



**ULISSES MARCONDES FREIRE DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES UTILIZANDO LIPASE DE  
*RHIZOMUCOR MIEHEI* (RmL) IMOBILIZADA EM SUPORTE QUITOSANA  
E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DOS ÉSTERES BUTIRATO DE METILA E  
BUTIRATO DE ETILA**

**FORTALEZA  
2012**

ULISSES MARCONDES FREIRE DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES UTILIZANDO LIPASE DE  
*RHIZOMUCOR MIEHEI* (RmL) IMOBILIZADA EM SUPORTE QUITOSANA E  
SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DOS ÉSTERES BUTIRATO DE METILA E  
BUTIRATO DE ETILA

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia-UFC como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- O52d Oliveira, Ulisses Marcondes Freire de.  
Desenvolvimento de biocatalisadores utilizando lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL) imobilizada em suporte quitosana e sua aplicação na síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila. / Ulisses Marcondes Freire de Oliveira. – 2012.  
272 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO – UFC, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Biotecnologia industrial.  
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
1. Lipase. 2. Quitosana. 3. Butiratos. 4. Ésteres. I. Título.

ULISSES MARCONDES FREIRE DE OLIVEIRA

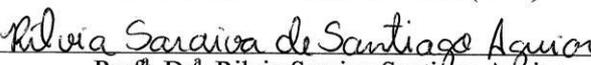
DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES UTILIZANDO LIPASE DE  
*RHIZOMUCOR MIEHEI* (RmL) IMOBILIZADA EM SUPORTE QUITOSANA E  
SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DOS ÉSTERES BUTIRATO DE METILA E  
BUTIRATO DE ETILA

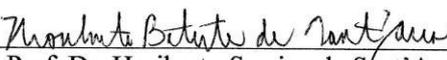
Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia-UFC  
como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia Industrial

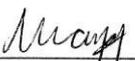
Aprovada em: 18 / 12 / 2012

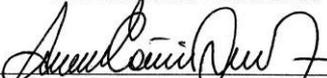
BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rílvia Saraiva Santiago Aguiar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hosiberto Saraiva de Sant'Ana  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. André Casimiro Macedo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe, pelo sacrifício, esforço e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela oportunidade dada, pelo crescimento profissional que me proporcionou e especialmente pela enorme paciência comigo ao longo desta caminhada.

Ao Professor Jaim Lichtig do Instituto de Química da Universidade de São Paulo-USP (in memoriam) meu grande amigo e verdadeiro pai que sempre me incentivou.

Ao Professor Jorge Cesar Masini do Instituto de Química da Universidade de São Paulo-USP, pela enorme contribuição que deu a minha formação pessoal e profissional e por ter me mostrado que a realização profissional pode ser conseguida com esforço e acima de tudo humildade.

Ao Professor Wellington Sabino Adriano pela presteza e pelos valiosos ensinamentos que tanto contribuíram para a minha formação.

Ao Professor Ary Marques da Silva, exemplo de honradez, decência e dignidade.

Aos “velhos” e grandes amigos do IQUSP Ricardo, Luciana, Kadowaki, Sidão, Hélio, Zé Eduardo, Orlando, Rosa, Rosane e Eliezer pelos longos anos de boa convivência e por todas as boas recordações.

Ao Sr. José Moreira, D. Ilse, D. Sonia, Simone, Wilson, Wellington, Júlio, Júnior e demais agregados pelo carinho, amizade e por terem me acolhido por tantos anos.

Aos colegas do grupo de pesquisa em Biotecnologia (GPBio) pela recepção acolhedora, pelas sinceras demonstrações de amizade e por terem me motivado ao longo deste trabalho.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

À FUNCAP pela bolsa concedida.

## RESUMO

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são catalisadores versáteis com amplas e diversificadas possibilidades de aplicação industrial. Sua principal aplicação é essencialmente catalisar a hidrólise de triglicerídeos. Entretanto, em ambientes micro-aquosos estas enzimas possuem a habilidade de catalisar a reação reversa de esterificação. Estas enzimas não requerem cofatores, possuem custo relativamente baixo, são regioespecíficas, enantiosseletivas, além de atuarem em uma larga faixa de temperatura e pH. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo desenvolver tecnologias alternativas utilizando rotas enzimáticas mediadas por lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL) imobilizada em suporte quitosana na presença de algumas classes de surfactantes para a produção de butirato de metila e butirato de etila, dois ésteres amplamente utilizados na indústria de cosméticos e de alimentos. Neste estudo, duas estratégias de imobilização foram avaliadas. Na primeira, a enzima foi imobilizada na presença dos surfactantes selecionados em suporte quitosana previamente reticulado com glutaraldeído. Na segunda estratégia de imobilização, o suporte utilizado foi reticulado com glutaraldeído após prévia adsorção da enzima na presença dos surfactantes. Dentre os procedimentos de imobilização estudados, os melhores resultados foram obtidos quando a enzima foi previamente adsorvida no suporte quitosana na presença do surfactante dodecil sulfato de sódio (0,23% m.v<sup>-1</sup>) por 1h a 4°C e 220 rpm, seguido de reticulação com glutaraldeído 0,6% (v.v<sup>-1</sup>) por 1h a 25°C. Nos ensaios de esterificação utilizando o melhor derivado obtido, foi efetuado um estudo detalhado dos parâmetros que afetam as taxas de conversão. Os melhores rendimentos foram obtidos quando as reações foram conduzidas a 25°C, 6h e 150 rpm utilizando n-heptano como solvente. Para o butirato de metila, o rendimento máximo de esterificação foi de 89% e para o butirato de etila a maior conversão observada foi de 92%. Os resultados obtidos foram comparáveis aos rendimentos de esterificação observados quando foi utilizada a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> nas mesmas condições reacionais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lipases, Quitosana, Surfactantes, Síntese de ésteres

## ABSTRACT

Lipases (glycerol ester hydrolases, EC 3.1.1.3) are versatile catalysts with broad and diverse possibilities of industrial applications. Its main application is essentially catalyze the hydrolysis of triglycerides. However, in micro-aqueous environments these enzymes have the ability to catalyze the reverse reaction of esterification. These enzymes do not require cofactors, have relatively low cost, are regioespecific, enantioselectives and may act on a broad range of temperature and pH. This work aimed to develop alternative technologies using enzymatic routes mediated by lipase from *Rhizomucor miehei* (RmL) immobilized on chitosan support in the presence of some classes of surfactants for the production of methyl butyrate and ethyl butyrate, two esters widely used in cosmetic and food industries. In this study two immobilization strategies were evaluated. In the first, the enzymes were immobilized in the presence of selected surfactants on chitosan supports previously activated with glutaraldehyde. In the second immobilization strategy, chitosan was crosslinked with glutaraldehyde after prior adsorption of the enzymes in the presence of surfactants. Among the immobilization procedures studied, the best results were achieved when the enzyme was immobilized onto chitosan support in the presence of the surfactant sodium dodecyl sulphate SDS (0.23%  $m v^{-1}$ ) for 1 h at 4 ° C and 220 rpm, followed by crosslinking with 0.6% glutaraldehyde ( $v v^{-1}$ ) for 1 h at 25 ° C. In esterification experiments conducted with the best derivative, a detailed study of the parameters that affect the reaction rates were performed. The best yields were obtained when the reactions were conducted at 25 ° C, 6h and 150 rpm using n-heptane as a solvent. For methyl butyrate maximum esterification yield was 89% and for ethyl butyrate the maximum conversion observed was 92%. The results were comparable to yields observed when the esterification reactions were carried out with the commercial enzyme Lipozyme<sup>®</sup> and the soluble enzyme under the same reaction conditions.

