cujo principal exemplo é o β -caroteno (Figura 2.1).

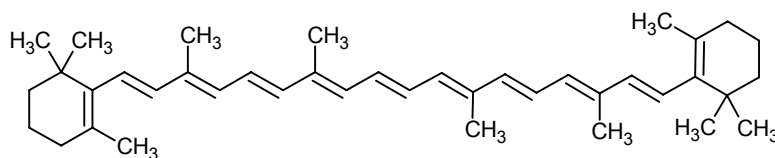


Figura 2.1: Estrutura química do β -caroteno (Penteado, 2003).

O retinol tem a fórmula empírica $C_{20}H_{30}O$ e contém na sua estrutura química o anel β -ionona ligado a uma estrutura terpênica. A fórmula química pode ser visualizada na Figura 2.2.

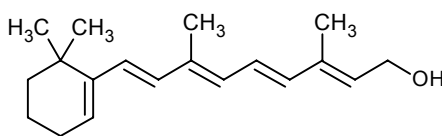


Figura 2.2: Estrutura química do retinol (Penteado, 2003).

O retinol, que possui peso molecular de 286,4 g/mol, pode ser um óleo amarelo, com absorção no ultravioleta a 325 nm ou sólido cristalino com PF = 63-64 °C. Na natureza, a vitamina A aparece na forma esterificada e conseqüentemente é solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em soluções aquosas. Ela é sensível à oxidação na presença de luz (isomerização), instável

ao calor e em meio ácido (isomerização), sendo estável em meio alcalino. As formas comerciais (esterificadas) obtidas por síntese têm melhor estabilidade e solubilidade que o retinol e aparecem na forma de retinil-acetato e retinil-palmitato-*todo-trans* (Penteado, 2003).

2.2. Catalisadores Enzimáticos

Catálise pode ser definida como um processo pelo qual uma pequena quantidade de substância (o catalisador) aumenta a velocidade de uma reação química sem ser consumida. As enzimas são catalisadores naturais fundamentais para a manutenção da vida, pois elas aumentam em muito a velocidade de diversas reações por um fator de 10^{12} ou mais (Koolman, 2005). A Figura 2.3 mostra duas reações, uma catalisada e outra não catalisada.

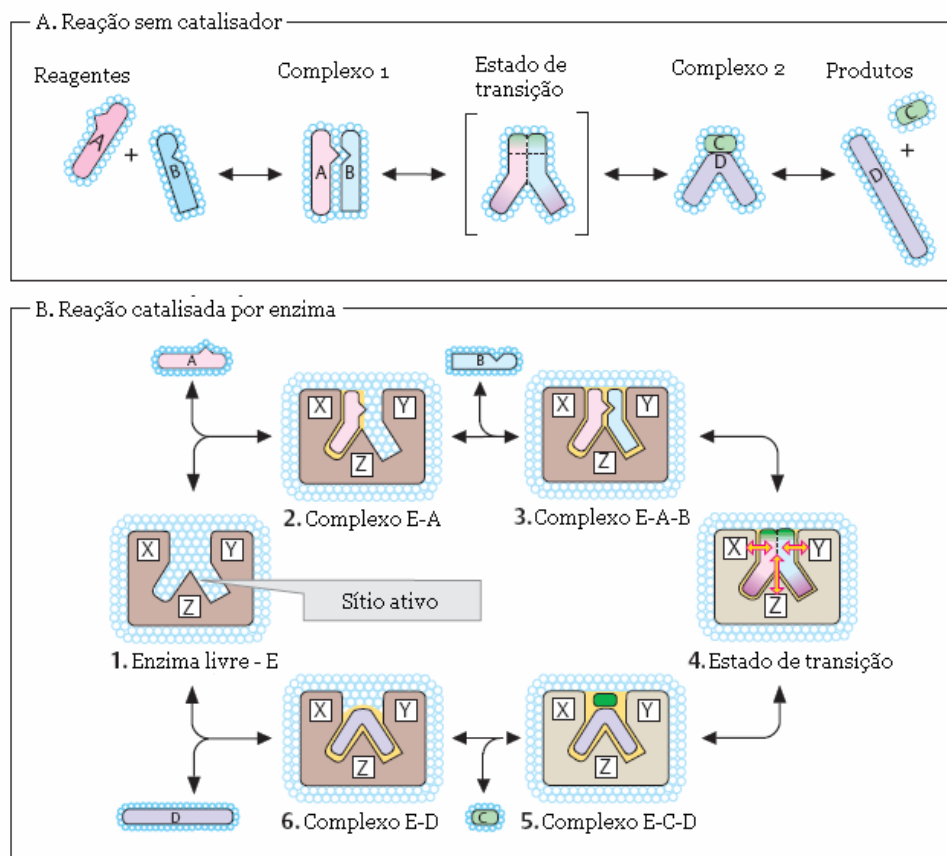


Figura 2.3: Esquema de reação realizada sem enzima (A) e catalisada com enzima (B) (Koolman, 2005).

A reação na qual o catalisador não está presente necessita de uma grande quantidade de energia de ativação para que chegue ao estado de transição e a reação se complete, dependendo também dos choques aleatórios que acontecem entre as moléculas reagentes. Já na reação em que há uma enzima como catalisador essa energia necessária para se atingir o estado de transição é menor, pois há uma região da enzima chamada de sítio ativo que tem uma alta afinidade pelos substratos, facilitando assim a aproximação e orientação entre eles para que ocorra a reação. As letras X, Y e Z que aparecem na Figura 2.3 representam os resíduos de aminoácidos presentes na enzima responsáveis pela interação entre enzima e substrato e que são responsáveis pela estabilização do estado de transição (Koolman, 2005).

As vantagens desses catalisadores naturais em relação aos químicos, é que eles apresentam características peculiares como: elevada estereoespecificidade e seletividade ao substrato e eficiência catalítica (resultando em energia de ativação requerida muito menor, condições suaves de reação de pH e temperatura), o qual reduz a quantidade de energia necessária, diminuindo também os danos causados aos produtos, ocasionado pela alta temperatura utilizada no processo (Paiva *et al.*, 2000).

O uso de processos mediados por enzimas vem desde as civilizações antigas. Hoje aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas, e destas, cerca de 200 são usadas comercialmente. A maioria das enzimas de uso industrial tem origem microbiana, sendo as lipases as que representam ter maior aplicação industrial até o momento (Sharma *et al.*, 2001).

Enzimas são comercializadas em diferentes formulações (soluções aquosas, pó ou imobilizadas em matriz sólida), das quais somente aquelas em forma de pó ou imobilizadas podem ser adicionadas diretamente em solventes orgânicos. O uso de biocatalisadores em solventes orgânicos oferece muitas vantagens em relação à água pura, tais como aumento da solubilidade de substratos orgânicos pouco solúveis em água, impedimento de reações secundárias indesejadas, degradação de reagentes orgânicos, deslocamento do equilíbrio termodinâmico de muitos processos (Lozano *et al.*, 2004). Além

disso, as enzimas podem adquirir novas propriedades, dependendo do solvente orgânico empregado como meio dispersante, tais como maior termoestabilidade, especificidade pelo substrato e especificidade enantiomérica, memória molecular e habilidade de catalisar reações não usuais (Krishna e Karanth, 2001).

2.3. Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são biocatalisadores responsáveis por catalisar reações de hidrólise de óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol. Um elevado número de compostos de alta e baixa massa molecular também pode ser substrato dessa enzima, tais como tioésteres, amidas, poliidroxiésteres/hidroxiácidos, etc. Além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação. As reações de esterificação, segundo alguns autores (Chulalaksananukul et al, 1990; Arcos *et al.*, 2001) seguem um mecanismo denominado Ping Pong Bi Bi (ver Figura 2.4) e foi proposto para o tipo de reação que envolve dois substratos (A e B) e dois (P e Q) produtos (Bi Bi). Nesse tipo de reação, a enzima reage com o primeiro substrato (no caso o ácido) formando o intermediário acil-enzima, liberando água (o primeiro produto), depois reage com o álcool, o segundo substrato, liberando o éster como segundo produto (Bousquet-Dubouch *et al.*, 2001).

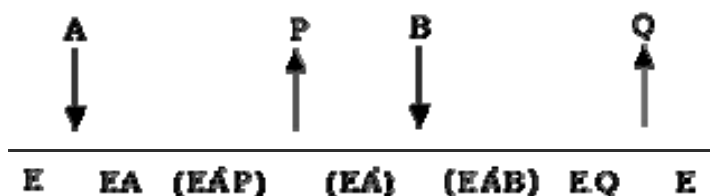


Figura 2.4: Seqüência de reação enzimática ping-pong bi-bi.

Conforme a classificação das enzimas, as lipases são divididas da seguinte forma:

1. Regiosseletivas - subdivididas em:

- I. lipases não-específicas - hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2;
- II. lipases 1,3-específicas - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3 (existem alguns estudos na literatura sobre a lipase A de *Candida antarctica* que hidrolisa a posição 2).

2. Tipo-seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ ou ao número de insaturação do grupo acila.

3. Enantioseletivas

Uma das vantagens de se empregar lipases como catalisadores consiste na possibilidade de utilizar condições suaves de reação evitando a formação de produtos indesejáveis, além de ter maior controle e eficiência do processo (García *et al.*, 2000). Além disso, estas enzimas apresentam características interessantes, tais como: substancial atividade em solventes quase anidros, manutenção de sua estabilidade e atividade sob grandes variações das condições experimentais (Létisse *et al.*, 2003).

Mais de 50 lipases foram identificadas, purificadas e caracterizadas até esta data, originadas de fontes naturais como plantas, animais e microrganismos (nativos ou geneticamente modificados) (Dumitriu *et al.*, 2003). A massa molecular dessas enzimas varia de 20-75 kDa e seu ponto isoelétrico (pI) varia em uma faixa de 3,6-7,6, sendo majoritariamente acídicas com pI entre 4 e 5 (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Elas podem operar em pH na faixa de 4-9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. São usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura de 30-40 °C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Castro *et al.*, 2001).

As lipases já apresentam aplicações de grande importância nos setores alimentício e químico os quais estão apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Aplicações industriais das lipases

Setor	Aplicação	Produto
Alimentício		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Dois Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídios	Bebidas alcoólicas, ex: saquê, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídios	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gordura	Produtos embutidos
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais, hidrólise de óleos	Óleos e gorduras modificadas (subst. da manteiga de cacau)
Químico		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de gorduras de alimentos	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídios	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes e outros, em combinação com outras enzimas

Fonte: Castro *et al.*, 2004

2.3.1. Mecanismo de ativação para lipases

Uma peculiaridade no mecanismo de ação da lipase é chamada de ativação interfacial: as lipases podem se apresentar sob duas diferentes conformações, uma aberta (ativa) e uma fechada (inativa). Em meio aquoso homogêneo essas formas estão em equilíbrio, no entanto esse equilíbrio está deslocado para a conformação fechada. Na presença de superfícies hidrofóbicas (por exemplo, gotas de óleo) a lipase é adsorvida movendo o equilíbrio para a conformação aberta. (Palomo *et al.*, 2005).

A forma fechada exibe uma cadeia oligopeptídica helicoidal chamada “tampa” isolando o sítio ativo do meio reacional. Na forma aberta, a “tampa” é deslocada por mudanças conformacionais e o sítio ativo é exposto ao meio reacional tornando a enzima ativa (Rodrigues, 2005).

O sítio catalítico das lipases é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido na molécula pela “tampa”, que ao interagir com a interface lipídio/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. Mais recentemente, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Cândida antarctica* B, que apresentam “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e não precisam da interface para exercer a atividade hidrolítica (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

2.3.2. Lipase de *Candida antarctica* do tipo B

A lipase de *C. antarctica* do tipo B (CALB) é constituída de 317 resíduos de aminoácidos com estrutura globular e dimensões de 30 Å x 40 Å x 50 Å, tem peso molecular de 33 kDa e ponto isoelétrico (PI) de 6,0 (Uppenberg *et al.*, 1994). Os autores observaram que na estrutura da CALB, o sítio ativo está

acessível ao solvente através de um canal tortuoso. As paredes deste canal são bastante hidrofóbicas e formadas por resíduos alifáticos alinhados.

Esta lipase não apresenta a “tampa”, responsável pela hiperativação característica de outras lipases (Blanco *et al.*, 2004). A Figura 2.5 mostra uma representação da estrutura molecular da CALB.

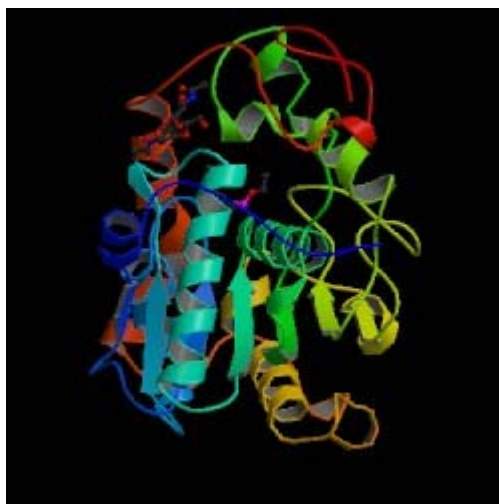


Figura 2.5: Estrutura tridimensional da CALB disponível no Protein Data Bank (PDB).

A CALB está comercialmente disponível em várias formulações para aplicações em solventes orgânicos ou meio aquoso. Estas formulações são bastante ativas mesmo em baixa atividade de água e podem tolerar solventes relativamente polares como a acetonitrila (Rotticci, 2000). Aplicações industriais importantes de CALB, tanto na forma livre quanto imobilizada são: síntese de triglicerídeos e esterificação de álcoois terpênicos; esterificação de açúcares, nucleosídeos e esteróides; resolução de álcoois secundários via hidrólise ou esterificação em solventes orgânicos; síntese de antiinflamatórios.

2.4. Métodos de imobilização de enzimas

Imobilização de enzimas pode ser definida como o aprisionamento de moléculas de enzima em uma fase distinta, onde se encontra dispersa no meio,

usualmente insolúvel em água e com alto peso molecular, como por exemplo, polímeros hidrofílicos (celulose, quitosana, alginato etc) (Trevan, 1980).

As enzimas são imobilizadas devido a diversos problemas na utilização de sua forma livre: o alto custo para isolar e purificá-la, a instabilidade de suas estruturas uma vez que é isolada de ambientes naturais, sua sensibilidade a condições de processos que estão fora dos seus ótimos de operação, normalmente uma estreita faixa, e as quantidades traço de substâncias que podem atuar como inibidores. A heterogeneidade do sistema com enzimas imobilizadas permite uma fácil recuperação da enzima e do produto, a reutilização múltipla da enzima, operações contínuas de processos enzimáticos e uma grande variedade de configuração de biorreatores (Krajewska, 2004).

Atualmente, vários métodos de imobilização estão disponíveis na literatura, como adsorção, imobilização covalente, ligação iônica, encapsulamento, gelificação e ligação cruzada na ausência de suporte (Figura 2.6).

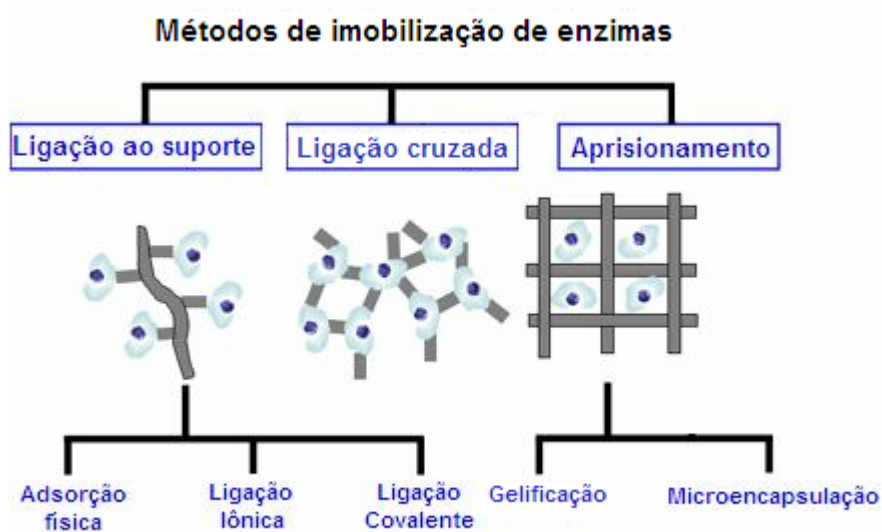


Figura 2.6: Esquema de enzimas imobilizadas empregando diferentes métodos. Disponível no site: http://leee.gist.ac.kr/research_6.html

A seleção do método de imobilização é feita pela avaliação de parâmetros como atividade enzimática global, efetividade de utilização de lipase, desativação e características de regeneração, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas do derivado imobilizado (Rodrigues, 2005). O método de adsorção é

simples, barato e efetivo, mas frequentemente reversível. A ligação covalente e a ligação cruzada apresentam maior custo e perdem facilmente o desempenho depois da imobilização, por mudança de sua conformação, mas são mais estáveis, na gelificação e microencapsulamento os problemas de difusão são inerentes (Krajewska, 2004). Todos os métodos apresentam suas vantagens e desvantagens, portanto dependendo da aplicação e avaliação dos parâmetros citados anteriormente é que se escolhe um dos métodos de imobilização de enzimas mais adequado.

A técnica de imobilização por ligação covalente apresenta a vantagem em relação a técnica de adsorção por não apresentar o fenômeno de dessorção. O maior interesse é realizar o ataque aos aminoácidos da enzima que não fazem parte do sítio catalítico. Isso pode ser difícil de atingir e, usualmente, enzimas imobilizadas com essa técnica perdem um pouco de sua atividade inicial. Contudo enzimas imobilizadas covalentemente são usualmente muito estáveis e resistentes em condições extremas (faixa de pH e temperatura) (Villeneuve *et al.*, 2000).

Muitos suportes minerais ou orgânicos podem ser usados para imobilização, mas antes de realizar a ligação covalente, o suporte deve ser ativado. Essa ativação corresponde à incorporação de grupos químicos capazes de reagir com as cadeias laterais da proteína. Diferentes métodos de ativação são avaliados: o mais comum é o que utiliza glutaraldeído. Esse composto polimeriza facilmente dando polímeros contendo funções aldeídicas ω -insaturadas as quais podem reagir com os grupos amino do suporte (Villeneuve *et al.*, 2000). Outros compostos que podem ser utilizados para ativar suportes e apresentam grupos hidroxila são o glicidol, utilizado por Guisán (1988), e a carbodiimida utilizado por Hung *et al.* (2003).