**KEYWORDS:** Lipases, Chitosan, Surfactants, Ester Synthesis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases. ....	7
Figura 2 - Modelo estrutural de $\alpha/\beta$ hidrolases.(Fonte: Pouderoyen et al., 2001, com modificações).....	11
Figura 3. Representação esquemática do mecanismo Ping-pong Bi-Bi. A e B são substratos; Y e Z são produtos; E e E' são diferentes conformações da enzima livre; EA, E'Y, E'B e EZ são estados de transição.(Fonte: Illanes, 2008) .....	12
Figura 4. Mecanismo proposto da reação de hidrólise de ligações éster catalisadas por lipases e estearases.(1) ataque nucleofílico da hidroxila do resíduo serina ao carbono carbonílico da ligação éster; (2) formação do primeiro intermediário tetraédrico; (3) formação do complexo acil-enzima e ataque nucleofílico da água; (4,5) formação do segundo intermediário tetraédrico e (6) liberação do segundo produto da reação (éster) e restauração do sítio catalítico da enzima para um novo ciclo. (Fonte: Ghanem, 2007, com modificações) .....	13
Figura 5. Mecanismo da catapulta eletrostática.(Fonte: Petersen <i>et al.</i> ,2001, com modificações).....	14
Figura 6. Estrutura da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> . (Fonte: Brzozowski <i>et al.</i> ,1992)..	15
Figura 7. Estrutura da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> mostrando sua conformação fechada (A, C) e aberta (B, D). A e B (vista lateral): a tríade catalítica (em amarelo) e a estrutura secundária mostrando o dobramento $\alpha/\beta$ hidrolase comum a todas as lipases. C e D (vista superior): modelo do espaço preenchido, colorido por decréscimo de polaridade (azul escuro- levemente azul- branco-levemente vermelho-vermelho escuro). Após o deslocamento da tampa hidrofóbica, a tríade catalítica (em amarelo) torna-se acessível ao substrato (D), e a região ligada à interfase torna-se significativamente mais apolar.(Fonte: Schmid & Verger, 1998).....	16
Figura 8. Principais métodos de imobilização de enzima. (a) adsorção; (b) ligação covalente unipontual; (c) ligação covalente multipontual; (d) ligação covalente via espaçadores químicos ; (e) confinamento em gel; (f) encapsulamento em membranas ; (g) encapsulamento em micelas e (h) ligação intermolecular enzima-enzima.(Fonte: Idris & Bukhari, 2011, com modificações).....	22

Figura 9 . Efeitos da imobilização na atividade enzimática.....	23
Figura 10. Ligação de enzimas a suportes funcionalizados com espaçadores. (Fonte: Tardioli, 2003, com modificações).....	27
Figura 11. Protocolos para imobilização covalente de enzimas. (A) ligação de enzimas a suportes contendo grupos epóxi; (B) ativação de suportes aminados com glutaraldeído ; (C) ativação em suportes contendo grupos hidroxilas com CNBr; (D) silanização e ativação de suportes com glutaraldeído.(Torres-Salas <i>et al.</i> , 2011, com modificações). .....	28
Figura 12. Formação de CLEAs e CLECs.(Fonte: López-Serrano <i>et al.</i> ,2002,com modificações).....	30
Figura 13. Suportes utilizados na imobilização de enzimas.....	31
Figura 14. Estrutura da celulose (a) , quitina (b) quitosana(c) .....	34
Figura 15 . Estruturas modificadas da quitosana .....	35
Figura 16. Ativação do suporte quitosana com glutaraldeído, glicidol e EDA e a combinação de todos. (Fonte: Silva <i>et al.</i> , 2012)..	38
Figura 17 . Estruturas do reagente glutaraldeído em função do pH. Estruturas : (I) forma monomérica do glutaraldeído; (II), (III) e (IV) formas reduzidas do glutaraldeído; (V) forma oligomérica da estrutura (IV); (VI) estrutura $\alpha,\beta$ insaturada; (VII) e (VIII) estruturas derivadas da estrutura (VI) após condensação aldólica; (IX) poliglutaraldeído; (X) e (XI) formas diméricas do glutaraldeído. (Fonte: Migneault <i>et al.</i> , 2004, com modificações).....	40
Figura 18. Ativação do suporte quitosana com glutaraldeído .....	41
Figura 19. Formação de base de Schiff entre o suporte quitosana ativado com glutaraldeído e o grupo amino reativo de uma enzima .....	42
Figura 20. Adsorção de lipases em suportes hidrofóbicos. (Fonte: Mateo <i>et al.</i> , 2007, com modificações). .....	49

Figura 21. Estratégias para imobilização de lipases (A) adsorção seletiva de lipases em suportes hidrofóbicos e (B) adsorção seletiva seguida de reticulação do suporte com um reagente específico na presença de contaminantes. (Fonte: Garcia-Galan <i>et al.</i> , 2011, com modificações).....	50
Figura 22. Imobilização de lipases na presença de surfactantes.(Fonte: Mateo <i>et al.</i> , 2007, com modificações). .....	51
Figura 23. Mecanismo da catálise ácida de ésteres .....	51
Figura 24 . Obtenção industrial do acetato de butila por processo tipo batelada_(Fonte: <a href="http://www.faenquil.com.br">http://www.faenquil.com.br</a> , com modificações, acessado em 10/10/2012).,.....	56
Figura 25. Produtos de reação obtidos em catálises mediadas por lipases em meios não-aquosos em função dos aceptores acila. (Fonte: Hedfors, 2009, com modificações).....	58
Figura 26. Fluxograma das etapas de obtenção, caracterização e seleção do suporte de quitosana.....	62
Figura 27. Fluxograma das etapas de imobilização de lipases em quitosana 2,5% (m.v <sup>-1</sup> ) reticulada com glutaraldeído 0,6% (v.v <sup>-1</sup> ) na presença dos surfactantes Triton X-100 e SDS. ....	64
Figura 28. Fluxograma das etapas de adsorção de lipases em gel de quitosana na presença dos surfactantes Triton X-100 e SDS seguida de reticulação do suporte com glutaraldeído 0,6%(v.v <sup>-1</sup> )......	65
Figura 29. Reação de hidrólise do butirato de p-nitrofenila.....	66
Figura 30 Mecanismo de formação de dímeros lípase-lípase. (Fonte: Palomo <i>et al.</i> ,2003, com modificações) .....	76
Figura 31. Efeito dos surfactantes na atividade da lipase de <i>R. miehei</i> solúvel vs. pNPB. A atividade da lipase foi considerada 100% na ausência dos surfactantes. Eixo x está plotado em escala logarítmica. (○) SDS; (■) Triton X-100 ; (△) CTAB.....	77