2.5. Suportes para imobilização de lipases

Não há um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, mas um número de características desejáveis comuns deve existir para aplicar

na imobilização de enzimas. Entre elas inclui-se: alta afinidade para proteínas, presença de grupos funcionais reativos para reações diretas com enzimas e para modificações químicas, hidrofiliabilidade, estabilidade mecânica, regenerabilidade etc (Krajewska, 2004).

Muitas técnicas de imobilização têm sido reportadas baseadas em processos sol-gel e em géis microemulsionados, tais como, derivados poliméricos naturais, materiais inorgânicos como terra diatomécea (Celite), vidro com porosidade controlada, sílica, zeólitas, silicatos, óxidos mesoestruturados, hidróxidos com dupla camada, cerâmicas, matrizes inorgânicas (Dumitriu *et al.*, 2003). O alto custo de suportes populares (baseados em sílica e polímeros sintéticos) faz com que haja uma busca de suportes mais baratos como CaCO_3 , palha do arroz, ou quitina e quitosana. Dessas alternativas o derivado de quitina, quitosana, aparece como o mais atrativo visto que quitina é o segundo mais abundante biopolímero na natureza, depois da celulose (Pereira *et al.*, 2003). A Figura 2.7 apresenta alguns suportes que são utilizados na imobilização de enzimas e são pesquisados pelo Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBIO).

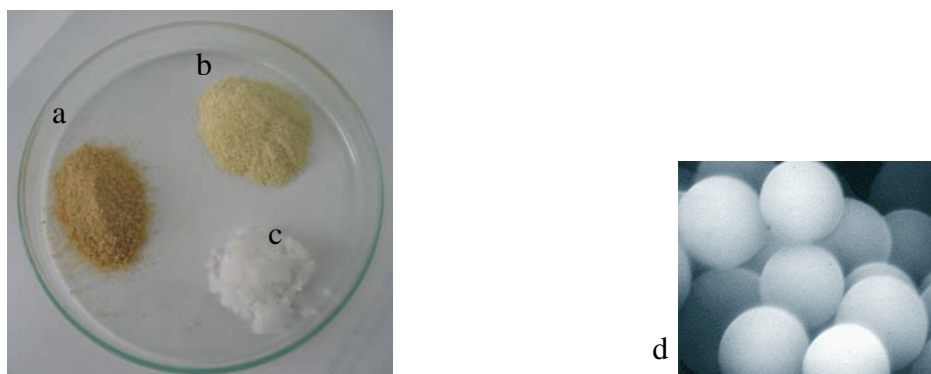


Figura 2.7: Alguns suportes que podem ser utilizados na imobilização de enzimas. (a) Alginato, (b) quitosana, (c) agarose e (d) sílica.

Quanto ao tamanho dos poros, segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), os suportes podem ser classificados em: microporosos (com tamanho de poro até 2,0 nm), mesoporosos (2,0 até 50 nm) e macroporosos (acima de 50,0 nm). O uso de suportes meso e macro-porosos

diminuem efeitos indesejáveis, como impedimento estérico. Nestes suportes, o derivado usualmente retém mais alta atividade e tem maior carga enzimática (Blanco *et al.*, 2004).

Neste trabalho foram utilizados como suporte para a imobilização de lipase de *C. antarctica* através de ligação covalente, a agarose, a quitosana e o alginato de sódio, sendo este último utilizado combinado com quitosana.

2.5.1. Agarose

Agarose é um polímero de polissacarídeo geralmente extraído de algas marinhas, com peso molecular em torno de 120.000 daltons (www.abtbeads.com/suporte). Quimicamente a agarose (molécula linear), que tem como unidade que se repete ao longo da cadeia, a agarobiose que consiste de dois resíduos de galactose, tem uma forma hidro-coloidal e pode formar pellets por gelatinização térmica (Betigeri e Neau, 2002). A Figura 2.8 ilustra a unidade básica da cadeia polimérica de agarose.

A agarose se apresenta como um bom suporte para imobilização de enzimas. Guisán (1988) e Palomo *et al.* (2002) imobilizaram enzimas em agarose obtendo bons resultados.

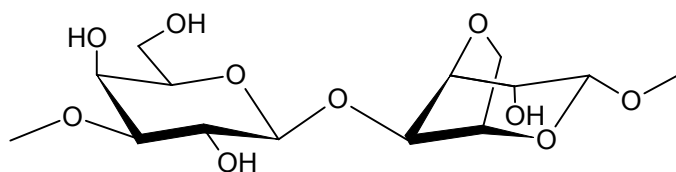


Figura 2.8: Esquema da unidade básica da agarose (Betigeri e Neau, 2002).

2.5.2. Alginato

Alginato é um biopolímero que pode ser extraído de algas marrons. Ele é um polissacarídeo linear não ramificado composto por duas unidades que se repetem ao longo da cadeia, nomeados de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) (Figura 2.9). Esses resíduos são unidos por ligações 1 → 4 e podem variar largamente em sua composição e seqüência dependendo da origem da alga (Rousseau *et al.*, 2004).

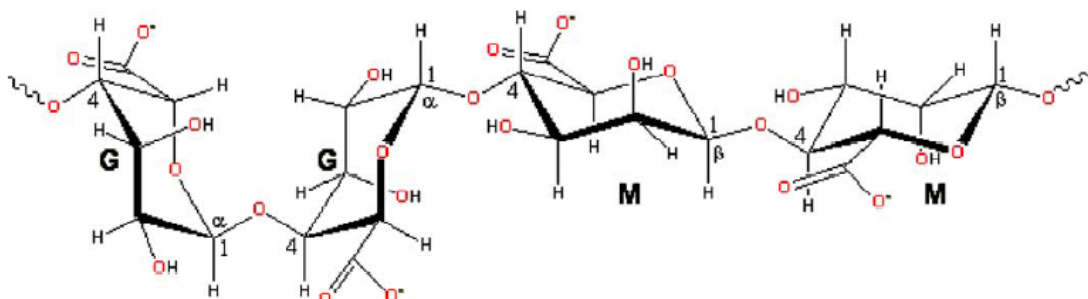


Figura 2.9: Estrutura química do alginato. G é o grupo do ácido gulurônico e M é o grupo do ácido manurônico (Rousseau *et al.*, 2004).

O alginato é utilizado para preparar um compósito polieletrólito com quitosana, com o objetivo de se obter um suporte mais firme e, portanto com uma maior estabilidade frente a condições drásticas de temperatura e agitação mecânica.

2.5.3. Quitosana

Quitina e quitosana são poliaminossacarídeos originados de fontes naturais (Figura 2.10). Quitina é um dos recursos renováveis mais abundantes do mundo. Um grande constituinte das carapaças dos crustáceos, do exoesqueleto de insetos e da parede de fungos que fornece força e estabilidade. Quitosana, o derivado principal da quitina, é obtido por N-desacetilação em variadas extensões que é caracterizado por seu grau de

desacetilação, e é conseqüentemente um copolímero de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina (Krajewska, 2004).

Comercialmente quitina e quitosana são obtidas, relativamente a baixos custos, de carapaças de mariscos (principalmente caranguejos, camarão, e lagostas), resíduos de processos da indústria alimentícia marinha (Krajewska, 2004). No Ceará, isto é uma grande vantagem devido a fácil aquisição e a grande atividade pesqueira existente em nosso litoral, conseqüentemente barateando os custos que chegam a US\$ 7,5/10 g na Índia, Japão, Polônia, Noruega e Austrália (Kumar *et al.*, 2000).

A quitosana, um polissacarídeo catiônico, forma polieletrólitos com polímeros polianiônicos tal como o alginato (Figura 2.11). Processos de encapsulação baseados em interações eletrostáticas entre alginato de sódio e quitosana resultam numa formação de gel mais firme (Huguet e Dellacherie, 1996).

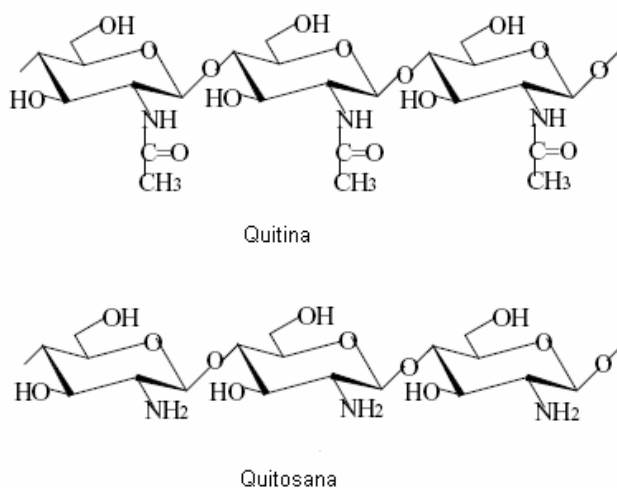


Figura 2.10: Estrutura da quitina e da quitosana (Krajewska, 2004)

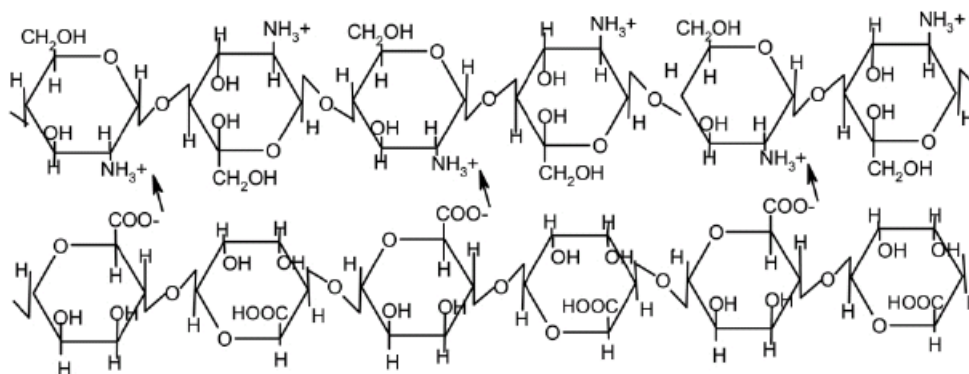


Figura 2.11: Complexo polieletrólito quitosana-alginato (Mi *et al.*, 2002).

A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas. Sua cadeia linear de poliglicosamina com alto peso molecular, apresenta grupos amino e hidroxila reativos susceptíveis a modificações químicas, e isso é uma característica desejável na utilização como suporte para imobilização de enzimas. Propriedades biológicas incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade dentre outros. Por isso ela vem sendo utilizada como suporte por vários autores (Spagna *et al.*, 2001; Cetinus *et al.*, 2000; Adriano *et al.*, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Suportes: agarose (CL-8B: cross-linked, 8 %), produzida por Hispanar S. A. (Espanha) doada por Dr. J. M. Guisan, do Instituto de Catálise e Petróleo Química (ICP/CSIC), Madri, Espanha. Quitosana doado por POLYMAR Ind Ltda, Fortaleza, Ceará, e Alginato de sódio adquirido da Vetec.

Enzima: lipase livre de *Candida antarctica* tipo B (CALB) (Novozym 525, EC 3.1.1.3) adquirida da Novo Nordisk S.A. (DK). Lipase imobilizada de *Candida antarctica* tipo B (Novozym 435), lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (Lipozyme TL IM) e lipase imobilizada de *Mucor miehei* (MML) (Lipozyme RM IM).

Reagentes de imobilização: Glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) da Aldrich, glutaraldeído e etilenodiamina (EDA) da Vetec.

Reagentes da eletroforese: Solução de Acrilamida 30% (p/p), tampão de separação (tris-HCl, pH 8,8), tampão de empilhamento (tris-HCl 0,5M, pH 6,8), tampão de corrida (tampão do reservatório) (tris-HCl 0,25M, glicina 1,92M, dodecilsulfato de sódio (SDS) 1%, pH 8,3), solução de persulfato de amônio (PSA) 1,5% (p/v), solução de SDS 10% (p/v), solução corante Coomassie Brilliant Blue R250, tetrametiletilenodiamina (TEMED) e solução descorante.

Dosagem enzimática (atividade): Triton X-114 e goma arábica para preparar a emulsão de palmitato de *para*-nitrofenila (pNPP). Butirato de *para*-nitrofenila (pNPB), *para*-nitrofenol (pNP) (Sigma-Aldrich) e álcool isopropílico. Fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, da Synth.

Substratos: pNPP adquirido da Fluka BioChemika (EUA) com alto grau de pureza (>98,0 %) e pNPB da Sigma-Aldrich (Alemanha) com uma pureza em torno de 98,0 %. Retinol da Sigma-Aldrich (Alemanha), palmitato de retinila

gentilmente doado pela DSM (DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda) e ácido palmítico (Rodhia, Brasil).

Todos os outros reagentes químicos foram de grau analítico e grau HPLC (Vetec e Synth).

Equipamentos: Espectrofotômetro UV/VIS da Biochrom (Inglaterra), com software (Acquire) de aquisição de dados, Balança semi-analítica digital da Bel Engineering (Itália), Agitadores mecânicos e magnéticos, medidores de pH, mesa agitadora com controle de temperatura (shaker) e banhos termostáticos com aquecimento e/ou resfriamento da Quimis, sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), (bomba modelo 1525 (Waters), detector UV/Vis modelo 2487 (Waters), injetor modelo 717 (Waters)), equipado com uma coluna Symmetry C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) de fase reversa da Waters e IR, purificador de água Milipore.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação do gel de quitosana 4 % e quitosana-alginato 2,5%-2,5%

Dissolveram-se os polímeros em solução de ácido acético 5 % (v/v), que foi mantida sob agitação mecânica por 1,5 h. Adicionou-se lentamente o gel numa solução de NaOH 0,1 M na razão de 1/10 ($V_{\text{solução de gel}}/V_{\text{solução de NaOH}}$) e deixou-se em rotação por 4 h. Em seguida, deixou-se o gel decantar por no mínimo 24 h, retirando-se o excesso de líquido. Adicionou-se água destilada para lavar o gel, deixando decantar por mais 24 h. Repetiu-se este procedimento de lavagem por 3 vezes. Após retirar o último excesso de água existente no becker secou-se por aproximadamente 30 min, e depois estocou-se em água destilada com algumas gotas de azida sódica 1 %.

3.2.2. Ativação com glicidol

A ativação com glicidol foi realizada segundo metodologia proposta por Guisán (1988) com algumas modificações. Utilizaram-se concentrações de 48 % e 72 % (v/p) da massa de suporte inicial. Os grupos hidroxila presentes no suporte foram os alvos de ataque da molécula de glicidol tornando-os ativos para a realização das etapas posteriores. A Figura 3.1 mostra o fluxograma do procedimento realizado na ativação do suporte com glicidol. Para 1 g de suporte, utilizaram-se 0,48 mL ou 0,72 mL de glicidol, dependendo da estratégia de imobilização utilizada. Antes da adição do glicidol, água destilada foi adicionada até cobrir o gel, basificando em seguida com NaOH, e adicionando um agente redutor (NaBH_4), a frio. O meio básico e a adição do agente redutor é necessário para que a reação do glicidol com os grupos do suporte seja iniciada. Depois de 18 horas de contato do suporte com o glicidol, ele é lavado com água destilada e então adicionado o agente oxidante, NaIO_4 , para transformar os grupos gliceril gerados, em grupos glioxil (grupos ativos), como está representado na Figura 3.2.

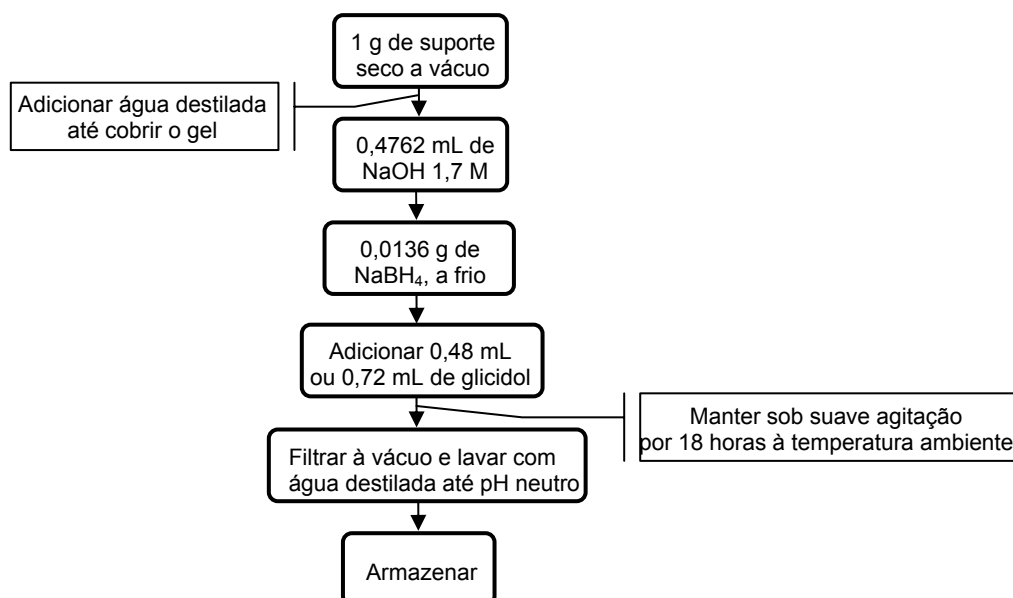


Figura 3.1: Fluxograma mostrando a 1ª etapa de ativação com glicidol, de um suporte que contém grupos hidroxila em sua estrutura.

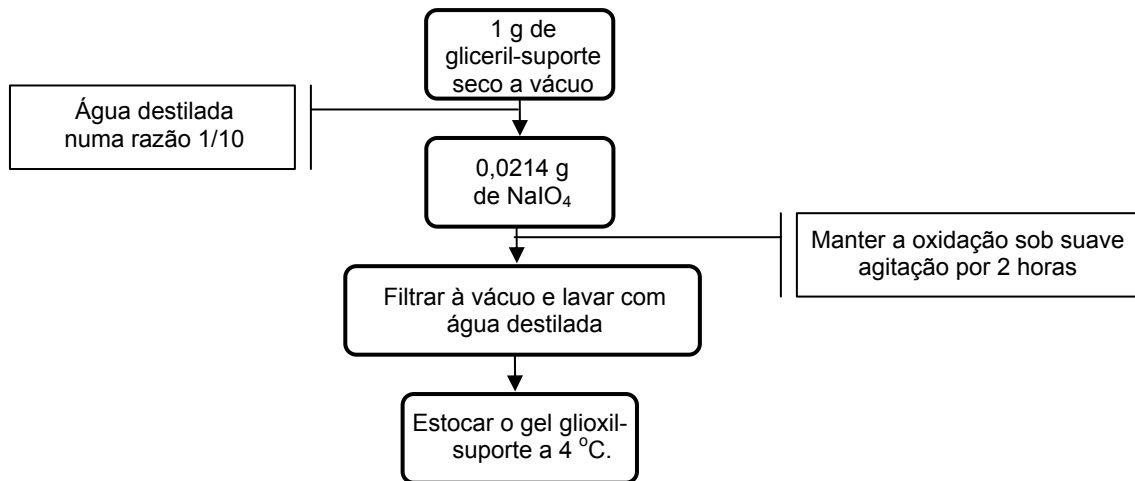


Figura 3.2: Fluxograma mostrando a 2ª etapa de ativação, levando a oxidação dos grupos gliceril, formados na etapa anterior, a glioxil, tornando o suporte ativo para a ligação da enzima.

3.2.3. Ativação com glutaraldeído (Com base em Adriano *et al*, 2005)

Estudou-se a ativação de quitosana com glutaraldeído, segundo metodologia proposta por Adriano *et al.* (2005). Nesta ativação, glutaraldeído reage com os grupos amino presentes no suporte, a fim de torná-los aptos para as etapas posteriores (continuidade das ativações ou imobilização da enzima). A Figura 3.3 mostra um fluxograma do processo de ativação com glutaraldeído. Para cada grama de suporte adicionou-se 10 mL de solução de glutaraldeído, 2 % ou 5 % (v/v) em tampão bicarbonato pH 10,00, de acordo com cada estratégia de imobilização, mantendo sob suave agitação por um período de 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida lavou-se o suporte ativado, com água destilada.

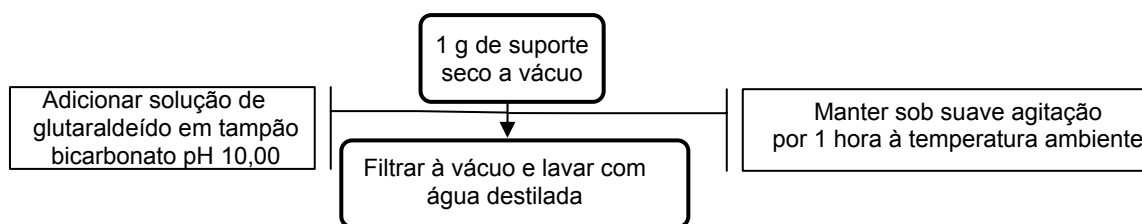


Figura 3.3: Fluxograma mostrando a ativação, com glutaraldeído, de um suporte que contém grupos amino em sua estrutura.

3.2.4. Reação com ligação cruzada utilizando etilenodiamina (EDA) (Fernandez-Lafuente *et al*, 1993)

A EDA participou das etapas de ativações com o intuito de aumentar a capacidade do suporte de imobilizar enzimas, com o aumento da hidrofobicidade do suporte. Esta diamina se ligou a grupos aldeídicos presentes no suporte após prévia ativação com glutaraldeído ou glicidol. O outro grupo amino da EDA é disponibilizado para a ligação de moléculas de glutaraldeído, deixando-o, então, pronto para as imobilizações (Fernandez-Lafuente *et al*, 1993). A Figura 3.4 mostra um esquema da ativação utilizando EDA. Para 1 grama de suporte ativado adicionou-se 4 mL de EDA 2 M, e deixou-se sob agitação por 2 horas. Em seguida adicionou-se 0,0571 g de NaBH_4 para a redução das bases de Schiff, e mantido por mais 2 horas. Por último lavou-se o suporte com água destilada, para em seguida dar continuidade ao processo de ativação.

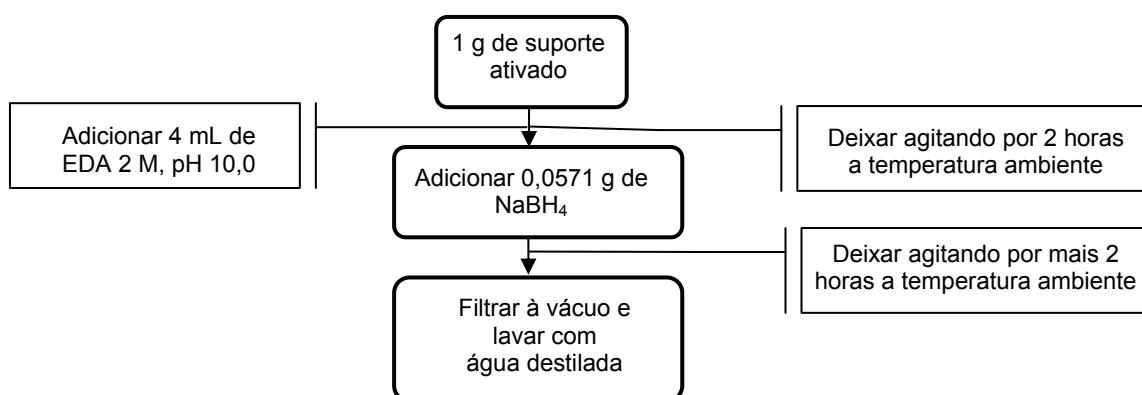


Figura 3.4: Fluxograma mostrando uma das etapas de ativação utilizando EDA.

3.2.5. Reticulação com formaldeído (Com base em John A. Kiernan, 2000)

A reticulação com formaldeído tem o intuito de bloquear os grupos amino da quitosana tornando-a menos hidrofílica, e deixar apenas os grupos hidroxila presentes para a ativação com glicidol e assim impedir alguma reação intramolecular quando os grupos amino da quitosana estão presentes.

Para 1 g de suporte, utilizaram-se 100 mL de solução formaldeído 1 % em tampão fosfato pH 7,6. Essa suspensão ficou sob suave agitação por um período de 18 horas, a temperatura ambiente. Lavou-se o suporte com água destilada, para em seguida dar continuidade ao processo de ativação.

3.2.6. Estratégias de imobilização

Doze estratégias de imobilização foram realizadas utilizando agarose e quitosana. As estratégias que rederem melhores resultados (atividades dos derivados, atividade recuperada e rendimento de imobilização) para a imobilização em quitosana foram repetidas para o compósito quitosana-alginato e os resultados foram comparados. A Figura 3.5 mostra esquemas das estratégias de imobilização estudadas neste trabalho. Em todos os estudos de imobilização utilizou-se uma carga de 1,8 mg de proteína por grama de suporte. Esta quantidade de enzima foi colocada em contato com o suporte numa solução tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05, e deixada sob agitação num reator encamisado a 25 °C, por 6 horas. As atividades do sobrenadante foram determinadas no início e no final da imobilização para o cálculo do rendimento de imobilização.

Estratégia I: A agarose foi ativada seguindo a metodologia da seção 3.2.2., utilizando 48 % (v/p) da massa inicial de suporte, de glicidol. A Figura 3.5 é uma representação esquemática das reações que ocorrem nesta estratégia.

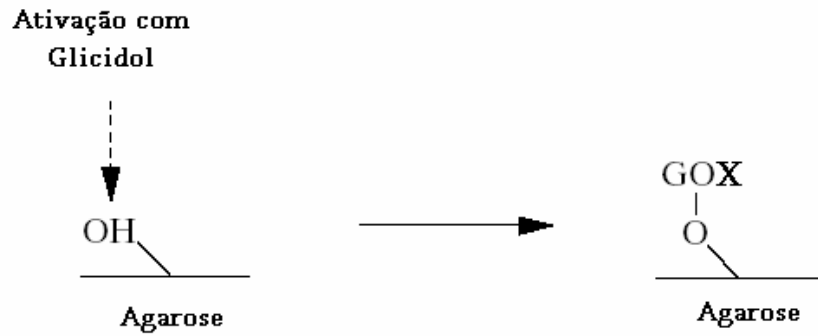


Figura 3.5. Esquema de imobilização utilizando glicidol na ativação do suporte

Estratégia II: Iniciou-se com a ativação dos grupos amino e hidroxila da quitosana, utilizando glicidol 48 % (v/p), seguido de glutaraldeído 1 % (v/v) e oxidação dos grupos gliceril gerados ao ativar com o glicidol. Por último a lipase foi imobilizada ao suporte ativo. Na Figura 3.6 está representado o esquema dessa estratégia.

Estratégia III: A ativação dos grupos amino e hidroxila da quitosana foram ativados utilizando o glicidol 48 % (v/p) e glutaraldeído 1 % (v/v) simultaneamente, seguido de imobilização com lipase. Na Figura 3.6 está representado o esquema dessa estratégia.

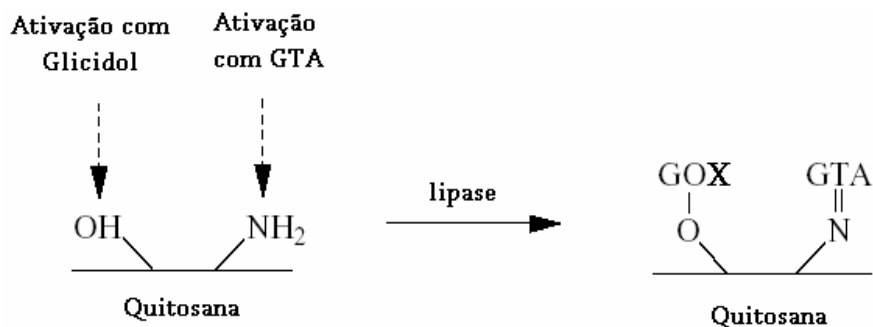


Figura 3.6. Esquema de imobilização utilizando glicidol e glutaraldeído na ativação do suporte.

Estratégia IV: Nesta estratégia foi realizada numa primeira etapa a ativação dos grupos da quitosana com glicidol 48 % (v/p) e oxidação dos grupos gliceril gerados, seguido de imobilização com lipase. Numa segunda etapa utilizou-se glutaraldeído 1 % (v/v) como o intuito de ativar possíveis grupos remanescentes do suporte, seguido de imobilização adicional com lipase. Esta estratégia foi baseada na utilizada por Hung *et al* (2003). Na Figura 3.7 está representado o esquema dessa estratégia.

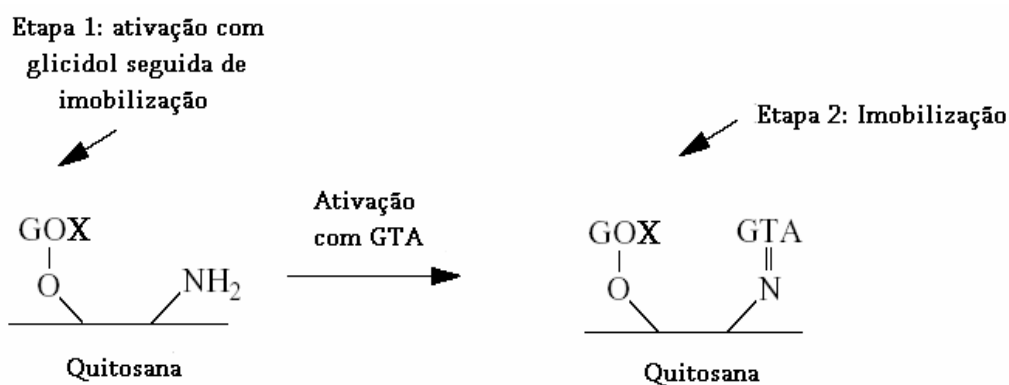


Figura 3.7. Esquema de imobilização em duas etapas, utilizando glicidol e glutaraldeído na ativação do suporte.

Estratégia V: Nesta estratégia de imobilização iniciou-se a ativação com glutaraldeído 1 % (v/v), pois possivelmente o glicidol tem preferéncia de ligação aos grupos amino da quitosana, para só depois se ligar aos grupos hidroxila, fazendo com que aja pouco ou nenhum grupo amino para o glutaraldeído se ligar. Após a ativação com glutaraldeído, glicidol 48 % (v/p) é utilizado pra ligar-se aos grupos hidroxila do suporte, seguido de oxidação dos grupos gliceril gerados na ativação com glicidol. Por último a lipase foi imobilizada ao suporte ativo. Na Figura 3.6 está representado o esquema dessa estratégia.

Estratégia VI: Formaldeído na concentração de 1 % (v/v) foi utilizado para se ligar aos grupos amino da quitosana, seguido de ativação com glicidol

48 % (v/p) e oxidação dos grupos gliceril gerados na ativação com glicidol. Logo em seguida realizou-se a imobilização da lipase. Na Figura 3.8 está representado o esquema dessa estratégia.

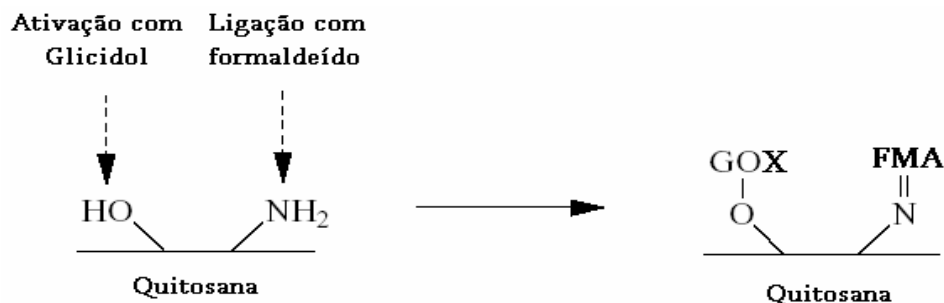


Figura 3.8. Esquema de imobilização, utilizando glicidol e formaldeído na ativação do suporte.

Estratégia VII: Apenas ativação com glutaraldeído 5 % (v/v) foi realizado nesta estratégia, seguido de imobilização da lipase. Na Figura 3.9 está representado o esquema dessa estratégia.

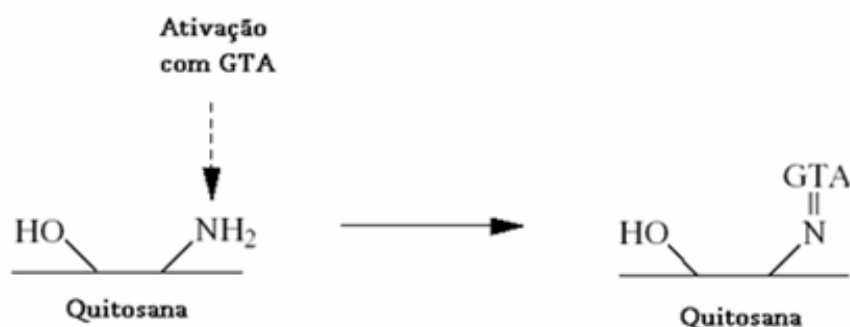


Figura 3.9. Esquema de imobilização, utilizando glutaraldeído na ativação do suporte.

Estratégia VIII: Ativação com glutaraldeído 5 % (v/v), seguido de ativação com glicidol 48 % (v/p) e oxidação dos grupos hidroxila terminais com NaIO₄. Em seguida foi realizada a ligação de um dos grupos amino da etilenodiamina aos grupos aldeídicos gerados no suporte, seguido de ativação adicional com glutaraldeído 5 % (v/v). Por último a lipase foi imobilizada ao

suporte ativado. Na Figura 3.11 está representado o esquema dessa estratégia.

Estratégia IX: Ativação com glicidol 72 % (v/p), oxidação dos grupos gliceril gerados na ativação com glicidol, ligação de um dos grupos amino da etilenodiamina aos grupos aldeídicos gerados no suporte, seguido de ativação com glutaraldeído 5 % (v/v). Por último a lipase é imobilizada ao suporte ativado. Na Figura 3.11 está representado o esquema dessa estratégia.

Estratégia X: Ativação apenas com glicidol 72 % (v/p), seguido de oxidação dos grupos gliceril gerados, e imobilização da lipase ao suporte ativo. Na figura 3.10 está representado o esquema dessa estratégia.

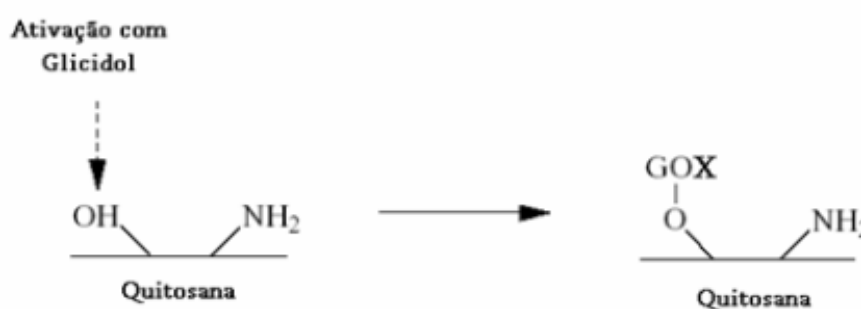


Figura 3.10. Esquema de imobilização, utilizando glicidol na ativação do suporte.

Estratégia XI: Apenas ativação com glutaraldeído 2 % (v/v) foi realizado nesta estratégia, seguido de imobilização da lipase. Na Figura 3.9 está representado o esquema dessa estratégia.

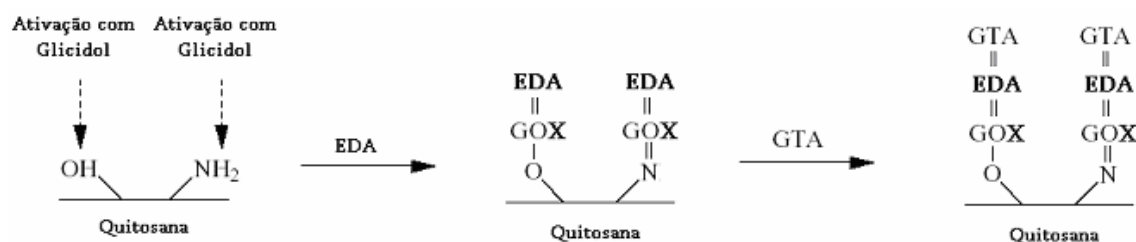


Figura 3.11. Esquema de imobilização, utilizando glicidol e EDA na ativação do suporte.