Figura 32. Efeito do surfactante Triton X-100 na atividade dos derivados preparados utilizando a primeira ( $\Delta$ ) e a segunda estratégia de imobilização ( $\bullet$ ). Os experimentos foram executados de acordo com o procedimento experimental descrito na seção materiais e métodos. A atividade relativa foi considerada 100% para os derivados produzidos na ausência do surfactante. O eixo x está plotado em escala logarítmica. ....	80
Figura 33 . Mecanismos de interação entre a lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> e o suporte quitosana: (a) por união covalente ao suporte ativado com glutaraldeído e (b) por adsorção. (Fonte: Collins <i>et al.</i> , 2011, com modificações). .....	81
Figura 34. Efeito do surfactante SDS na atividade dos derivados preparados utilizando a primeira ( $\bullet$ ) e a segunda estratégia de imobilização ( $\circ$ ). Os experimentos foram executados de acordo com o procedimento experimental descrito na seção materiais e métodos. A atividade relativa foi considerada 100% para os derivados produzidos na ausência do surfactante. O eixo x está plotado em escala logarítmica. ....	83
Figura 35. Cinética de hiperativação da lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em quitosana na presença de SDS 0,23% m.v <sup>-1</sup> utilizando a segunda estratégia de imobilização.....	85
Figura 36. Microfotografias de varredura eletrônica de: (a) Quitosana comercial (QUIT), (b) Quitosana tratada com glutaraldeído 0,6% v.v <sup>-1</sup> (QUIT/GLU 0.6% v.v <sup>-1</sup> ) e (c) Suporte quitosana reticulado com glutaraldeído 0,6% v.v <sup>-1</sup> após imobilização por adsorção de lipases de <i>Rhizomucor miehei</i> (RmL) QUI/GLU 0,6% (v.v <sup>-1</sup> ) /RmL.....	87
Figura 37. Perfil de inativação térmica da lipase de <i>R. miehei solúvel</i> e dos derivados quitosana-glutaraldeído (QUI-GLU). Imobilização em pH 7, 4°C, 1h. Carga oferecida: 16 U.g <sup>-1</sup> . Enzima solúvel e derivados foram incubados em tampão fosfato de sódio 25 mol.L <sup>-1</sup> , pH 7 a 60 °C. (■) RML solúvel ; (□) Lipozyme®; (●) QUI-GLU 0.6%; (Δ) QUI-GLU 1,5%; (○) QUI-GLU 2,5%; (▲) QUI-GLU 5%. As linhas representam o ajuste do modelo de Sadana e Henley.....	89
Figura 38. Estabilidade térmica do derivado QUI-GLU 0,6% v.v <sup>-1</sup> a 37°C .....	90
Figura 39. Influência da velocidade de agitação na atividade hidrolítica das lipases de <i>R. miehei</i> imobilizadas no suporte quitosana na presença de SDS 0,23% m.v <sup>-1</sup> . Carga oferecida: 8 U.g <sup>-1</sup> .....	92

Figura 40. Efetividade ( $\eta$ ) x carga oferecida ( $U \cdot g^{-1}$ ) para lipases de *R. miehei* imobilizadas no suporte quitosana 2,5 % m.v<sup>-1</sup> na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup>. Efetividade foi calculada como a razão entre a atividade do derivado e atividade teórica..... 93

Figura 41. Estudo do efeito da temperatura na síntese dos ésteres butirato de metila (●) e butirato de etila (○). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ; massa de biocatalisador(m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]= 1:1; Conc. dos substratos:  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Agitação= 150 rpm;Tempo de reação(t): 8h. .... 97

Figura 42. Influência da concentração dos substratos nas reações de síntese do butirato de metila (○) butirato de etila (■).Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida =  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ; massa de biocatalisador(m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido] = 1:1; Agitação = 150 rpm; Tempo de reação(t): 8h. .... 99

Figura 43. Influência da razão molar álcool/ácido no rendimento da síntese do butirato de etila. Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ; massa de biocatalisador(m): 200 mg; T = 25 °C; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t): 8h. Legenda: concentração de ácido (●); concentração de álcool (△)..... 101

Figura 44. Influência da razão molar álcool/ácido no rendimento da síntese do butirato de metila. Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$  massa de biocatalisador(m): 100 mg; T = 25 °C; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t): 8h. Legenda: concentração de ácido (△) ; concentração de álcool (●)..... 103

Figura 45. Influência da quantidade de enzima nos rendimentos das reações de síntese do butirato de metila (●) e butirato de etila (○). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; massa de biocatalisador(m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila=1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t)= 8h..... 105

Figura 46. Influência da massa de biocatalisador no rendimento das sínteses do butirato de metila (○) e do butirato de etila (■). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ; Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila = 1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t) = 8h..... 106

Figura 47. Influência da velocidade de agitação no rendimento das sínteses do butirato de metila (●) e do butirato de etila (△). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ; massa de biocatalisador (m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila = 1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Tempo de reação(t) = 8h. .... 107

Figura 48. Influência da quantidade inicial de água no rendimento das sínteses do butirato de metila (●) e do butirato de etila (△). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ; massa de biocatalisador(m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila=1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t)= 8h..... 109

Figura 49. Influência da quantidade de agente dessecante no rendimento das sínteses do butirato de metila (○) e do butirato de etila (■). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida=  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ; massa de biocatalisador(m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila=1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t)= 8h..... 111

Figura 50 Acompanhamento das sínteses dos ésteres butirato de metila (■) e do butirato de etila (○). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ; massa de biocatalisador(m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila=1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação= 150 rpm; Agente dessecante : butirato de etila = 20% p.v<sup>-1</sup>, butirato de metila=0% ..... 112

Figura 51. Espectro na região do infravermelho do padrão butirato de etila em n-heptano ..... 116