Estratégia XII: Ativação com glutaraldeído 2 % (v/v), seguido de ativação com glicidol 48 % (v/p) e oxidação dos grupos hidroxila terminais com NaIO₄. Em seguida foi realizada a ligação de um dos grupos amino da etilenodiamina aos grupos aldeídicos gerados no suporte, seguido de ativação adicional com glutaraldeído 5 % (v/v). Por último a lipase foi imobilizada ao suporte ativado. Na Figura 3.12 está representado o esquema dessa estratégia.

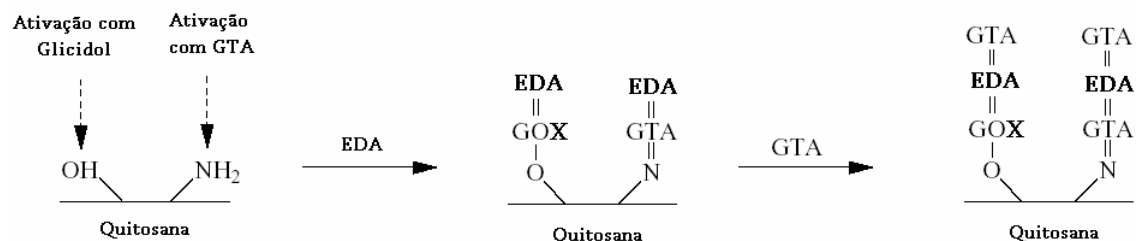


Figura 3.12. Esquema de imobilização, utilizando glicidol, glutaraldeído e EDA na ativação do suporte.

Para o compósito quitosana-alginato, foram estudadas as seis (06) últimas estratégias de imobilização, realizadas com quitosana (VI a XII). Ao final de cada estratégia (Figuras 3.5 a 3.12), imobilizou-se a lipase nos grupos aldeídicos do suporte gerados após as ativações, como mostrado na Figura 3.14. Várias ligações entre a enzima e o suporte acontecem de maneira que a enzima torna-se mais rígida e com menos possibilidade de ser inativada nas condições da reação.

A Figura 3.13 ilustra as reações entre a quitosana e os reagentes que participaram dos processos de ativação: glicidol, glutaraldeído e EDA.

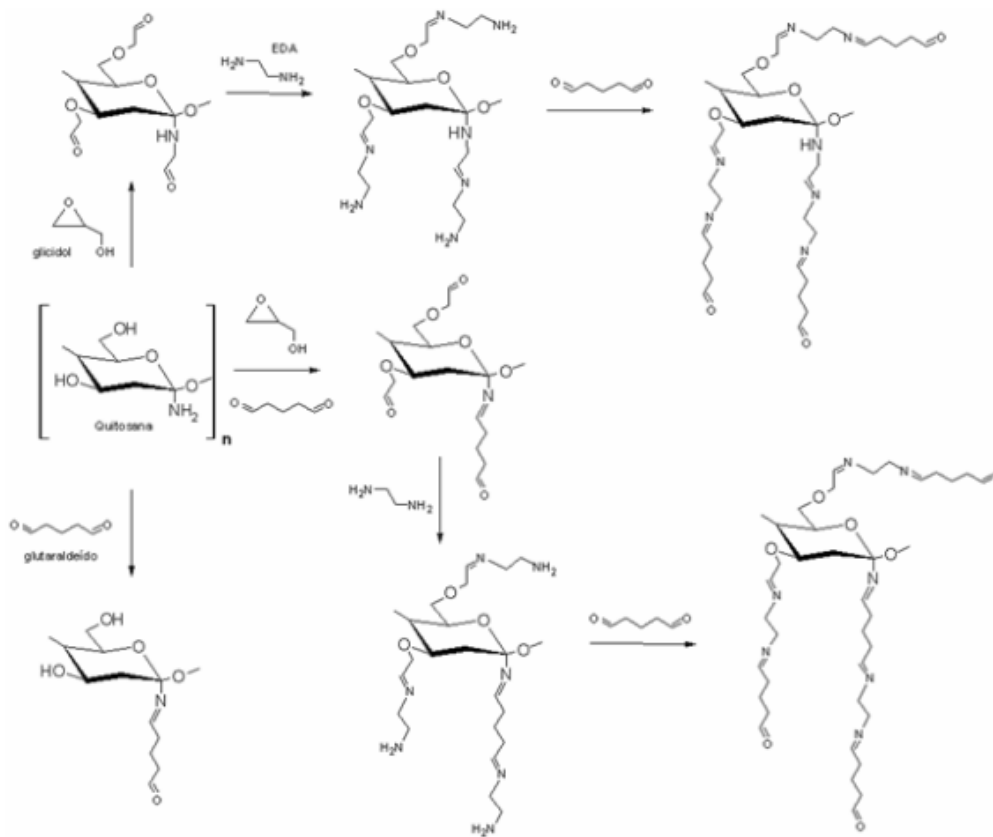


Figura 3.13. Reações de ativação da quitosana, com glicidol, glutaraldeído, EDA e uma combinação deles, realizadas neste trabalho.

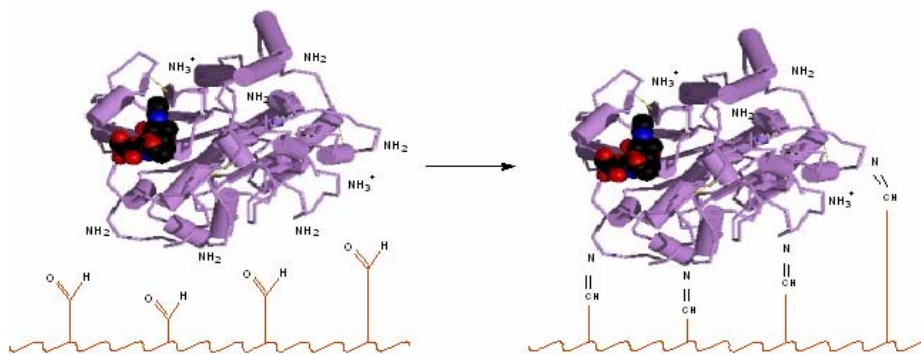


Figura 3.14. Reação de imobilização multipontual entre o grupos amino, presente na enzima, e os grupos aldeídicos presentes no suporte ativado.

3.2.7. Análise qualitativa da CALB por eletroforese

Inicialmente abre-se o sistema de suporte do gel, aplica-se um pouco de graxa de silicone na borracha do fundo do suporte, no apoio de borracha onde se apóia a placa e nos espaçadores. Posiciona-se a placa cavada no suporte do gel e

os espaçadores nas laterais, observando o encaixe da placa entre os espaçadores. Em seguida posiciona-se a placa retangular sobre os espaçadores, observando se a mesma está encaixada corretamente e se ambas as placas e os espaçadores estão bem apoiados na parte inferior do sistema, de modo que quando este estiver fechado, as peças fiquem apoiadas adequadamente no fundo do sistema de suporte do gel. Depois da placa fixada no suporte e o sistema fechado adiciona-se a mistura das soluções para preparação do gel de separação.

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, adiciona-se lentamente um pouco de solução de isopropanol sobre a solução do gel, para que a superfície deste fique plana e para evitar que a solução do gel fique em contato com o ar, já que a reação de polimerização é inibida pela presença de oxigênio. Espera-se que o gel polimerize por no mínimo 30min, removendo a solução de isopropanol, lavando a superfície do gel com H₂O MilliQ, que também é removida em seguida. Agora adiciona-se o gel de empilhamento sobre o gel de separação encaixando em seguida o pente para a formação dos poços onde serão aplicadas as amostras. Após 30 min, remove-se o pente cuidadosamente e lava-se a superfície do gel com H₂O MilliQ para remover possíveis resquícios não polimerizados da solução do gel.

O sistema é posicionado no interior da cuba aplicando-se as amostras (30 a 50µL). Enche-se lentamente o reservatório atrás do gel e a cuba com o tampão de corrida. A tampa é encaixada na cuba e os cabos conectados. Correntes de 15mA e de 20mA são utilizados para o gel de empilhamento e para o gel de corrida respectivamente. A corrida chega ao final quando o corante (front) estiver perto do final do gel, aproximadamente 4 ou 5mm. Ao término da corrida, desliga-se a fonte, desconectam-se os cabos e remove-se a tampa da cuba. As placas são removidas lentamente descolando o gel da outra

placa para em seguida colocá-la num recipiente com solução corante. Depois de 3 horas transfere-se o gel para outro recipiente com a solução descorante.

A preparação dos géis de separação e empilhamento estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Preparação dos géis de separação e de empilhamento para a eletroforese.

Gel de separação	Volume (mL)	Gel de empilhamento	Volume (mL)
Solução de acrilamida 30%	2,4	Solução de acrilamida 30%	0,5
Tampão de separação	0,9	Tampão de separação	1
Solução de SDS 10%	0,072	Solução de SDS 10%	0,04
Água MilliQ	3,468	Água MilliQ	2,26
TEMED	0,013	TEMED	0,012
Solução de PSA 1,5%	0,36	Solução de PSA 1,5%	0,2
Volume total	7,213	Volume total	4,012

3.2.8. Medida de atividade da lipase

As atividades hidrolíticas da CALB foram determinadas utilizando dois ésteres (pNPP e pNPB) como substratos, de acordo com a metodologia de Kordel *et al* (1991), com algumas modificações.

Para o pNPB, preparou-se uma solução 15 mM em 2-propanol. A 0,5 mL desta solução, adicionaram-se 4,5 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 8.0. Para essa mistura, deu-se o nome de solução de trabalho. A reação se iniciava com a adição de 2 mL de solução enzimática a 1 mL da solução de trabalho, a 25°C. A velocidade de hidrólise foi monitorada continuamente num comprimento de onda de 410 nm, em um espectrofotômetro por 1 minuto. Um branco, foi feito adicionando 2 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 8,0 a 1 mL de solução de trabalho, utilizado como referência para as análises. Neste trabalho

1U de atividade enzimática é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de pNPB por minuto a 25 °C e pH 8,0.

Para o pNPP, preparou-se uma emulsão misturando-se 1 volume de solução de pNPP 15 mM (preparado em 2-propanol) a 9 volumes de solução tampão tris-HCl 50mM, pH 8,0, contendo 0,4 % (p/v) de triton X-114 (emulsificante) e 0,1 % (p/v) de goma arábica (estabilizante). A reação foi iniciada com a adição de 2 mL de solução enzimática a 1 mL da emulsão previamente preparada. A velocidade de hidrólise foi monitorada continuamente em um comprimento de onda 410 nm, em um espectrofotômetro, por 1-5 minutos. Um branco, foi feito adicionando 2 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 8,0 a 1 mL de solução de trabalho, utilizado como referência para as análises. Neste trabalho 1U de atividade enzimática é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de pNPB por minuto a 25 °C e pH 8,0.

3.2.9. Medida de atividade do derivado (At_d)

Um volume de 29,0 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 8,0 foi adicionado a 1,0 mL de solução de pNPB 15 mM em 2-propanol a 25 °C num reator encamisado, sendo a reação iniciada com a adição de 0,030 g de derivado. A variação da absorbância a um comprimento de onda de 410 nm foi monitorado por 7,5 minutos (para isso retira-se aproximadamente 2 mL do sobrenadante a cada 1,5 minutos sendo lido imediatamente no espectrofotômetro).

3.2.10. Atividade recuperada (At_r)

A atividade recuperada foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$At_r = \frac{At_d}{At_t} * 100$$

A atividade teórica (A_t) é a diferença entre a quantidade de enzima, em termos de atividade (U/g-suporte), oferecida ao suporte e a atividade (U/g-suporte) remanescente no sobrenadante ao final da imobilização.

3.2.11. Rendimento de imobilização ($R_{imob}(\%)$)

O rendimento de imobilização foi calculado baseado na atividade da solução de enzima (sobrenadante) determinada no início ($Ativ_i$) e no final da imobilização ($Ativ_f$), utilizando a seguinte equação:

$$R_{imob}(\%) = \frac{Ativ_i - Ativ_f}{Ativ_i} * 100$$

3.2.12. Secagem dos derivados

Os derivados foram secos com hexano na presença de 3 % de ácido butírico. O ácido butírico foi adicionado ao solvente com a intenção de proteger o sítio ativo da enzima enquanto ela estivesse em contato com o mesmo. Para a etapa de secagem, adicionou-se um volume (mL) de solvente trinta vezes maior que o valor da massa (em gramas) de derivado. Esse procedimento foi realizado por três vezes por um período de 48 horas cada, sob agitação à 25°C. Após as secagens foram determinadas as atividades dos derivados como descrito na seção 3.2.8.

3.2.13. Estudo da estabilidade térmica à 60 °C

O estudo de estabilidade térmica da CALB livre foi realizada utilizando uma solução de lipase 2 % em tampão fosfato 100 mM, pH 8,0, e sua atividade foi determinada pela hidrólise do pNPB como descrita no item 4.2.7. A solução

foi mantida num banho-maria numa temperatura considerada drástica para a lipase (60 °C) por um período de 21 horas. Amostras foram retiradas durante esse período para a determinação da atividade residual no sobrenadante.

Para os derivados, a estabilidade térmica foi estudada utilizando-se 0,030 g de derivado, que foram colocados em frascos (ependorffs) contendo solução tampão fosfato 100 mM, pH 8,0. Os frascos foram mantidos em banho-maria a 60 °C por um período de 21 horas. Ao longo desse período foram retiradas alíquotas para a medida das atividades.

Em todos os casos, determinou-se a meia-vida do derivado (livre ou imobilizado), que representa o tempo em que metade da atividade do derivado/enzima é atingida em uma determinada condição. Aos dados de atividade em função do tempo, ajustou-se o modelo de decaimento exponencial de 1ª ordem, utilizando o software Origin versão 6.0. Com o modelo matemático e seu parâmetros, foi possível determinar a meia-vida do derivado, simplesmente encontrando o tempo necessário para que a atividade atingisse 50% do seu valor inicial. Fatores de estabilização (FE) foram obtidos como a razão entre o tempo de meia vida dos derivados e o tempo de meia vida da CALB livre.

3.2.14. Estudo da estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos derivados selecionados foi realizada submetendo a mesma massa de catalisador (0,030 g) a ciclos subseqüentes de reação de hidrólise de pNPB. A reação foi realizada em reator tipo batelada, mantido a 25 °C, sob agitação constante (ver seção 3.2.8). Entre um ciclo e outro, o derivado era lavado com tampão fosfato 100 mM, pH 8.0 para a remoção de produtos e substratos.

3.2.15. Planejamento fatorial 2²

Um planejamento fatorial utilizando o software STATÍSTICA versão 6.0 foi utilizado para se estudar a síntese de palmitato de retinila a partir de retinol e ácido palmítico. Em um primeiro momento, estudou-se a influência da temperatura e da razão entre os substratos no rendimento de síntese, utilizando o derivado J8, CALB imobilizada em quitosana. As Tabelas 3.2 e 3.3 mostram as variáveis e níveis do planejamento fatorial 2² e a matriz experimental utilizada. Nestes ensaios, utilizou-se uma concentração fixa de retinol (50 mM) e variou-se a concentração de ácido palmítico, de 150 mM a 250 mM. Ressalta-se que todos os ensaios foram conduzidos em duplicata e de forma aleatória.

Tabela 3.2. Variáveis e Níveis do planejamento fatorial 2²

Variável	Nível...	-1	+1
Temperatura (°C)		37	45
Razão entre os substratos		1:3	1:5

Tabela 3.3. Planejamento experimental 2²: Matriz experimental.

Experimento	Temperatura (°C)	Razão entre os substratos
1	37	1:5
2	45	1:5
3	37	1:3
4	45	1:3
5	37	1:5
6	45	1:5
7	37	1:3
8	45	1:3

Baseado nos resultados obtidos no planejamento selecionou-se a temperatura de 37°C para se avaliar a influência do derivado G10, lipase imobilizada em quitosana-alginato, nas reações utilizando as mesmas razões de substrato (1:3 e 1:5). Nestes ensaios, também se utilizou uma concentração fixa de retinol (50 mM) e variou-se a concentração de ácido palmítico, de 150 mM a 250 mM. Ressalta-se que todos os ensaios foram conduzidos em duplicata e de forma aleatória.

Esses dois derivados foram avaliados, pois eles foram os melhores em termos de atividade e estabilidade térmica e operacional, como está descrito nos resultados e discussões.

3.2.16. Síntese enzimática de ésteres de vitamina A

A reação de síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa, foi conduzida em um tubo fechado acoplado a um aparato giratório, contendo 0,1 mmol de retinol, 0,5 mmol de ácido palmítico, 0,100 g de biocatalisador e 2 mL de hexano. Para aumentar a conversão do retinol, a reação foi conduzida com excesso de ácido palmítico e com 50 mg de peneira molecular 4 A. A reação foi conduzida na ausência de oxigênio, a 37 °C, e protegida da luz. A reação foi processada por um período de até 45 horas (quando necessário), sendo em seguida o biocatalisador e a peneira molecular 4 A removidos por filtração.

O rendimento de síntese foi definido como a razão entre a concentração de palmitato de retinila produzido e a concentração inicial de retinol.

As melhores condições de síntese foram escolhidas tomando como parâmetro o rendimento da reação de síntese, com base no uso ou não de peneira molecular, e no tipo de lipase utilizada como biocatalisador.

3.2.17. Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa, partindo de retinol e ácido palmítico foram realizadas em HPLC utilizando uma coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Alíquotas de 20 μ L do meio reacional apropriadamente diluídas foram injetadas. Uma mistura de álcool isopropílico/metanol, 50/50 (v/v) foi usada como eluente a temperatura ambiente a um fluxo de 1 mL/min. Os produtos foram detectados usando um detector ultravioleta a 325nm. As amostras foram quantificadas por meio das curvas de calibração feitas com reagentes puros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação da atividade enzimática

Inicialmente, avaliou-se a atividade hidrolítica de lipase do tipo B de *C. antarctica* (CALB) livre frente a dois substratos diferentes, o butirato de p-nitrofenila (pNPB) e o palmitato de de p-nitrofenila (pNPP). Em ambos os ensaios, o produto de hidrólise era o p-nitrofenol (pNP). Portanto, para se determinar a concentração do produto formado, construiu-se uma curva de calibração, representada no Anexo A. A concentração de enzima utilizada na hidrólise de pNPB foi $1,08 \times 10^{-3}$ mg de proteína por mL de solução enzimática. Na hidrólise de pNPP, utilizou-se 1,08 mg de proteína por mL de solução enzimática, pois necessitou-se de uma quantidade maior de enzima para que o pNP fosse bem detectado. A Tabela 4.1 apresenta os resultados de atividade enzimática frente aos dois substratos avaliados.

Tabela 4.1: Valores de atividade da CALB frente a butirato de p-nitrofenila (pNPB) e palmitato de de p-nitrofenila (pNPP)

Substrato	Atividade da CALB (U/mL)
pNPB	$97,55 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^3$
pNPP	$45,49 \pm 1,9$

Podemos observar na Tabela 4.1 que o valor da atividade enzimática quando o substrato era o pNPB foi aproximadamente 2000 vezes maior que o do pNPP. Este resultado indica que a CALB apresenta uma maior afinidade pelo pNPB, um éster de cadeia curta, do que pelo pNPP. Isto está de acordo com a literatura (Vaysse *et al*, 2002) que diz que a CALB apresenta uma maior afinidade por substratos (ésteres de ácido graxo) de cadeia curta. Como a determinação de atividade da CALB utilizando o pNPB foi mais simples e

apresentou maior sensibilidade, esta reação foi escolhida para a realização dos estudos posteriores.

4.2. Análise qualitativa da CALB por eletroforese

A análise qualitativa da enzima CALB foi realizada por eletroforese. Foram comparados os tempos de migração dos padrões com os tempos de migração das substâncias presentes na amostra de enzima. A Figura 4.1 mostra as corridas de análise da CALB. Na primeira faixa, pode-se observar o padrão utilizado, ou seja, proteína de soro bovino (BSA) com massa molar de 66 kDa (Boyle *et al*, 2007). As duas outras faixas mostram preparações enzimáticas do extrato bruto de CALB (massa molar de 33 kDa), em diferentes concentrações, 2 % e 4 %, respectivamente.

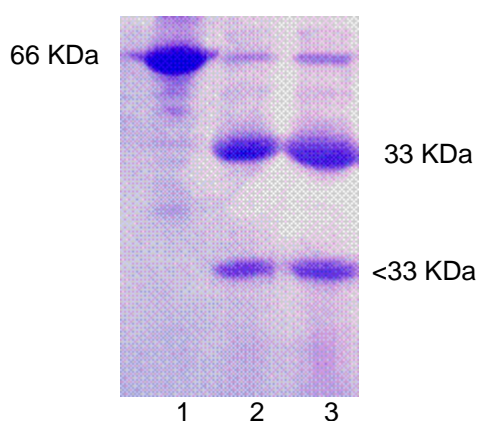


Figura 4.1: Eletroforese capilar da preparação enzimática de CALB: Faixa 1 – padrão proteína de soro bovino (BSA) com massa molar de 66 kDa; Faixas 2 e 3: preparado enzimático em diferentes concentrações, 2 % e 4 %, respectivamente.

Pôde-se observar (Figura 4.1), que a preparação enzimática contém, além da CALB, duas proteínas de tamanhos moleculares diferentes, uma com massa molar em torno de 66 kDa e outra menor que 33 kDa. No processo de imobilização essas proteínas, podem interferir na imobilização se ligando antes

do que a CALB ao suporte, e assim preenchendo os grupos reativos do suporte.

4.3. Perfil de imobilização da lipase em glioxil-agarose

A Figura 4.2 apresenta o perfil de imobilização da lipase do tipo B de *C. antarctica* (CALB) em agarose CL-8B, realizada em reator encamisado mantido a temperatura de 18 °C por um período de 4 horas. Pode-se observar que a atividade no sobrenadante diminui rapidamente ao longo do tempo até 2,5 horas, quando permanece constante. No entanto um tempo maior é necessário para que mais ligações entre a enzima e o suporte sejam feitas e estabilizadas.

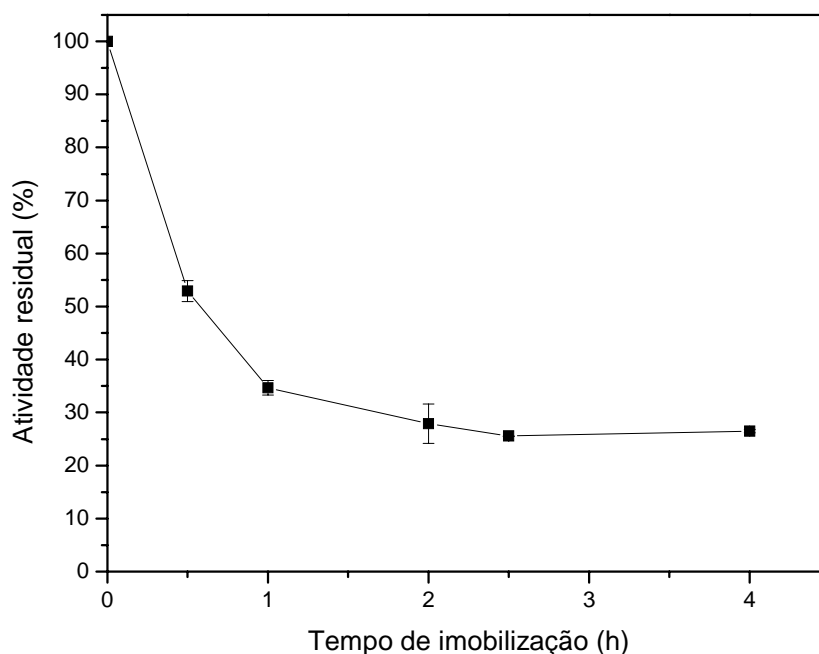


Figura 4.2: Perfil da imobilização de CALB em glioxil-agarose 8BCL, em tampão fosfato 100 mM, pH 10,5, T=18 °C, sob agitação suave por 4 horas. A atividade inicial do sobrenadante é 124,97 U/mL de enzima. A quantidade de proteína (Bradford) oferecida ao suporte foi 1,8 mg /g de suporte. O rendimento da imobilização foi de 76,00 %.

4.4. Estudo da imobilização de lipase em quitosana

Diversas estratégias de imobilização, descritas na seção 3.2.6, foram estudadas para a imobilização de lipase em quitosana, com o objetivo de se obter um derivado com alta atividade, boa estabilidade operacional, boa estabilidade térmica (60 °C) e boa estabilidade à estocagem (8 °C). A Tabela 4.2 mostra os resultados obtidos, nela são enfatizados os parâmetros: atividade do derivado (At_d) e rendimento de imobilização (R_{imob}).

Tabela 4.2: Parâmetros de imobilização de CALB em quitosana ativada por diversas estratégias (atividade do derivado (At_d), atividade recuperada (At_r) e rendimento de imobilização (R_{imob})) e atividade do sobrenadante antes (At_i) e após a imobilização (At_f). Condições de imobilização: 10 mL de solução enzimática, em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05, foram colocados em contato com 1 g de suporte a 25 °C durante 6 horas.

Estratégia de imobilização	At_i (U/mL)	At_f (U/mL)	At_d (U/g)	At_r (%)	R_{imob} (%)
GLI-GLU (II)	129,64 ± 3,89	83,30 ± 2,50	139,49 ± 10,5	30,10	35,74
GLI-GLU (III)	157,30 ± 4,72	109,41 ± 3,28	0,00 ± 0,0	0,00	30,46
GLI-GLU (IV)	109,89 ± 3,30	95,77 ± 2,67	129,44 ± 11,5	91,64	12,85
GLU-GLI (V)	157,45 ± 3,66	114,15 ± 2,67	15,07 ± 1,3	3,48	27,50
FORM-GLI (VI)	126,30 ± 3,79	88,47 ± 2,23	0,00 ± 0,0	0,00	29,95

GLI-GLU: Ativação utilizando glicidol 48 % (v/p), seguido de glutaraldeído 1 % (v/v). GLU-GLI: Ativação utilizando glutaraldeído 1 % (v/v) seguido de glicidol 48 % (v/p). FORM-GLI: Ativação utilizando formaldeído 1 % (v/v) seguido de glicidol 48 % (v/p).

Analisando a Tabela 4.2 e 4.3, pode-se ver que os rendimentos de imobilização das estratégias II a VI e X foram os mais baixos, resultando conseqüentemente, em baixas atividades do derivado. Estes resultados podem ser explicados como segue.

Na estratégia II as moléculas de glicidol reagiram tanto com os grupos hidroxila como com os grupos amino da quitosana. Desta forma, não havia, ou havia poucos, grupos amino na quitosana após a ativação com glicidol para

que o glutaraldeído se ligasse. Os grupos aldeídicos resultantes da ativação com glicidol possuem baixa reatividade, quando comparados com os mesmos grupos da molécula de glutaraldeído, cuja reatividade permite reação com mais grupos da enzima. Portanto, a CALB se ligou muito pouco a esse suporte ativado com glicidol. Além da baixa reatividade, a grande concentração de grupos aldeídicos no suporte pode permitir sua interligação (reação de Aldol) (Allinger *et al*, 1976), o que ocasionaria a inativação desses grupos.

Quando a estratégia III foi adotada para ativar a quitosana, pôde-se observar que a atividade do derivado foi nula. Com esta estratégia, glicidol e glutaraldeído não reagiram com o suporte, pois a adição concomitante dos dois reagentes permitiu a reação entre essas moléculas em solução, e conseqüente inativação das mesmas para reagirem com o suporte. Já na estratégia IV os grupos hidroxila da quitosana foram ativados com glicidol, em seguida ligados a CALB nos grupos glioxil gerados. Numa segunda etapa, com o mesmo suporte, glutaraldeído é utilizado para ativação dos grupos amino que se acreditava ainda existirem livres na quitosana, para uma posterior adição de mais enzima. A baixa atividade obtida com este derivado pode ser explicada pela pouca reatividade da CALB com os grupos glioxil gerados e pelo ataque aos grupos amino da enzima pelo glutaraldeído causando uma inativação da mesma.

Na estratégia V, o processo de ativação foi iniciado com a adição de glutaraldeído, seguido de glicidol. Os baixos resultados obtidos com essa estratégia podem ter sido causados tanto pela baixa concentração de glutaraldeído utilizada (1 % v/v), como pela reação de Aldol que acontece entre grupos com terminações aldeídicas, caso que ocorre com o grupo glioxil, gerado no suporte, com o grupo glutaraldeído ligado ao suporte.

Na estratégia VI, utilizou-se formaldeído com o objetivo de reticular a quitosana, tornando-a mais hidrofóbica, através da ligação deste agente aos grupos amino da quitosana, como também impedir a ligação do glicidol aos grupos amino, tornando apenas os grupos hidroxila disponíveis para a sua ligação. No entanto, valores nulos de atividade observados no derivado

mostraram que esta estratégia não obteve êxito. Estes resultados obtidos podem ter sido devido à baixa reatividade dos grupos glioxil com os grupos amino remanescentes da CALB, e/ou por uma reticulação excessiva, tornando os grupos hidroxila da quitosana inacessíveis à ligação com glicidol, por impedimento estérico.

Em paralelo a estas estratégias de imobilização, enzima foi colocada num reator sob as mesmas condições de imobilização na ausência dos suportes. Pretendia-se observar quanto de enzima era inativada ao longo das 6 horas. Verificou-se que em média 18,00 % da atividade enzimática era perdida. Com isso, pode-se explicar o rendimento de imobilização, em torno de 30,00 %, daquelas estratégias que obtiveram atividade de derivado nula. Nesses casos pode não ter havido imobilização e sim perda de atividade acompanhada de adsorção da enzima durante o período de reação, sendo após a lavagem desorvida do suporte tornando o derivado inativo (sem enzima).

Baseado nos resultados obtidos com as estratégias II a VI, estudou-se outras estratégias. Como o glicidol se liga tanto aos grupos hidroxila, como aos grupos amino da quitosana, aumentou-se a quantidade de glicidol para garantir que todos os grupos amino e hidroxila da quitosana fossem ocupados. Na estratégia X, ativou-se a quitosana com glicidol 72 % (v/p) da massa inicial de suporte. No entanto, como se pode observar pela Tabela 4.3, os resultados de atividade do derivado, atividade recuperada e rendimento foram muito baixos. Dois fatores podem ter colaborado para tal fato: os grupos glioxil resultantes da ativação são poucos reativos à enzima e eles podem reagir entre si tornando-se inativos, impedindo a etapa de imobilização. A grande concentração de grupos aldeídicos no suporte pode permitir sua interligação, reação de Aldol, o que ocasiona a inativação desses grupos (Allinger *et al.*, 1976).

Tabela 4.3: Parâmetros de imobilização de CALB em quitosana ativada por diversas estratégias (atividade do derivado (At_d), atividade recuperada (At_r) e rendimento de imobilização (R_{imob})) e atividade do sobrenadante antes (At_i) e após a imobilização (At_f). Condições de imobilização: 10 mL de solução enzimática, em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05, foram colocados em contato com 1 g de suporte a 25 °C durante 6 horas.

Estratégia de imobilização	At_i (U/mL)	At_f (U/mL)	At_d (U/g)	At_r (%)	R_{imob} (%)
GLU5 (VII)	117,56 ± 3,53	29,65 ± 0,89	277,77 ± 33,90	31,60	74,78
GLU2-GLI-EDA-GLU (VIII)	133,50 ± 4,01	57,10 ± 1,71	286,85 ± 23,80	37,54	57,26
GLI-EDA-GLU (IX)	133,14 ± 4,00	65,17 ± 1,95	422,44 ± 50,40	62,16	51,05
GLI (X)	144,43 ± 4,33	121,50 ± 3,65	6,17 ± 0,80	2,69	15,82
GLU2 (XI)	117,50 ± 3,53	47,59 ± 1,43	394,49 ± 39,20	56,43	59,52
GLU5-GLI-EDA-GLU (XII)	125,37 ± 3,76	6,85 ± 0,21	413,72 ± 40,80	39,91	94,54
Novozyme 435	-	-	529,78 ± 11,70	-	-

GLU5: Ativação com glutaraldeído 5 % (v/v). GLU-GLI-EDA-GLU: Ativação com glutaraldeído 5 % (v/v), seguido de ativação com glicidol 48 % (v/p), ligação com etilenodiamina entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v). GLI-EDA-GLU: Ativação com glicidol 72 % (v/p), ligação de com etilenodiamina entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v). GLI: Ativação com glicidol 72 % (v/p). GLU2: Ativação com glutaraldeído 2 % (v/v). GLU2-GLI-EDA-GLU: Ativação com glutaraldeído 2 % (v/v), seguido de ativação com o glicidol 48 % (v/p), ligação com etilenodiamina entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v).

Nas estratégias VII e XI, utilizaram-se, respectivamente, 5 % (v/v) e 2 % (v/v) de glutaraldeído como agente ativante. As duas estratégias apresentaram bons resultados: atividade do derivado (acima de 270 U/g) e bom rendimento de imobilização (acima de 50%). Utilizando a concentração 5 %, conseguiu-se um melhor rendimento de imobilização, 74,78% comparado a 59,52%, no entanto a atividade do derivado foi menor do que quando se utilizou a concentração de 2 %, 277,77 U/g comparado a 394,49 U/g. Esperavam-se que maiores rendimentos de imobilização resultassem em maiores cargas enzimáticas no suporte, uma vez que uma maior quantidade de moléculas de enzima não foi detectada no sobrenadante. No entanto, deve-se ressaltar que um sistema contendo altas cargas de enzima pode estar sujeito a limitações difusionais e impedimento estérico. No primeiro caso, a velocidade da reação

de hidrólise, usada para a determinação da atividade, é governada não só pela cinética, mas pela barreira que o substrato precisa vencer para chegar ao sítio ativo da enzima. Em muitos casos, a própria molécula de enzima funciona como uma barreira à difusão (Gonçalves et al., 1997). O impedimento estérico se caracteriza pela dificuldade de acesso da molécula de substrato ao sítio ativo uma vez que a enzima possa estar imobilizada com uma orientação equivocada, ou seja, com o sítio ativo inacessível (Trevan, 1980).

A estratégia IX, na qual se utilizou 72 % (v/p), da massa inicial de suporte, de glicidol para ativar os grupos da quitosana, seguido de ligação de EDA aos grupamentos glioxil gerados e, finalmente, ligação de glutaraldeído 5 % (v/v) aos grupos amino, mostrou-se a melhor estratégia de imobilização, levando-se em consideração a atividade do derivado, que foi de 422,44 U/g-suporte. Os grupos glioxil disponíveis no suporte são pouco reativos para a ligação aos grupos amino da molécula de enzima, devido à dificuldade de acesso tanto do próprio grupo glioxil como dos grupamentos amino da enzima. No entanto a ligação às moléculas de EDA ocorre mais facilmente pelo seu maior acesso aos grupos aldeídicos do suporte, por serem moléculas menores e caracteristicamente mais reativas comparada aos grupos amino da molécula de enzima. Finalmente, ligou-se glutaraldeído a outra extremidade do EDA, tornando o suporte bastante reativo para a imobilização da enzima.

As estratégias VIII e XII seguiram o mesmo procedimento de ativação da estratégia IX, sendo que a única diferença foi a ativação inicial realizada com glutaraldeído, 5 % (v/v) e 2 % (v/v), respectivamente. Altas cargas de enzima foram obtidas nos derivados (acima de 280 U/g) quando estas duas estratégias de imobilização foram utilizadas. Quando se utilizou a estratégia XII, obteve-se maior rendimento de imobilização (94,54 %) e alta atividade enzimática do derivado (413,72 U/g-suporte). Essas estratégias de imobilização fizeram com que a quitosana se tornasse muito hidrofóbica, pois uma grande cadeia hidrocarbônica é gerada no final do processo de ativação. As lipases têm grande afinidade por substâncias apolares, o que pode ter aumentado muito o rendimento de imobilização na estratégia XII. Resultados semelhantes eram

esperados para a estratégia VIII, porém não foi o observado. A concentração inicial de glutaraldeído (2 %) pode ter influenciado o processo de imobilização da lipase, por haver menor disponibilidade de sítios de ligação entre o suporte e a enzima devido à menor concentração.