Figura 52. Espectro na região do infravermelho da mistura reacional (síntese do butirato de etila) após 6h de reação..... 116

Figura 53. Espectro na região do infravermelho do padrão butirato de metila em n-heptano .....	116
Figura 54. Espectro na região do infravermelho da mistura reacional (síntese do butirato de metila) após 6h de reação.....	116
Figura 55. Espectro na região do infravermelho do butirato de etila em CCl <sub>4</sub> .(Fonte: <a href="http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi">http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi</a> , acessado em 20/11/12).: .....	116
Figura 56. Espectro na região do infravermelho do butirato de metila em CCl <sub>4</sub> . (Fonte: <a href="http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi">http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi</a> , acessado em 20/11/12).: .....	116
Figura 57. Síntese do butirato de etila. Condições: Solvente: n-heptano; V <sub>reação</sub> =20 mL; carga oferecida= 1,61 mg <sub>proteína</sub> ·g <sub>suporte</sub> <sup>-1</sup> ; massa de biocatalisador (m): 200 mg ; Conc. dos substratos (mol L <sup>-1</sup> ): 0,2 ; Razão molar [álcool]/[ácido]: 1:1 ; Agitação= 150 rpm ; Agente dessecante : 20% p.v <sup>-1</sup> ; Tempo de reação(t)= 6h . Biocatalisadores: (I) enzima solúvel ; (II) derivado produzido na ausência do surfactante SDS nas condições otimizadas de imobilização; (III) derivado obtido na presença de SDS 0,23% m.v <sup>-1</sup> nas condições otimizadas de imobilização; (IV) Enzima comercial Lipozyme <sup>®</sup> . .....	118
Figura 58. Síntese do butirato de metila. Condições: Solvente: n-heptano; V <sub>reação</sub> =20 mL; carga oferecida= 1,61 mg <sub>proteína</sub> ·g <sub>suporte</sub> <sup>-1</sup> ; massa de biocatalisador (m)= 100mg ; Razão molar [álcool]/[ácido]= 1,5:1 ; Agitação= 150 rpm; ;Tempo de reação(t)= 6h. Biocatalisadores: (I) enzima solúvel (II) derivado produzido na ausência do surfactante SDS nas condições otimizadas de imobilização; (III) derivado obtido na presença de SDS 0,23% m.v <sup>-1</sup> nas condições otimizadas de imobilização; (IV) Enzima comercial Lipozyme <sup>®</sup> .....	118
Figura 59. Resultados para estabilidade operacional do butirato de etila. Condições: Solvente: n-heptano; V <sub>reação</sub> = 20 mL; massa de biocatalisador (m): 200 mg ; Conc. dos substratos (mol L <sup>-1</sup> ): 0,2 ; Razão molar [álcool]/[ácido]: 1:1 ; Agitação= 150 rpm ; Agente dessecante (PM 4A): 20% p.v <sup>-1</sup> ; Tempo de reação(t)= 6h. Legenda: Lipozyme <sup>®</sup> (○); biocatalisador I (1,61 mg <sub>proteína</sub> ·g <sub>suporte</sub> <sup>-1</sup> ) (△); biocatalisador II (3,22 mg <sub>proteína</sub> ·g <sub>suporte</sub> <sup>-1</sup> ) (●).....	120

Figura 60. Resultados para estabilidade operacional do butirato de metila. Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; massa de biocatalisador (m): 100 mg ; Razão molar [álcool]/[ácido]: 1,5:1 ; Agitação= 150 rpm ; Tempo de reação(t)= 6h. Legenda: Lipozyme<sup>®</sup> (▲); biocatalisador I ( $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ) (●); biocatalisador II ( $3,22 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ) (○)..... 122

Figura 61. Resultados para estabilidade operacional do butirato de etila (○) e do butirato de metila (■). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; carga oferecida =  $27 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador(m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila =1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação = 150 rpm; Agente dessecante: butirato de etila = 20% p.v<sup>-1</sup>, butirato de metila=0%.. ..... 122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de algumas lipases.....	10
Tabela 2. Técnicas utilizadas na imobilização de lipases .....	45
Tabela 3. Processos industriais que utilizam lipases imobilizadas.....	47
Tabela 4. Flavorizantes e aromatizantes utilizados na indústria .....	53
Tabela 5. Propriedades físico-químicas dos reagentes e ésteres .....	53
Tabela 6. Resultados para imobilização de lipases em quitosana utilizando o segundo método de imobilização na presença de SDS 0,23% m.v <sup>-1</sup> . Carga oferecida: 16 U.g <sup>-1</sup> ; (n=3). Temperatura de imobilização (T <sub>imob.</sub> , °C), tempo de imobilização (t <sub>imob.</sub> ,h), velocidade de agitação (v <sub>agitação</sub> ,rpm), Rendimento de Imobilização (R <sub>I</sub> - %), Ativ.Derivado(At <sub>der.</sub> - U <sub>pNPB</sub> .g <sub>gel</sub> <sup>-1</sup> ), Atividade recuperada(At <sub>rec.</sub> - %).....	86
Tabela 7. Resultados para estabilidade térmica a 60°C de lipases imobilizadas em quitosana na presença de SDS 0,23% m.v <sup>-1</sup> . Carga oferecida: 16 U.g <sup>-1</sup> ; (n=3). Tempo de meia-vida (t <sub>1/2</sub> ,min) , Fator de estabilidade (FE), Rendimento de Imobilização (R <sub>I</sub> - %), Ativ. Derivado(At <sub>der.</sub> - U <sub>pNPB</sub> .g <sup>-1</sup> ), Ativ. Recuperada (At <sub>rec.</sub> - %).....	88
Tabela 8. Influência do solvente nas taxas de conversão dos ésteres butirato de metila e butirato de etila. Condições: massa de biocatalisador(m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Temperatura(T)= 25°C; Razão molar [álcool]/[ácido]= 1:1; V <sub>reação</sub> = 20mL; Conc. dos substratos: 0,2 mol.L <sup>-1</sup> ;Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t): 8h.....	95
Tabela 9. Parâmetros otimizados para a síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila .....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS

APTS	3-aminopropiltriétoxissilano
AOT	Dioctil sulfosuccinato de sódio
$A_{rec.}$	Atividade recuperada (%)
$A_{teórica}$	Atividade teórica ( $U_{pNPB} \cdot g^{-1}_{suporte}$ )
$A_{der.}$	Atividade do derivado ( $U_{pNPB} \cdot g^{-1}_{suporte}$ )
$a_w$	Atividade termodinâmica da água
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
CLECs	Cross linked enzyme crystals
CLEAs	Cross linked enzyme aggregates
cmc	concentração micelar crítica
CNBr	Brometo de cianogênio
CRL	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDA	Etilenodiamina
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
FE	Fator de estabilidade
GD	Grau de desacetilação
GRAS	Generally Regarded as Safe
GLU	Glutaraldeído
HMPC	4-hidroxi-3-metil-2-(2-propenil)-2-ciclopenteno-1-on

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
$k_{\text{cat}}$	número de <i>turnover</i> , $\text{s}^{-1}$
$k$	constante de desativação de primeira ordem ( $\text{tempo}^{-1}$ )
kDa	Quilodaltons
Lys	Lisina
log P	Coefficiente de partição octanol/água
MEV	Microscopia de Varredura Eletrônica
MTBE	Metil terc-butil éter
$\eta$	Fator de efetividade
PEG	Polietilenoglicol
POS	Polisiloxano
PVA	Álcool Polivinílico
PVC	Cloreto de polivinila
pNPB	Butirato de p-nitrofenila
pNP	p-nitrofenol
QUI	Quitosana
RmL	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
$t_{1/2}$	tempo de meia-vida (min,h,etc.)
$V_{\text{máx.}}$	Velocidade máxima

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	2
<b>Capítulo 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
2.1. Lipases.....	7
2.1.1. Definição .....	7
2.1.2. Fontes e propriedades bioquímicas das lipases.....	9
2.1.3. Estrutura tridimensional , mecanismo catalítico e ativação das lipases .....	11
2.1.4. Mecanismo catalítico das lipases .....	11
2.1.5. Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> .....	15
2.1.6. Reações catalisadas por lipases.....	17
2.2. Utilização de enzimas como biocatalisadores industriais .....	20
2.2.1. Tecnologia enzimática.....	20
2.3. Métodos de imobilização.....	24
2.3.1. Confinamento (aprisionamento) em gel .....	24
2.3.2. Inclusão em membranas .....	25
2.3.4. Imobilização não covalente em suportes.....	25
2.3.5. Imobilizações covalentes em suportes .....	26
2.3.6. Ligação cruzada intermolecular enzima-enzima.....	29
2.4. Seleção do suporte para imobilização .....	30
2.5. Quitina e quitosana.....	33
2.5.1. Estrutura e propriedades .....	33
2.5.2. Utilização de quitosana como suporte na imobilização de enzimas .....	36
2.5.3. Imobilização de enzimas em suporte quitosana ativado com glutaraldeído..	38

2.6. Imobilização de lipases .....	44
2.6.1. Técnicas de imobilização de lipases.....	44
2.6.2. Estratégias para o aumento da atividade catalítica de lipases em protocolos de imobilização .....	48
2.7. Síntese de ésteres .....	52
2.7.1. Ésteres: definição e aplicações.....	52
2.7.2. Ésteres componentes de aromas.....	53
2.8. Biocatálise em meios não convencionais utilizando lipases .....	57
2.9. Utilização de lipases em solventes orgânicos.....	59

### **Capítulo 3 PARTE EXPERIMENTAL**

3.1. Etapas do trabalho.....	63
3.2. Materiais e Métodos.....	64
3.2.1. Materiais .....	63
3.2.1.1. Enzimas.....	64
3.2.1.2. Suportes.....	64
3.2.1.3. Reagentes.....	64
3.3. Métodos .....	63
3.3.1. Preparação do suporte quitosana 2,5% m.v <sup>-1</sup> .....	63
3.3.2. Ativação dos suportes com glutaraldeído .....	64
3.3.3. Imobilização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> na presença de surfactantes..	64
3.4. Determinação da atividade hidrolítica da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> .....	66
3.4.1. Atividade da enzima solúvel (livre) .....	66
3.4.2. Atividade hidrolítica dos derivados ( $A_{\text{derivado}}$ ) .....	67

3.5. Determinação da Atividade recuperada ( $A_{t_{rec.}}$ ) e do Rendimento de imobilização ( $\%R_I$ ) .....	67
3.6. Determinação da estabilidade térmica, do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e fator de estabilidade (FE) .....	68
3.7. Avaliação de efeitos difusionais externos e internos no biocatalisador selecionado .....	69
3.8. Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) .....	69
3.9. Análise dos ésteres por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	70
3.10. Síntese de ésteres .....	70
3.10.1. Seleção do solvente .....	71
3.10.2. Influência da temperatura .....	71
3.10.3. Influência da concentração dos substratos.....	71
3.10.4. Influência da razão molar álcool/ácido ( $[álcool]/[ácido]$ ) .....	71
3.10.5. Influência da massa de biocatalisador adicionada ao meio reacional .....	72
3.10.6. Influência da quantidade de enzima adicionada ao meio reacional .....	72
3.10.7. Influência da velocidade de agitação nos rendimentos das esterificações .	72
3.10.8. Influência da quantidade de água nos rendimentos das esterificações.....	73
3.10.9. Influência da presença de agente dessecante nas taxas de conversão .....	73
3.10.10. Perfil cinético das reações de esterificação.....	73
3.10.11. Estabilidade operacional do biocatalisador.....	73
3.10.12. Determinação do rendimento de esterificação na síntese dos ésteres .....	74

## **Capítulo 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

<b>4.1. Imobilizações na presença de surfactantes</b> .....	76
4.1.1. Efeito da adição de surfactantes na atividade da enzima solúvel .....	76
<b>4.2. Efeito da presença dos surfactantes Triton X-100 e SDS na atividades da lipase de Rhizomucor miehei (RmL) imobilizada no Suporte Quitosana</b> .....	79
4.2.1. Efeito do surfactante Triton X-100 .....	79
4.2.2. Efeito do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS).....	82
4.2.3. Caracterização do suporte quitosana por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) .....	87
4.2.4. Determinação da estabilidade térmica dos biocatalisadores.....	88
4.2.5. Influência dos efeitos de transferência de massa externa e interna na hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB).....	90
<b>4.3. Síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila</b> .....	94
4.3.1. Seleção do solvente .....	94
4.3.2. Efeito da temperatura nas reações de esterificação .....	96
4.3.3. Influência da concentração inicial dos substratos nas reações de esterificação .....	98
4.3.4. Estudos de otimização da razão molar álcool/ácido na síntese dos ésteres .....	100
4.3.5. Influência da quantidade de enzima no rendimento da esterificação ....	104
4.3.6. Influência da massa de biocatalisador no rendimento de esterificação .	106
4.3.7. Influência da velocidade de agitação no rendimento de esterificação ..	107
4.3.8. Influência da quantidade inicial de água no rendimento de esterificação .....	108

4.3.9. Influência da adição de agente dessecante no rendimento de esterificação .....	110
4.3.10. Acompanhamento cinético das reações de síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila .....	111
4.3.11. Análise dos produtos das reações de esterificação por Espectroscopia no Infravermelho .....	113
4.3.12. Determinação dos parâmetros otimizados para a síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila .....	117
4.3.13. Estudo comparativo dos rendimentos da reação obtidos nas sínteses dos ésteres butirato de metila e butirato de etila em condições otimizadas.....	117
4.3.14. Estabilidade operacional do biocatalisador.....	119