4.5. Estudo da imobilização de lipase em quitosana-alginato

As cinco melhores estratégias de imobilização obtidas utilizando a quitosana como suporte, considerando apenas alta atividade enzimática por grama de suporte, foram repetidas para o compósito quitosana-alginato. Para efeito de comparação, uma estratégia utilizando apenas glicidol como agente ativante também foi realizada. A Tabela 4.4 mostra os resultados obtidos para a imobilização de CALB em quitosana-alginato em diferentes condições de ativação.

Apesar do compósito quitosana-alginato apresentar uma menor quantidade de grupos amino, o objetivo de se utilizar esse suporte para imobilizar enzimas, neste trabalho, foi avaliar resultados de estabilidade térmica e operacional, bem como atividades enzimática por grama de suporte. Como o gel polieletrólito formado entre quitosana e alginato é mais resistente, esperava-se que ele tivesse maior resistência mecânica e, conseqüentemente, maior estabilidade.

A Tabela 4.4 mostra os dados experimentais de imobilização de CALB em quitosan-alginato, para diferentes estratégias de ativação do suporte. Pode-se observar que, na maioria dos ensaios de imobilização, o comportamento desse suporte foi diferente do comportamento do derivado preparado apenas com quitosana.

Tabela 4.4: Parâmetros de imobilização de CALB em quitosana-alginato ativada por diversas estratégias (atividade do derivado (A_{td}) atividade recuperada (A_{tr}) e rendimento de imobilização (R_{imob})) e atividade do sobrenadante antes (A_{ti}) e após a imobilização (A_{tf}) e Condições de imobilização: 10 mL de solução enzimática, em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05, foram colocados em contato com 1 g de suporte a 25 °C durante 6 h.

Estratégia de imobilização	A_{ti} (U/mL)	A_{tf} (U/mL)	A_{td} (U/g)	A_{tr} (%)	R (%)
GLU5(VII)	111,72 ± 3,35	53,10 ± 1,60	268,96 ± 3,20	45,88	52,47
GLU-GLI-EDA-GLU (VIII)	125,30 ± 3,76	39,10 ± 1,17	179,21 ± 9,70	20,79	68,80
GLI-EDA-GLU (IX)	173,21 ± 5,20	121,70 ± 3,65	167,67 ± 5,70	32,55	29,74
GLI (X)	144,52 ± 4,34	92,84 ± 2,79	27,59 ± 2,390	5,34	35,76
GLU2 (XI)	121,22 ± 3,64	23,14 ± 0,69	378,30 ± 34,70	38,57	80,91
GLU2-GLI-EDA-GLU (XII)	117,07 ± 3,51	18,59 ± 0,56	270,94 ± 1,30	27,51	84,12

GLU5: Ativação com glutaraldeído 5 % (v/v). GLU-GLI-EDA-GLU: Ativação com glutaraldeído 5 % (v/v), seguido de ativação com glicidol 48 % (v/p), ligação com etilenodiamina entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v). GLI-EDA-GLU: Ativação com glicidol 72 % (v/p), ligação com etilenodiamina, entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v). GLI: Ativação com glicidol 72 % (v/p). GLU2: Ativação com glutaraldeído 2 % (v/v). GLU2-GLI-EDA-GLU: Ativação com glutaraldeído 2 % (v/v), seguido de ativação com o glicidol 48 % (v/p), ligação com etilenodiamina entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v).

O derivado obtido utilizando a estratégia X sofreu ativação apenas com glicidol 72 % (v/p) da massa inicial de suporte, seguida de oxidação dos grupos gliceril gerados, e finalmente, imobilização da lipase ao suporte ativo, que apresentou baixa atividade, devidos aos mesmos motivos já discutidos anteriormente para o derivado preparado com quitosana.

As estratégias que permitiram a obtenção de derivados com maior atividade foram as VII e XI, nas quais se utilizou glutaraldeído como agente ativante, nas concentrações de 5 % e 2 %, respectivamente, e a estratégia XII, ativação com glutaraldeído 2 % (v/v), seguida de ativação com glicidol 48 %

(v/p) da massa inicial de suporte, ligação de EDA ao grupo glioxil gerado e por ultimo ativação com glutaraldeído. Cabe ressaltar aqui que a estratégia XI foi a que permitiu obtenção de derivado com maior atividade (378,30 U/g-suporte) e o segundo melhor rendimento de imobilização (80,91 %).

Comparando as mesmas estratégias de imobilização para a preparação de derivados utilizando os dois suportes, pôde-se observar que, na maioria dos casos, a quitosana mostrou ser o melhor suporte levando em consideração apenas as atividades dos derivados. A única exceção foi para a preparação de derivados utilizando a estratégia X, quando o compósito apresentou melhor resultado de atividade no derivado, 27,59 U/g (quitosana-alginato) comparado a 6,17 U/g (quitosana). No entanto, essa atividade foi uma das menores obtida, indicando que esta estratégia não é adequada para a preparação do biocatalisador.

4.6. Secagem dos derivados

Os melhores derivados, considerando atividade enzimática por grama de suporte, foram selecionados para estudos de estabilidade térmica, estabilidade operacional e desempenho na síntese de palmitato de retinila, a partir de retinol e ácido palmítico. Antes de realizar estes estudos, fez-se uma etapa de secagem dos derivados para a remoção de água. A Tabela 4.5 mostra os derivados selecionados e a atividade enzimática antes e após o processo de secagem utilizando hexano, por 6 dias a temperatura ambiente. Podemos observar que, após a secagem, a atividade de todos os derivados diminuiu aproximadamente à metade da inicial.

Tabela 4.5: Atividade dos derivados antes At_0 (U/g) e depois At_f (U/g) da secagem com hexano.

Derivado	Suporte	Estratégia de imobilização	At_0 (U/g)	At_f (U/g)
J8	quitosana	IX	422,44	211,23
J10	quitosana	XI	394,49	205,23
J11	quitosana	XII	413,72	210,36
G10	quitosana-alginato	XI	378,30	190,86

J8: Derivado de quitosana que seguiu ativação com glicidol 72 % (v/p), ligação com etilenodiamina, entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v). J10: Derivado de quitosana que seguiu ativação com glutaraldeído 2 % (v/v). J11: Derivado de quitosana que seguiu ativação com glutaraldeído 2 % (v/v), seguido de ativação com o glicidol 48 % (v/p), ligação com etilenodiamina entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v). G10: Derivado de quitosana-alginato que seguiu ativação com glutaraldeído 2 % (v/v).

Outros autores (Blanco et al., 2004), ao estudar a imobilização de CALB em sílica de porosidade controlada, também observaram perda de atividade ao secar o derivado com acetona, mesmo quando o processo foi realizado por curtos períodos de tempo. Para evitar a perda de atividade, os autores sugerem a adição de albumina, polietilenoglicol ou outros polímeros durante a etapa de secagem, com o objetivo de proteger a enzima. Whetje et al. (2003) relatam que a perda de atividade está também relacionada com a quantidade de água retirada do biocatalisador. Portanto, um estudo do comportamento da atividade ao longo do tempo de secagem deve ser realizado, bem como uma avaliação da adição de aditivos para a proteção da enzima.

4.7. Estabilidade térmica dos derivados a 60 °C

Os derivados produzidos a partir das estratégias IX, XI e XII, utilizando quitosana como suporte, e o derivado produzido a partir da estratégia XI, utilizando o compósito quitosana-alginato, foram submetidos a ensaios de estabilidade térmica a 60 °C, por até 21 horas e avaliados quanto a atividade ao longo desse tempo. Estes resultados, ver Figura 4.3, foram comparados

com a estabilidade da enzima livre e de um biocatalisador comercial (Novozyme 435), na mesma temperatura. Para cada ensaio de estabilidade térmica, determinou-se o tempo de meia vida, bem como o fator de estabilização, em relação à meia-vida da enzima livre.

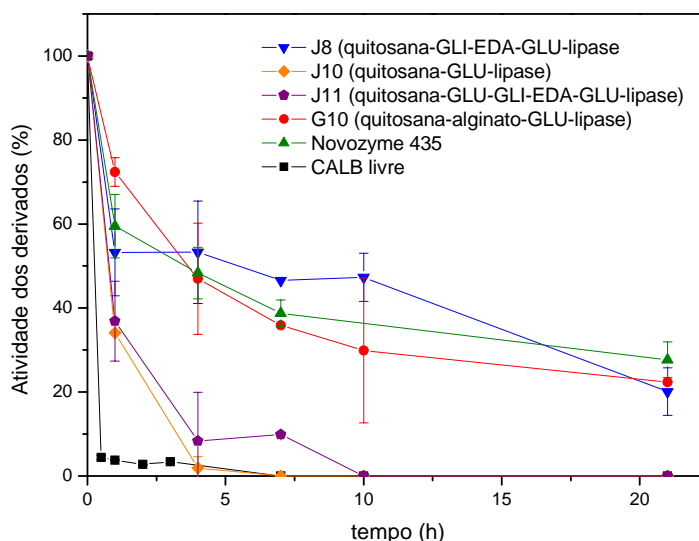


Figura 4.3.: Curvas de desativação térmica a 60 °C e pH 8,0 para a CALB livre e immobilizada em diferentes suportes: enzima livre $At_i = 1945,69$ U/mL (■), Novozyme 435 $At_i = 529,78$ U/g (▲), CALB immobilizada em quitosana utilizando a estratégia IX - derivado J8 $At_i = 211,23$ U/g (▼), CALB immobilizada em quitosana utilizando a estratégia XI - derivado J10 $At_i = 205,23$ U/g (◆), CALB immobilizada em quitosana utilizando a estratégia XII - derivado J11 $At_i = 210,36$ U/g (◆) e CALB immobilizada em quitosana-alginato utilizando a estratégia XI - derivado G10 $At_i = 190,86$ U/g (●). As linhas representam as tendências dos dados experimentais.

Analisando a Figura 4.3 fica evidente que a estabilidade térmica dos derivados frente a enzima solúvel, é bem melhor. A enzima quando está na sua forma solúvel, apresenta certa flexibilidade, que faz com que seu sítio ativo sofra mudanças conformacionais muitas vezes irreversíveis, tornando-a inativa. Quando immobilizada, ela se encontra numa forma mais rígida, devido as suas

ligações ao suporte. Essa rigidez diminui a flexibilidade da enzima mantendo a forma do sítio ativo, que é responsável por sua atividade (Trevan, 1980).

Comparando os perfis de decréscimo de atividade dos derivados preparados neste trabalho (J8 e G10) com o derivado comercial (Novozyme 435), pode-se observar que as atividades dos três derivados decrescem de maneira semelhante, dentro do erro experimental (Figura 4.3).

A Tabela 4.6 mostra os resultados de desativação térmica a 60 °C da CALB livre, de um biocatalisador comercial (Novozyme 435), e de biocatalisadores preparados neste trabalho (derivados J8, J10, J11 e G10). O derivado que apresentou melhor fator de estabilização foi o G10, CALB imobilizada em quitosana-alginato, sendo aproximadamente 29 vezes mais estável que a enzima solúvel, e mais de 2 vezes mais estável do que a enzima comercial Novozyme 435. O derivado J8, CALB imobilizada em quitosana, foi o terceiro mais estável com 10,25 de fator de estabilização. Os derivados J10 e J11 apresentaram fator de estabilização baixo. Estes resultados levaram à escolha dos biocatalisadores J8 e G10 para estudos posteriores de síntese de palmitato de retinila (uma reação de esterificação), bem como estudos de estabilidade operacional de hidrólise.

A estabilidade desses derivados em temperaturas elevadas nos diz o quanto a enzima sofreu mudanças em seu sítio ativo, através da perda de atividade (Trevan, 1980) Tanto a enzima pode ter sofrido mudanças em sua estrutura por influencia direta da temperatura como ela pode ter sido retorcida por uma mudança na estrutura do suporte. Como o gel quitosana-algintato tem uma maior estabilidade mecânica, isso provavelmente contribuiu para que o derivado G10 apresentasse uma maior estabilidade térmica.

Tabela 4.6: Desativação térmica a 60 °C e pH 8,0, da CALB, Novozyme 435, derivado J8 e derivado G10, por um período de até 21 horas.

Biocatalisador	$t_{1/2}$ (h)	Fator de estabilização (FE)
CALB livre	0,11	1,00
Novozyme 435	2,19	19,91
J8	1,13	10,25
J10	0,65	5,88
J11	0,67	6,13
G10	3,22	29,26

4.8. Estabilidade operacional de derivados na reação de hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila (pNPB)

A Figura 4.4 mostra o estudo de estabilidade operacional dos derivados J8, G10 e da Novozyme 435, utilizando como modelo reações subseqüentes de hidrólise de hidrólise do pNPB, a pH 8,0 e temperatura ambiente. Após 16 ciclos de 8 minutos cada, observou-se que o derivado G10 foi o que teve uma maior queda em atividade, mostrando que esse derivado tem uma menor estabilidade operacional em relação aos outros dois. Já o derivado J8 apresentou estabilidade semelhante ao derivado comercial. Assim, pode-se concluir que esse derivado, CALB imobilizada em quitosana, pode ser utilizado tão bem quanto o derivado comercial em reações de hidrólise.

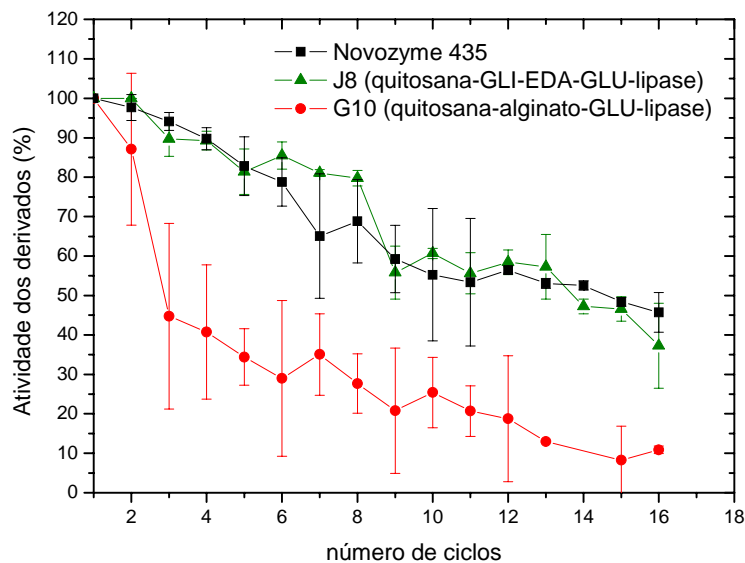


Figura 4.4.: Estabilidade operacional na hidrólise do pNPB para Novozyme 435, derivado J8 (quitosana ativado com glicidol 72 % (v/p), ligado com etilenodiamina entrecruzada com glutaraldeído 5 % (v/v)) e derivado G10 (quitosana-alginato ativado com com glutaraldeído 2 % (v/v)). Cada ciclo teve duração de 8 minutos, na temperatura de 25 °C e pH 8,0

4.9. Síntese enzimática de ésteres de vitamina A utilizando lipase imobilizada

4.9.1. Influencia do tipo de lipase e da peneira molecular

Ensaio de síntese de palmitato de retinila (vitamina A) foram realizados para avaliar a influencia da fonte da lipase e do uso de peneira molecular no rendimento de síntese. Inicialmente, dois derivados comerciais foram avaliados, Lipozyme RM e Lipozyme TL, bem como lipase do tipo B de *Candida antarctica* imobilizada em agarose (CALB-A). A Tabela 4.7 mostra o consumo de retinol e produção de palmitato de retinila após 45 horas de reação sob agitação, protegida da luz e na ausência de oxigênio. O rendimento de

síntese foi definido como a razão entre a concentração de palmitato de retinila produzido e a concentração inicial de retinol. Realizou-se um ensaio, aqui denominado branco, nas mesmas condições da síntese enzimática, mas sem a adição do biocatalisador. Neste ensaio, não se observou formação de produto, confirmando que a presença de enzima como catalisador é fundamental.

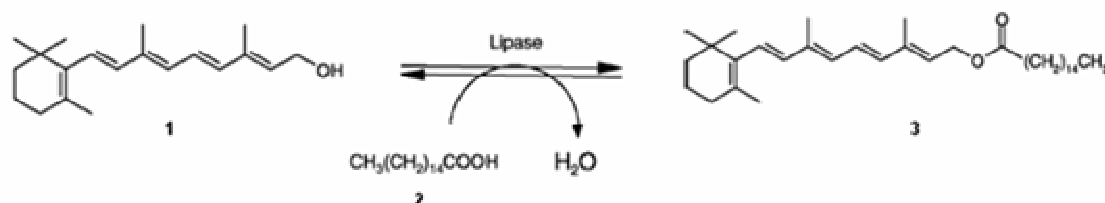


Figura 4.5.: Síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa.

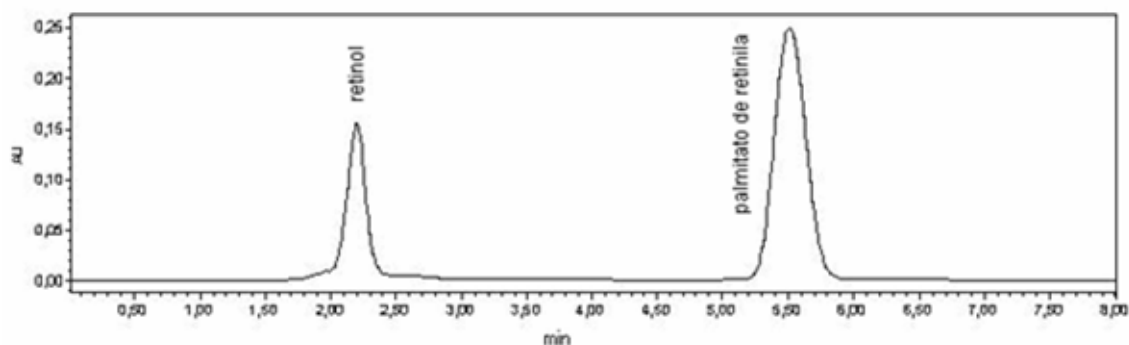


Figura 4.6.: Análise cromatográfica da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa mostrando o reagente limitante (retinol) e o produto.

Pode-se observar pelos resultados mostrados na Tabela 4.7 que os melhores resultados de rendimento, na ausência de peneira molecular, foram obtidos quando se utilizou o derivado Lipozyme RM, com rendimento de 48,76 %, seguida da Lipozyme TL, com 36,05 %. Quando se utilizou CALB-A como catalisador, um baixo rendimento de síntese foi alcançado, aproximadamente 7%.

Tabela 4.7. Produção de palmitato de retinila a 37 °C, após 45 horas de reação sob agitação, protegidos da luz e na ausência de oxigênio. Concentração inicial de retinol: 50 mM, concentração inicial de ácido palmítico: 250 mM, quantidade de enzima imobilizada: 100 mg. *Para os derivados J8 e G10 a reação teve duração de 24 horas.

Enzima imobilizada	Rendimento (%) sem peneira molecular	Rendimento (%) com peneira molecular
CALB-A	7.21	53.17
Lipozyme RM	48.76	63.93
Lipozyme TL	36.05	68.25
J8*	-	61,47
G10*	-	57,78

Este resultado pode ter sido causado pela grande quantidade inicial de água presente neste suporte, uma vez que ele não passou por nenhum processo de secagem. Esta hipótese pôde ser confirmada pelo rendimento obtido na presença de peneira molecular, que tinha por objetivo retirar a água do meio reacional formada durante a reação. A conversão utilizando CALB-A passou de 7,21% para 53,17% quando a peneira molecular foi adicionada ao meio reacional. A adição de peneira molecular também elevou os rendimentos de síntese quando Lipozyme RM e TL foram utilizadas, que passaram de 48,76% para 63,93% e de 36,05% para 68,25%, respectivamente. A retirada da água formada durante a reação de esterificação desloca o equilíbrio da reação favorecendo a formação do produto. Portanto, todos os ensaios subseqüentes foram realizados na presença da peneira molecular. A temperatura de 37 ° C foi escolhida, pois esta é a temperatura ótima da CALB (Castro *et al.*, 2001).

Maugard *et al.* (2000 e 2002), observaram uma melhora no rendimento de síntese de derivados de vitamina A quando utilizou peneira molecular 4 A para retirar água formada durante a reação. Rejasse *et al.* (2003) utilizaram

peneira molecular 3 A para secar os solventes utilizados na síntese de derivados de vitamina A, obtendo bons resultados.

Melhores resultados (rendimentos) foram obtidos quando se utilizaram Lipozyme TL e Lipozym RM, respectivamente, 68,25% e 63,93%. No entanto, o biocatalisador J8, imobilizado neste trabalho, apresentou um desempenho semelhante aos derivados comerciais, uma vez que um bom rendimento em palmitato de retinila foi atingido (61,47%). Os outros biocatalisadores preparados neste trabalho também apresentaram rendimentos de síntese satisfatórios, superiores 50%.

As Figuras 4.7 a 4.9 mostram a evolução da reação de síntese em função do tempo utilizando CALB-A, Lipozyme RM e Lipozyme TL, respectivamente, com a presença de 50 mg de peneira molecular. Pode-se observar que para as três enzimas utilizadas, após uma hora de reação, um alto rendimento de palmitato de retinila foi alcançado. Para CALB-A, o rendimento máximo (53,17%) foi obtido após 40 h de reação, enquanto que para a Lipozyme RM (63,93 %) e Lipozyme TL (68,25%), o tempo para atingir o maior rendimento foi de 1 h. Esse maior período de tempo de reação foi necessário para permitir que o rendimento máximo fosse atingido.

Como a reação de síntese trata-se de uma reação reversível, o rendimento do palmitato de retinila oscilou até atingir o equilíbrio da reação. Por isso a diminuição e aumento do rendimento ao longo do tempo. O retinol formado na reação reversa não aparece, pois é uma molécula altamente instável, e instantaneamente é degradada em outras substâncias. Essa oscilação pode ter ocorrido também devido a erros experimentais já que os mesmos não foram realizados em duplicata.

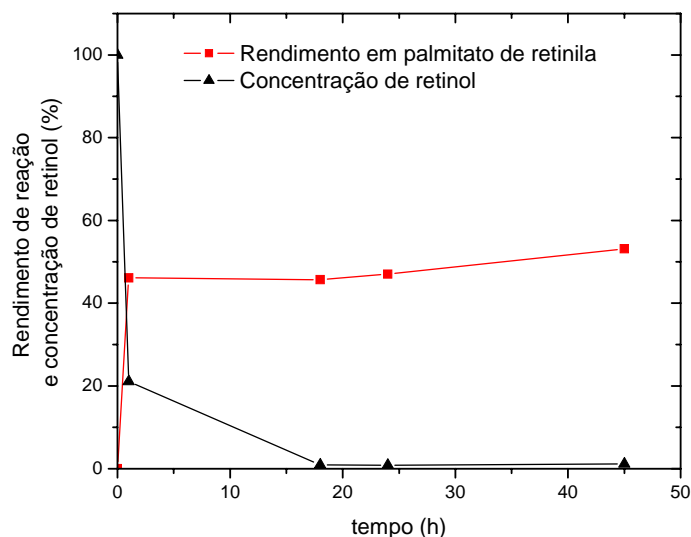


Figura 4.7. Curso da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa. Condições: 0.1 mmol de retinol, 0.5 mmol ácido palmítico, 100 mg de CALB-A, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular. Agitação na ausência de oxigênio e protegidos da luz a 37 °C.

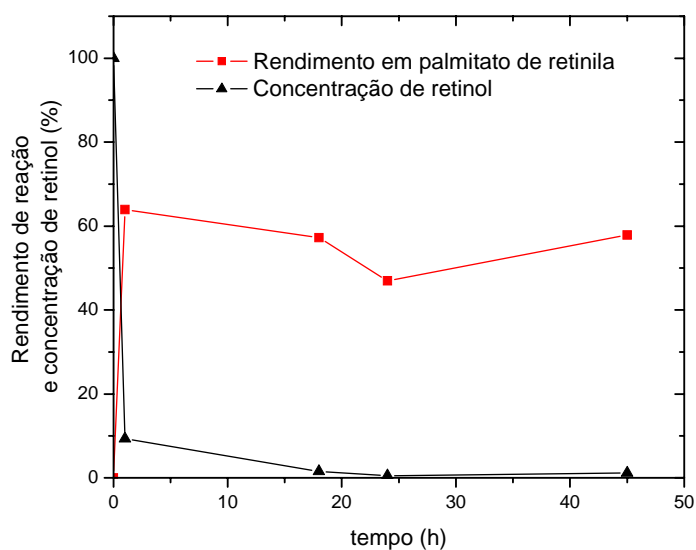


Figura 4.8. Curso da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa. Condições: 0.1 mmol de retinol, 0.5 mmol ácido palmítico, 50 mg de Lipozyme RM, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular. Agitação na ausência de oxigênio e protegidos da luz a 37 °C.

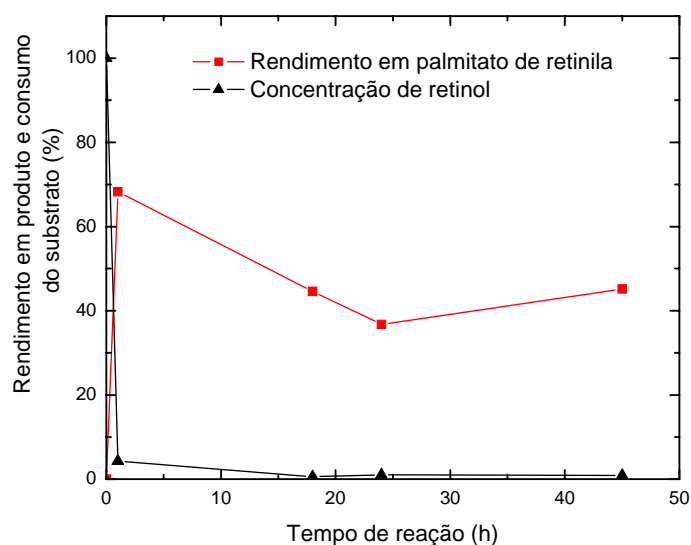


Figura 4.9. Curso da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa. Condições: 0.1 mmol de retinol, 0.5 mmol ácido palmítico, 50 mg de Lipozyme TL, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular. Agitação na ausência de oxigênio e protegido da luz a 37 °C.

Segundo a estequiometria da reação uma molécula de retinol deveria ser convertida em uma molécula de palmitato de retinila, no entanto isso não aconteceu. Durante o curso das reações, além do consumo do retinol para a síntese de palmitato de retinila, ocorreu degradação do mesmo, já que se trata de uma molécula altamente instável (termosensível, fotosensível e facilmente oxidado na presença de oxigênio), explicando assim o decréscimo de sua concentração concomitantemente com a formação do produto.

4.9.2. Influência do tipo de derivado utilizado, temperatura e razão entre substratos

Com o objetivo de determinar temperatura e razão de substratos mais adequados para a reação de síntese de palmitato de retinila foi realizado um planejamento experimental 2^2 com réplica, com tempo de reação de 24 horas. A partir dos resultados deste planejamento avaliaram-se os tipos de derivado preparados neste trabalho (J8 e G10).

As variáveis estudadas no planejamento foram: temperatura (37 °C e 45 °C) e razão entre os substratos, retinol:ácido palmítico (1:3 e 1:5). A Figura 4.10 mostra os resultados obtidos desse planejamento tendo como resposta o rendimento de síntese definido na seção 3.2.14, com seus respectivos intervalos de confiança. Em trabalhos encontrados na literatura de síntese de derivados de vitamina A (Maugard *et al.*, 2000 e Rejasse *et al.*, 2003), a temperatura utilizada na reação variou entre 40 °C e 55 °C. Baseados nestes trabalhos e na temperatura ótima de atuação da enzima é que foram escolhidas as temperaturas de 37 °C e 45 °C, para a realização das reações.

Tabela 4.8: Resultados do planejamento experimental 2^2 da síntese de palmitato de retinila por hidrólise reversa, tendo como variáveis a temperatura e a razão entre os substratos. As reações foram conduzidas utilizando 100 mg de derivado J8, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular sob agitação, na ausência de oxigênio e protegidos da luz.

Experimento	Temperatura (°C)	Razão entre os substratos	Rendimento 1 (%)	Rendimento 2 (%)
1	37	1:5	63,13	59,8
2	45	1:5	59,83	57,96
3	37	1:3	42,81	49,21
4	45	1:3	52,58	45,75

A Tabela 4.8 mostra os resultados da síntese de palmitato de retinila, partindo de retinol e ácido palmítico, que foi utilizado no estudo estatístico apresentado nesta seção.

O rendimento do experimento 1 da Tabela 4.8 (acima de 60 %) foi considerado bom, visto que os rendimentos obtidos utilizando as enzimas comerciais Lipozyme RM e TL foram, 63,93% e 68,25%, respectivamente (Tabela 4.7). Sendo esta condição do planejamento experimental a melhor encontrada.

Fixando a temperatura em 37 °C, quando a razão entre os substratos passou de 1:3 para 1:5, o rendimento da reação aumentou de 46,01 % para 61,46 % (aumento de aproximadamente 15 %). Já na temperatura de 45 °C, quando a razão entre os substratos passou de 1:3 para 1:5, o rendimento aumentou de 49,16 % para 58,89 % (aumento de aproximadamente 9 %). Esse resultado mostra que uma maior quantidade de ácido palmítico melhorou o rendimento de síntese, nas duas temperaturas estudadas. Quando a razão de substrato utilizada foi 1:5, tinha-se um maior excesso de ácido palmítico no meio reacional, isso melhorou o rendimento da reação. Este excesso fez com que uma maior quantidade de ácido palmítico ficasse disponível e, assim, pudesse se ligar a enzima, formando o complexo enzima-ácido palmítico, seguido da liberação de uma molécula de água, para finalmente receber o retinol e formar o segundo produto da reação – palmitato de retinila.

Das duas variáveis testadas, T e razão entre os substratos, a que teve efeito significativo no rendimento da reação foi à razão entre os substratos, como pode ser observado pelo gráfico de Pareto na Figura 4.11. A linha tracejada representa se houve ou não significância para cada variável e a interação entre elas na análise dos dados com um grau de confiança de 95 %. Quando a razão entre os substratos aumentou, o rendimento de síntese aumentou, logo a razão de substrato tem efeito positivo no rendimento.

Nele também se pode observar que a temperatura e a interação temperatura-razão entre os substratos não afetaram significativamente o

rendimento da reação. Esse resultado também pode ser observado na Figura 4.10 através dos intervalos de confiança dos rendimentos.

Uma dispersão dos dados experimentais com respostas calculadas para o planejamento fatorial utilizando o software STATÍSTICA 6.0, está representada no Anexo B. Na Figura B.2 (Anexo B) pode-se observar a aproximação dos dados experimentais com os dados calculados pelo software, onde a reta representa os valores das respostas calculadas, e os pontos os valores dos dados experimentais.

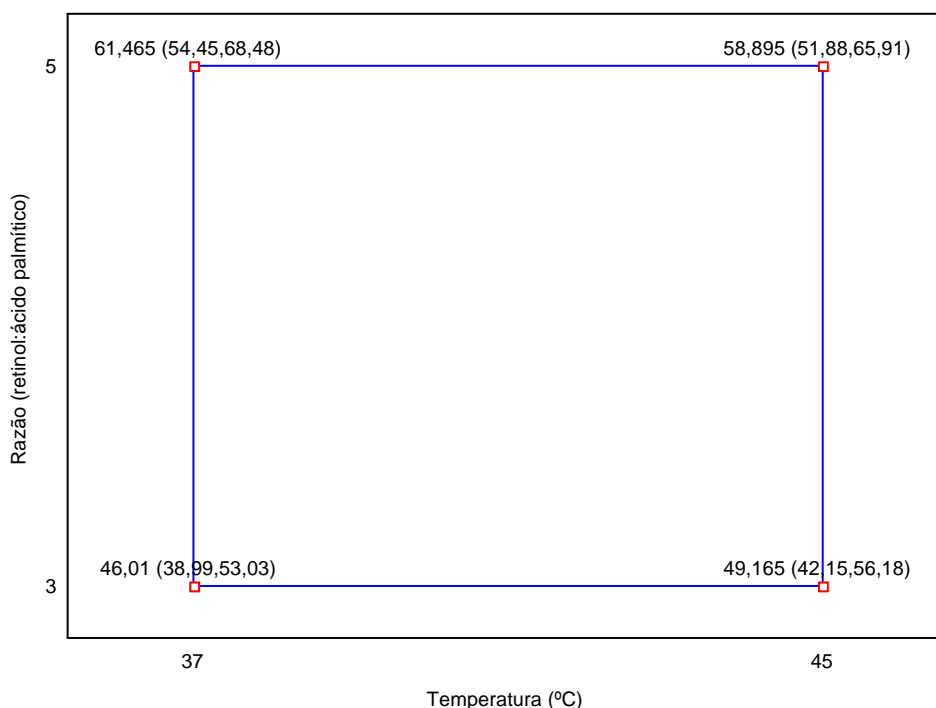


Figura 4.10. Diagrama para interpretação dos resultados do planejamento fatorial.

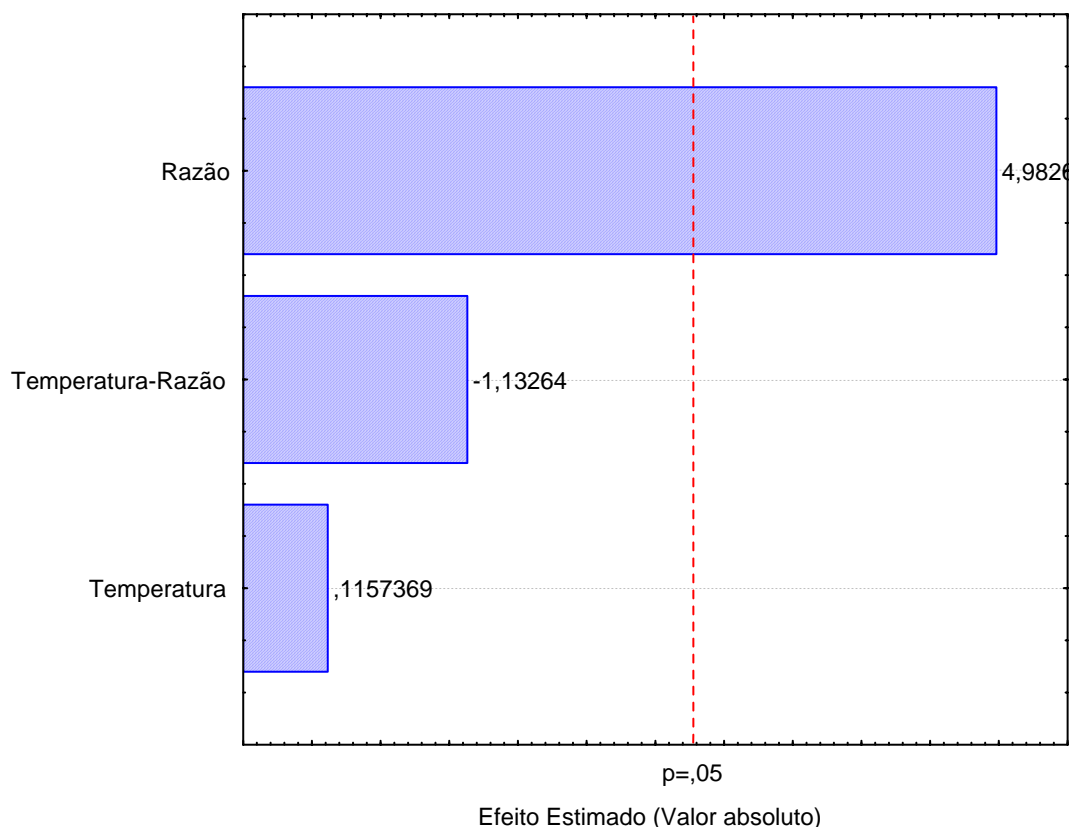


Figura 4.11. Diagrama de Pareto para o planejamento experimental.

Tabela 4.9: Resultados da síntese de palmitato de retinila, utilizando o derivado G10 e as razões entre os substratos 1:3 e 1:5. As reações foram conduzidas utilizando 100 mg de derivado, 2 ml de hexano e 50 mg de peneira molecular sob agitação, na ausência de oxigênio e protegidos da luz, à 37 °C.