## ***Capítulo 5 CONCLUSÕES***

5. Conclusões.....	127
--------------------	-----

## ***Capítulo 6 SUGESTÕES***

6. Sugestões .....	132
--------------------	-----

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>134</b>
-------------------------	------------

<b>ANEXOS.....</b>	<b>158</b>
--------------------	------------

*Capítulo 1- INTRODUÇÃO E  
OBJETIVOS*

## 1. INTRODUÇÃO

Reações de esterificação são especialmente empregadas na produção de compostos de alto valor agregado como intermediários químicos na indústria de fármacos e polímeros (Kourist & Bornscheuer, 2011; Liu *et al.*, 2011), na síntese de agroquímicos (Jaeger & Eggert, 2002) e na produção de combustíveis alternativos como o biodiesel (Gog *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2011) e surfactantes biodegradáveis (Habulin *et al.*, 2008)

Os ésteres de cadeia curta, em especial, por conferirem sabor e/ou aroma característico de frutas, são atualmente os mais empregados como agentes flavorizantes e aromatizantes na indústria de alimentos, de cosméticos e na indústria farmacêutica (Martins *et al.*, 2011 ; Mahapatra *et al.*, 2009).

Alguns destes compostos podem ser extraídos de fontes naturais, porém a limitação de matéria-prima, os elevados custos de produção e os baixos rendimentos obtidos tornam estes processos inadequados sob o ponto de vista industrial (Longo & Sároman, 2006).

A grande maioria dos ésteres atualmente comercializados é obtida por síntese química (esterificação, transesterificação, interesterificação) que utiliza ácido ou bases fortes como catalisadores. Estes processos são caracterizados por apresentar uma série de desvantagens, tais como: baixas taxas de reação e de conversão, formação de subprodutos indesejáveis durante o processo, necessidade de separação e purificação dos produtos formados no meio reacional, elevado consumo de energia, sendo também considerados agressivos ao meio ambiente (Hills, 2003; Kiss *et al.*, 2004). Além destes problemas, ésteres obtidos por processos químicos são considerados “artificiais”, possuindo baixo valor de mercado (Bicas *et al.*, 2010; Demyttenaere, 2001).

A crescente demanda por produtos obtidos de fontes naturais nas últimas décadas aliada a grande pressão de órgãos legislativos e ambientais desencadeou um significativo avanço nas pesquisas que visam substituir os processos químicos tradicionais onerosos e ambientalmente inseguros por rotas biotecnológicas (enzimáticas ou fermentativas) economicamente viáveis para a obtenção de alguns compostos, incluindo ésteres, que podem ser utilizados por diversos segmentos do setor industrial. Os produtos derivados de bioprocessos são considerados “produtos naturais”

possuindo um alto valor econômico (Abbas & Comeau, 2003; Dubal *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2005).

A utilização da tecnologia enzimática apresenta como principais vantagens altas taxas de conversão e obtenção de produtos com elevada pureza não havendo necessidade, na maioria dos casos, de etapas posteriores de purificação, reduzindo o consumo de energia no processo. Em adição a estes fatores, as conversões enzimáticas são consideradas ambientalmente seguras, atendendo os requisitos da química verde e, geralmente, são efetuadas em condições brandas de temperatura e pH evitando a degradação dos produtos formados, o que ocorre nas altas condições de temperatura usualmente utilizadas na síntese química (Ran *et al.*, 2008 ; Rodriguez-Nogales *et al.*, 2005).

Reações de esterificação mediadas por lipases em meios não convencionais (ex: solventes orgânicos, líquidos iônicos ou fluidos supercríticos) ou em meios livres de cosolventes tem sido apontadas como uma alternativa promissora para a produção de alguns ésteres de interesse comercial em substituição aos processos químicos convencionais (Ben Salah *et al.* 2007; Radzi, 2011).

Uma grande limitação da utilização destas enzimas em processos industriais reside na falta de estabilidade operacional das mesmas e na impossibilidade de sua reutilização na forma solúvel (livre). Uma solução para contornar estas limitações tem sido a imobilização destas enzimas em suportes insolúveis que promovem vantagens operacionais tais como o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, a possibilidade de utilização em processos contínuos ou de bateladas, fácil separação enzima/ produtos, baixa geração de efluentes e reutilização do biocatalisador durante vários ciclos consecutivos sem perda significativa de sua atividade catalítica (Bornscheuer, 2005; Palomo *et al.*, 2002; Torres-Salas *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, vários métodos de imobilização químicos e físicos utilizando suportes de natureza orgânica e inorgânica têm sido estudados na imobilização de lipases (Fangkangwanwong, *et al.*, 2006; Knezevic, *et al.*, 2006; Paula *et al.*, 2008).

Contudo, o elevado custo de alguns suportes inorgânicos e polímeros sintéticos têm incentivado pesquisas na busca de matrizes alternativas de baixo custo, como por exemplo, carbonato de cálcio e biopolímeros como a quitina e a quitosana (Cetinus & Oztop, 2007; Gonsalves *et al.*, 2011).

A quitosana (poli-N-acetilglicosamina) é um oligossacarídeo derivado da quitina, polímero mais abundante na natureza depois da celulose, o qual pode ser facilmente obtido de fontes naturais como o rejeito de indústrias pesqueiras, principalmente nas carapaças dos crustáceos, notadamente camarão, lagosta e caranguejo, constituindo cerca de 30% do exoesqueleto destes últimos.

Em função de algumas de suas propriedades como biodegradabilidade e biocompatibilidade este polímero tem encontrado uma grande aplicação em diversas áreas do conhecimento (Kumar, 2000; Laranjeira & Fávere, 2009)

A utilização de quitosana como suporte para imobilização de enzimas deve-se, principalmente a versatilidade de formas (flocos, partículas porosas, gel, fibra e membrana), baixo custo de obtenção e alta afinidade por proteínas (Al-Duri & Yong, 2000; Krajewska, 2004).

Lipases podem ser imobilizadas em quitosana tanto por adsorção quanto por imobilização covalente. A presença de grupamentos amino (-NH<sub>2</sub>) e hidroxila (-OH) reativa na superfície deste polímero natural permite a utilização de diferentes agentes de funcionalização para obtenção de suportes com características adequadas que permitam a sua utilização como matriz para imobilização e estabilização destas enzimas (Chiou & Wu, 2004; Silva *et al.*, 2012). Uma estratégia que vem sendo utilizada com bastante sucesso consiste na imobilização destas enzimas na presença de algumas classes de surfactantes. A adição destes tensoativos promove a imobilização das lipases na sua conformação aberta (ativa) fornecendo biocatalisadores com alta atividade catalítica (Michaux *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2009).