Experimento	Derivado	Razão entre os substratos	Rendimento 1 (%)	Rendimento 2 (%)
5	G10	1:5	53,61	61,95
6	G10	1:3	49,86	57,21

A Tabela 4.9 mostra os resultados obtidos da síntese de palmitato de retinila, partindo de retinol e ácido palmítico utilizando agora o derivado G10 e uma temperatura fixa de 37°C.

Baseado nos resultados obtidos no planejamento selecionou-se a temperatura de 37°C (nível inferior) e a razão de substrato 1:5 (nível superior)

para se avaliar a influência do derivado G10, lipase imobilizada em quitosana-alginato. Uma reação com a razão de 1:3 também foi realizada para confirmar ou não o melhor nível da razão entre os substratos. Como a variável temperatura não foi significativa para a faixa utilizada escolheu-se a menor, pois assim o gasto com energia para atingir a temperatura de reação será menor. A melhor razão de substratos foi 1:5 (retinol:ácido palmítico), confirmada pela reação realizada com o derivado G10. A Tabela 4.7 mostra os rendimentos obtidos com o derivado J8 e G10 a 37°C e na razão 1:5 (retinol:ácido palmítico). Foi $61,47 \pm 2,35$ % para o J8 e $57,78 \pm 5,90$ % para o G10. Pode-se observar que os rendimentos das reações utilizando o derivado J8 e utilizando o derivado G10 são aproximadamente iguais, pois estão dentro do erro experimental. Portanto baseando-se apenas no rendimento da reação pode-se utilizar tanto o J8 como o G10 em reações de síntese. No entanto, como o derivado J8 apresentou uma estabilidade operacional melhor em relação aos outros derivados e uma razoável estabilidade térmica pode-se selecioná-lo para futuras reações químicas.

5. CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos, para as diferentes estratégias de imobilização, pode-se concluir que a quitosana se apresentou como um melhor suporte para imobilizar a lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB), quando comparada a quitosana-alginato, levando em conta as atividades dos derivados obtidas. O maior valor de atividade do derivado nas estratégias estudadas foi $422,44 \pm 50,4$ U/g, (estratégia IX - Ativação com glicidol 72 % (v/p), ligação de com etilenodiamina entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v).), quando se utilizou quitosana como suporte. Bons resultados também foram obtidos nas estratégias XI (Ativação com glutaraldeído 2 % (v/v)) e XII (Ativação com glutaraldeído 2 % (v/v), seguido de ativação com o glicidol 48 % (v/p), ligação com etilenodiamina entrecruzando com glutaraldeído 5 % (v/v)), tanto para quitosana como para o compósito quitosana-alginato. Considerando que a carga enzimática utilizada nas imobilizações foi baixa (1,8 mg de proteína por grama de suporte) esses resultados se apresentam de maneira satisfatória quando comparados com a atividade do derivado comercial Novozyme 435 ($529,72 \pm 11,66$ U/g).

Baseando-se nas melhores atividades dos derivados, foram selecionados quatro catalisadores, para os estudos de estabilidade térmica. Os catalisadores selecionados foram o J8, J10, J11 e G10. Antes de iniciar os estudos de estabilidade, secaram-se esses derivados com hexano, com 3 % de ácido butírico. A estabilidade térmica foi estudada na temperatura de 60 °C e os resultados foram comparados com a estabilidade da Novozyme 435 e da CALB livre. Os derivados que apresentaram melhores resultados foram o J8 e G10 com fator de estabilização 10,25 e 29,26, respectivamente. O derivado G10 apresentou um fator de estabilização maior do que da Novozyme 435 (fator de estabilização: 19,91), logo este derivado tem grandes chances de ser utilizado em substituição ao derivado comercial.

Os dois derivados que apresentaram melhor estabilidade térmica foram submetidos a vários ciclos de reação de hidrólise do pNPB, e avaliou-se sua estabilidade operacional hidrolítica. Após 16 ciclos (128 minutos), o derivado J8 mostrou-se mais estável, mantendo em torno de 37 % de sua atividade inicial. Resultados semelhantes foram obtidos com a Novozyme 435, que manteve 44 % de sua atividade inicial após o mesmo tempo. Por outro lado, apesar do derivado G10 ter apresentado uma melhor estabilidade térmica, não apresentou boa estabilidade operacional hidrolítica, mantendo em torno de 10% de sua atividade inicial após 16 ciclos.

Em paralelo, realizou-se um estudo de síntese de palmitato de retinila, um éster de vitamina A, para a definição de algumas condições operacionais. Nestes ensaios, dois derivados comerciais (Lipozyme TL e Lipozyme RM) e lipase do tipo B de *Candida antarctica* imobilizada em agarose-glioxil (CALB-A) foram utilizados para avaliar a influência do uso de peneiras moleculares e do tempo de reação. Em todos os ensaios, o retinol foi rapidamente acilado com o ácido palmítico, reação de hidrólise reversa, formando o palmitato de retinila, um éster de retinol. Este éster é mais estável do que o retinol, facilitando seu manuseio nas preparações farmacêuticas, e fazendo com essas preparações tenham um maior prazo de validade (Rejasse *et al*, 2002). O uso de peneira molecular melhorou o rendimento de síntese visto que a água formada por hidrólise reversa foi removida do sistema, desviando o equilíbrio para a produção do éster.

Para determinar a temperatura e a razão de substratos mais adequados para a reação de síntese de palmitato de retinila foi realizado um planejamento experimental 2² com réplica. A partir deste planejamento testou-se o derivado G10 com o intuito de ver a sua influência no rendimento da reação utilizando-se os melhores níveis das variáveis encontrados no planejamento. Realizados esses experimentos pôde ser visto que tanto a temperatura como os tipos de catalisadores utilizados nas reações não apresentaram efeitos significativos. Contudo a razão entre os substratos influenciou de forma significativa como pôde ser visto nos gráficos da seção 4.9.2, apresentando maiores rendimentos

de síntese com a razão de substratos 1:5. Peneira molecular foi utilizada em todas as reações deste planejamento, pois ela melhorou o rendimento de síntese das reações realizadas anteriormente.

Os resultados experimentais indicaram que a CALB-A, o derivado J8 e o derivado G10, imobilizados neste trabalho, são biocatalisadores adequados para a produção de palmitato de retinila, quando comparado às enzimas comerciais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. **Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 22, n. 4, p. 529-538, 2005.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Química Orgânica.** 2ª ed. Rio de Janeiro – RJ: Editora LTC, p. 427-471, 1976.

ARCOS, J. A.; HILL, C. G.; OTERO, C. **Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone.** Biotechnology and Bioengineering, v. 73, n. 2, p. 104-110, 2001.

ARROYO, M. ; MORENO, J. M. ; SINISTERRA, J. V. **Alteration of the activity and selectivity of immobilized lipases by the effect of the amount of water in the organic medium.** Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v. 97 p. 195–201, 1995.

BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. **Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads.** Biomaterials, v. 23, p. 3627-3636, 2002.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; PÉREZ, M. F.; OTERO, C.; GONZÁLEZ, G. **Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 30, p. 83–93, 2004.

BONRATH, W.; NETSCHER, T. **Catalytic processes in vitamins synthesis and production.** Applied Catalysis A: General, v. 280, p. 55-73, 2005.

BOUSQUET-DOBOUCH, M. P.; GRABER, M.; SOUSA, N.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D. **Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1550, p. 90-99, 2001.

BOYLE, R. J.; RUSSO, V. C.; ANDALORO, E.; MEHR, S. M.; TANG, M. L. K. **Anaphylaxis to kangaroo meat – indentification of a new marsupial allergen.** Allergy, v. 62, p. 209-211, 2007.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, R. D. **Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar ester. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme.** Journal of Molecular Catalysis, v. 6, p. 279-285, 1999.

CASTRO, H. F.; LIMA, R.; ROBERTO, I. C. **Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase.** Biotechnology Progress, v. 17, p. 1061-1064, 2001.

ÇETINUS, S. A.; ÖZTOP, H. N. **Immobilization of catalase on chitosan film.** Enzyme and Microbial Technology, v. 26, p. 497-501, 2000.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; DELORME, P.; WILLEMOT, R. M. **Kinetic study of esterification by immobilized lipase in *n*-hexane.** FEBS, v. 276, n. 1, 2, p. 181-184, 1990.

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

DUMITRIU, E.; SECUNDO, F.; PATARIN, J.; FECHETE, I. **Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 22, p. 119-133, 2003.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.;

SOLER, G.; BATISTA, A.; GUIÓSÁN, J. M. **Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method.** Enzyme and Microbial Technology, v. 15, n. 7, p. 546-550, 1993.

GARCIA, T.; COTERON, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. **Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst.** Chemical Engineering Science, v. 55, p. 1411-1423, 2000.

GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. **Effects of diffusion on the kinetics of maltose hydrolysis using glucoamylase immobilized on macroporous silica.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 14, n. 4, p. 341-346, 1997.

GUIÓSÁN, J. M. **Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes.** Enzyme and Microbial Technology, v. 10, n. 6, p. 375-382, 1988.

HUGUET, M. L.; DELLACHERIE, E. **Calcium alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsuled materials on their release.** Process Biochemistry, v. 31, p. 745-751, 1996.

HUNG, T. C.; GIRIDHAR, R.; CHIOU, S. H.; WU, W. T. **Binary immobilization of *Candida Antarctica* lipase on chitosan.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 26, p. 69-78, 2003.

KIERNAN, J. A. **Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do.** Microscopy Today, v. 1, p. 8-12, 2000.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. **Color Atlas of Biochemistry**, 2^a ed. Thieme. New York, 2005.

KORDEL, M. ; HOFMANN, B. ; SCHOMBURG, D. ; SCHIMID, R. D. **Extracellular lipase of pseudomonas sp strain atcc-21808 - purification, characterization, crystallization, and preliminary-X-ray diffraction data.** Journal of Bacteriology, v. 173, n. 15, p. 4836-4841, 1991.

KRAJEWSKA, B. **Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review.** Enzyme and Microbial Technology, v. 35, p. 126-139, 2004.

KRISHNA, S.H.; KARANTH , N.G. **Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate A kinetic study,** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1547, p. 262-267, 2001.

KUMAR, G.; BRISTOW, J. F.; SMITH, P. J. **Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan.** Polymer, v. 41, n. 6, p. 2157-2168, 2000.

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

LÉTISSE, F.; LAMARE, S.; LEGOY, M.D.; GRABER, M. **Solid/gas biocatalysis: an appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis -** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1652, p. 27–34, 2003.

LOZANO, P.; VÍLLORA , G.; GÓMEZ, D.; GAYO, A.B.; CONESA, J.A.S.; RUBIO M.; IBORRA , J.L. **Membrane reactor with immobilized Candida antarctica lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide -** Journal of Supercritical Fluids, v. 29, p. 121-128, 2004.

MAUGARD, T., REJASSE, B., LEGOY, M. D. **Synthesis of water soluble retinol derivatives by enzymatic method.** Biotechnology Progress, v. 18, 424-428, 2002.

MAUGARD, T., TUDELLA, J., LEGOY, M. D. **Study of Vitamin Ester Synthesis by Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic Media.** Biotechnology Progress, v. 16, 358-362, 2000.

MI, F. L.; SUNG, H. W.; SHYU, S. S. **Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent.** Carbohydrate Polymers, v. 48, p. 61-72, 2002.

PAIVA, A.I.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. **Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases.** Enzyme and Microbial Technology, v. 27, p. 187–204, 2000.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. **Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties.** Enzyme and Microbial Technology, v. 36, p. 447-454, 2005.

PALOMO J. M., MUÑOZ G., FERNÁNDEZ-LORENTE G., MATEO C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE R., GUISÁN J. M. **Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 19–20, p. 279–286, 2002.

PENTEADO, M. D. C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analítico.** 1ª ed. Barueri, SP: Manole, p. 55-72, 2003

PEREIRA, E.B.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. **Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 20, n. 4, p. 343 – 355, 2003.

REJASSE, B.; MAUGARD, T.; LEGOY, M. D. **Enzymatic procedures for the synthesis of water-soluble retinol derivatives in organic media.** Enzyme and Microbial Technology, v. 32, p. 312-320, 2003.

RODRIGUES D. S. **Estudo da imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em carvão ativado e quitosana.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Brasil, 2005.

ROTTICCI, D.; NORIN, T.; HULT, K.; MARTINELLE, M. **An active-site titration method for lipases.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1483, p. 132-140, 2000.

ROUSSEAU, I.; CERF, D. L.; PICTON, L.; ARGILLIER, J. F.; MULLER, G. **Entrapment and realese of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads.** European Polymer Journal, v. 40, p. 2709-2715, 2004.

SCHÄGGER, H. e VON JAGOW, G. **Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the range from 1 to 100 kDa.** Analytical Biochemistry, v. 166, p. 368-379, 1987.

SHARMA, R. ; CHISTI, Y. ; BANERJEE, U. C. **Production, purification, characterization, and applications of lipases.** Biotechnology Advances, v. 19, p. 627-662, 2001.

SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; SANTANA, M.H.A.; ZANIN, G. M. **Imobilização de lípase em sílica de porosidade controlada na presença de proteínas não enzimáticas.** In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ, Campinas-SP, 2000.

SONG, Q. X. E WEI, D. Z. **Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 18 p. 261–266, 2002.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; CASARINI, D.; PIFFERI, P.G. **A novel chitosan derivate to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies.** Enzyme and Microbial Technology, v. 28, p. 427-438, 2001.

SCHÄGGER, H. e VON JAGOW, G. **Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the range from 1 to 100 kDa.** Analytical Biochemistry, v. 166, p. 368-379, 1987.

TURNER, C.; PERSSON, M.; MATHIASSEN, L.; ADLERCREUTZ, P.; KING, J. W. **Lipase-catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat-soluble vitamin determination in milk powder and infant formula.** Enzyme and Microbial Technology, v. 29, p. 111-121, 2001.

TREVAN, M. D.; **Immobilized enzymes.** 1^a ed. England: Jonh Wiley & Sons Ltda, 1980.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. **The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*.** Current Biology, v. 2, p. 293-308, 1994.

VAYSSE, L. ; LY, A.; MOULIN, G. ; DUBREUCQ, E. **Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium.** Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 648-655, 2002.

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

WANDREY, C.; LIESE, A.; KIHUMBU, D. **Industrial Biocatalysis: Past, Present and Future.** Organic Processes Research & Development, v. 4, p. 286-290, 2000.

WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. **Improved activity retention of enzymes deposited on solid supports.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, p. 171-178, 1993.

YADAV, G. D. E TRIVEDI, A. H. **Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of *n*-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 783–789, 2003.

YADAV, G. D. E LATHI, P. S. **Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases.** *Biochemical Engineering Journal*, v.16, p. 245–252, 2003.

<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0506/talidomida> (02.02.2006)

<http://www.abtbeads.com/suporte> (10.02.2006)

<http://www.agen.ufl.edu> (10.02.2006)

http://leee.gist.ac.kr/research_6 (10.02.2006)

<http://quark.qmc.ufsc.br> (02.02.2006)

<http://www.rcsb.org/pdb> (24.01.2007)

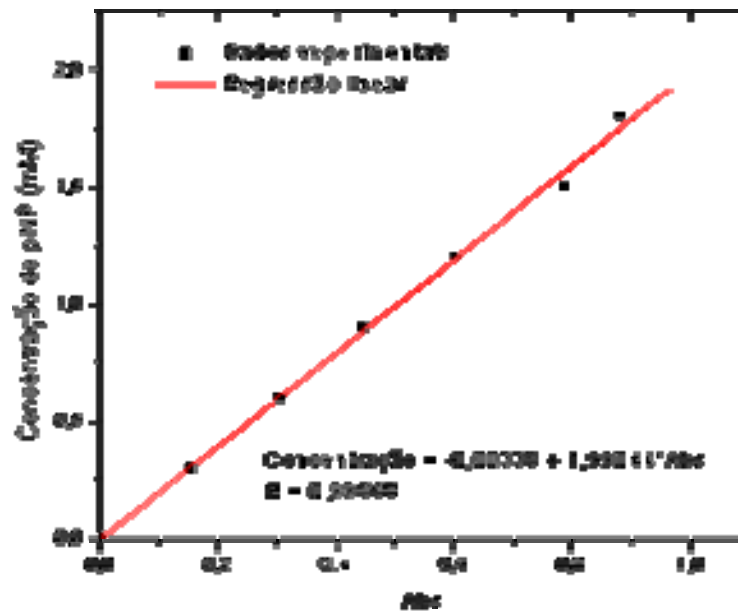
ANEXO A - Curva de calibração do *p*-nitrofenol (pNP)

Figura A.1. Curva de calibração do pNP, utilizada nos cálculos de determinação de atividade enzimática

ANEXO B - Análise dos valores observados *versus* valores preditos do planejamento

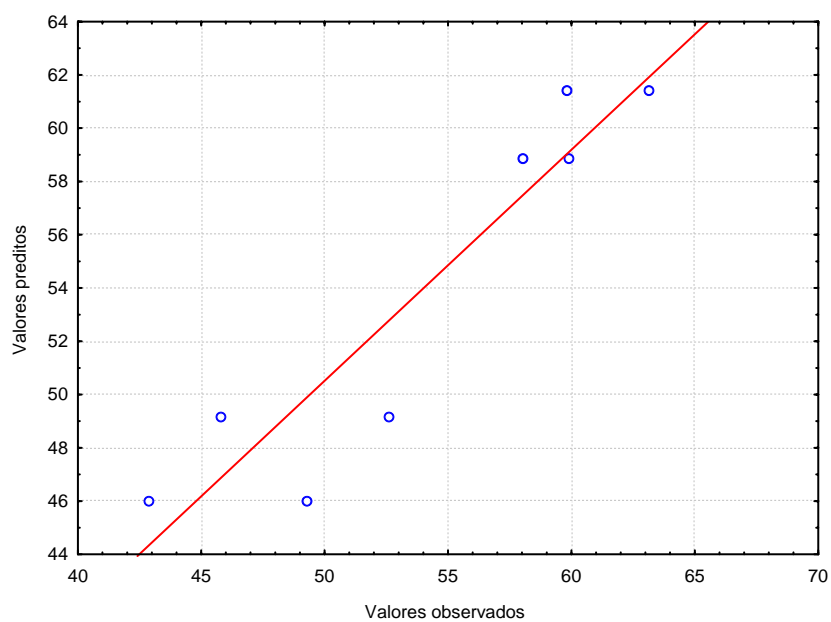


Figura B.1. Comparação dos dados experimentais e respostas calculadas para o planejamento fatorial

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)