Dentro deste contexto, este trabalho pretende desenvolver metodologias de imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL) no suporte quitosana na presença de surfactantes representativos de várias classes com o objetivo de preparar novos biocatalisadores com alta atividade catalítica que permitam sua aplicação na síntese de ésteres de interesse industrial.

Além de promover uma alternativa de beneficiamento, agregando valor aos produtos obtidos de resíduos da indústria pesqueira no estado do Ceará, este estudo pretende também contribuir para a expansão e diversificação da tecnologia enzimática trazendo potenciais benefícios sociais, econômicos e ambientais através do desenvolvimento de uma tecnologia inovadora e de custo acessível.

Ressalte-se que a quitosana no estado do Ceará pode ser considerada um produto de baixo custo e fácil aquisição quando comparado a outros países do mundo (Kumar *et al.*, 2000).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

Este projeto tem como objetivo a preparação de novos biocatalisadores através da imobilização de lipases em suporte quitosana, visando aplicação na síntese de alguns ésteres componentes de aromas de interesse comercial.

### **2.2. Objetivos específicos**

- I. Preparação e caracterização de suportes a base de quitosana
- II. Desenvolvimento de protocolos de preparação do suporte a base de quitosana para imobilização de lipases de *Rhizomucor miehei* na presença de surfactantes representativos de várias classes;
- III. Avaliação do desempenho dos biocatalisadores obtidos quanto à atividade aparente, recuperação de atividade, estabilidade térmica e capacidade de carga;
- IV. Avaliação do potencial de aplicação dos derivados imobilizados em reações de síntese de ésteres, especialmente aromas naturais.

*Capítulo 2- REVISÃO*  
*BIBLIOGRÁFICA*

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Lipases

#### 2.1.1. Definição de lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) fazem parte de um grupo especial de enzimas hidrolíticas que possuem a habilidade de catalisar a quebra de ligações éster de acilgliceróis de cadeia longa na interface orgânica-aquosa liberando os ácidos graxos correspondentes e glicerol.

A clivagem de ligações éster de acilgliceróis geralmente ocorre de maneira sequencial, de modo que o meio reacional em um determinado instante pode conter uma mistura de acilgliceróis (mono- e diacilgliceróis), glicerol e água (Castro *et al.*, 2004; Patil *et al.*, 2011). A Figura 1 mostra o esquema da hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases.

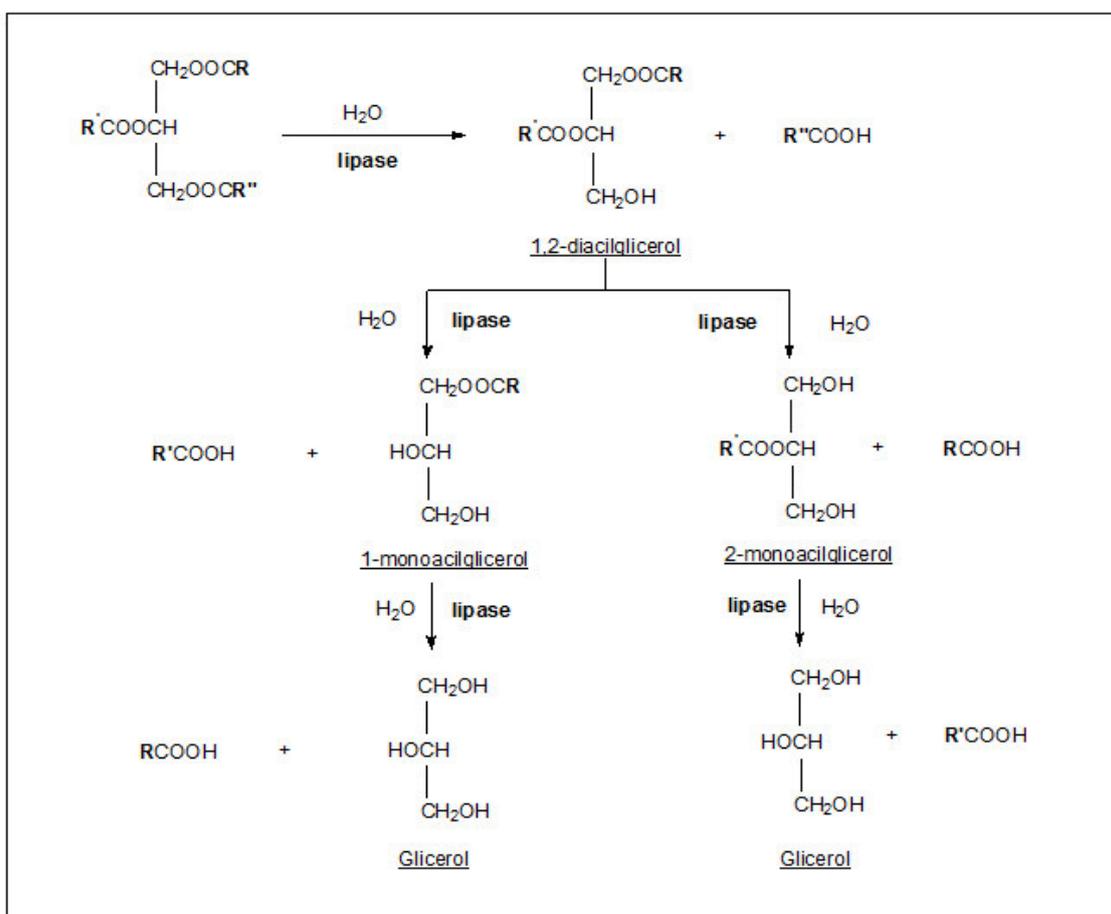


Figura 1. Mecanismo geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases

De acordo com Jaeger & Reetz (1998), as lipases podem ser consideradas uma classe especial de esterases. As esterases (esterases-carboxiléster hidrolases,

E.C.3.1.1.1) também catalisam reações de hidrólise, porém sua atividade enzimática é restrita a hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em meio aquoso.

Durante algum tempo a diferenciação entre lipases e esterases foi baseada em suas propriedades cinéticas. Segundo alguns trabalhos, as lipases seriam ativadas na presença de substratos emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica somente sobre substratos solúveis em água (Sarda & Desnuelle, 1958; Sharma *et al.*, 2001).

O mecanismo de “ativação interfacial” das lipases foi elucidado a partir da década de 90, quando as estruturas tridimensionais das lipases de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991) e da lipase pancreática humana (Winkler *et al.*, 1990) foram determinadas.

A maioria das lipases apresenta uma estrutura anfifílica composta por uma cadeia polipeptídica helicoidal móvel chamada tampa ou lid que recobre o sítio catalítico da enzima isolando-o do meio reacional. Na presença de uma interface hidrofóbica (lipídeo-água, água-solvente orgânico, micelas) esta tampa sofre uma mudança conformacional expondo o sítio ativo da enzima favorecendo a ligação com o substrato (Jaeger *et al.*, 1999; Pleiss, 1998).

Embora esta estrutura esteja comumente associada a este fenômeno, descobriu-se recentemente que a presença da tampa hidrofóbica não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial visto que algumas lipases como as de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B e a lipase pancreática humana possuem uma tampa hidrofóbica recobrendo seus sítios ativos, porém não exibem ativação interfacial (Jaeger; Dijkstra; Reetz, 1998; Thomas *et al.*, 2005). Desta forma, todas as lipases que apresentam o fenômeno de ativação interfacial possuem a tampa hidrofóbica, mas o contrário não pode ser afirmado.

As lipases têm sido definidas nos trabalhos mais recentes como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono (Verger, 1997; Sharma *et al.*, 2001). Enzimas que apresentam capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia curta (<10 átomos de carbono) são classificadas genericamente como estearases (Bornscheuer, 2002 ; Castro-Ochoa *et al.*, 2005).

A especificidade preferencial dessas duas enzimas também tem sido utilizada como critério para diferenciá-las. Os substratos naturais para lipases são óleos e

gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplices, enquanto estearases atuam sobre ligações simples, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (Brockman, 1984).

Vale aqui ressaltar que, a maioria das lipases atualmente conhecidas pode hidrolisar os substratos de estearases, mas o contrário não é observado (Bornscheuer *et al.* 2002; Nini *et al.*, 2001; Tomic & Ramek, 2006).

### **2.1.2. Fontes e Propriedades Bioquímicas das lipases**

As lipases são enzimas que tem sido isoladas de diferentes organismos (animais, vegetais, bactérias, fungos e leveduras) (Kumar *et al.*, 2005; Trevisan, 2004).

Atualmente, um grande número de microorganismos é capaz de produzir estas enzimas. Contudo, alguns autores destacam que ainda existe uma grande diversidade de microorganismos a ser explorada ressaltando a necessidade da triagem e do isolamento de novas cepas produtoras de lipases com características desejáveis para aplicação em biocatálise (Wubbolts *et al.*, 2000).

Do ponto de vista industrial e econômico, as lipases de origem microbiana obtidas por fermentação são as mais utilizadas em função da abundância de espécies capazes de sintetizá-las, por serem extracelulares e por permitirem um maior controle do processo sendo facilmente recuperadas do meio de fermentação (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases fúngicas (ex. *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *R.oryzae*, *Rhizomucor miehei*, etc) em especial e as obtidas de algumas leveduras (ex: *Candida rugosa*, *Candida Antarctica*, *Yarrowia lipolytica*, etc) são as mais estudadas por serem consideradas não nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS , Generally Regarded as Safe (Jaeger *et al.*, 1994).

As lipases de origem bacteriana (ex. *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *Burkholderia* (*P.*) *cepacia*), *Burkholderia* sp e *Arthrobacter* sp, *P. fluorescens*) apresentam como principais vantagens em relação as lipases de origem fúngica o rápido crescimento celular e uma maior estabilidade em meios alcalinos (Gupta, 2004; Ruiz *et al.*, 2003).

As lipases apresentam uma grande variação em suas propriedades moleculares tais como massas molares e ponto isoelétrico, e propriedades físico-químicas como pH ótimo e temperatura ótima de atuação, estabilidade frente ao pH e à temperatura, bem como especificidade frente a diversos substratos. Porém, estas propriedades podem

variar acentuadamente dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo (Hasan *et al.*, 2006 ; Wilson *et al.*, 2006)

Dependendo de sua origem, as lipases podem apresentar massa molecular variando entre 20 e 176 kDa, atividade na faixa de pH compreendida entre 4 e 11 e temperaturas ótimas de atuação variando desde ambiente até 80°C (Gupta *et al.*, 2004; Pahoja & Sethar, 2002; Patil *et al.*, 2011).

Lipases são geralmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura situada no intervalo de 30 a 40°C (Vulfson, 1994). O ponto isoelétrico (pI) comumente encontrado em lipases obtidas de fungos e leveduras situa-se entre 4 e 6, com algumas exceções cujos valores estão situados no intervalo de 7 a 9, enquanto as lipases bacterianas exibem valores de ponto isoelétrico situados no intervalo de 4-10 (Jaeger *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2004).

A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas de algumas lipases obtidas de diversos organismos.

**Tabela 1. Propriedades físico-químicas de algumas lipases**

<b>Lipases</b>	<b>Intervalo de pH</b>	<b>T<sub>atuação</sub> (°C)</b>	<b>Referência</b>
<i>Candida rugosa</i>	5 - 8	35 - 50	López <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida antarctica A</i>	6 - 10	35 - 70	Pfeffer <i>et al.</i> , 2006
<i>Candida antarctica B</i>	6 - 9	35-70	Olek & Christensen, 2002
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6 - 9	30 - 50	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus niger</i>	6 - 8	40 - 55	Shu <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,5 - 7,5	35 - 45	Ogino <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus subtilis</i>	8 - 10	30 - 40	Lesuisse <i>et al.</i> , 1993
<i>Geotrichum candidum</i>	6,5 - 8	32 - 42	Burkert <i>et al.</i> , 2004
<i>Streptomyces rimosus</i>	8,5 - 10	45 - 60	Abrimic <i>et al.</i> , 1999
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4 - 7	30 - 45	Aloulou <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhizopus niveus</i>	5 - 7	30 - 45	Uhlig, 1998
<i>Rhizomucor miehei</i>	6,5 - 7,5	30 - 40	Abbas <i>et al.</i> , 2002
<i>Pâncreas suíno</i>	6 - 9	40 - 55	Godfrey & West, 1996

### 2.1.3. Estrutura tridimensional, mecanismo catalítico e ativação das lipases

A maioria das lipases caracterizadas até o momento por difração de raios X apresenta uma estrutura terciária comum, denominada conformação (ou dobramento)  $\alpha/\beta$  hidrolase, composta por uma seqüência de  $\alpha$  hélices e folhas  $\beta$ -pregueadas (Bornscheuer, 2002; Schrag & Cygler, 1997) e seus sítios catalíticos são formados por uma “tríade catalítica” composta pelos resíduos de aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico ou glutâmico (Asp/Glu).

Este tipo de conformação tridimensional apresenta um núcleo central formado por uma folha  $\beta$  central, consistindo de oito diferentes fitas  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ), conectadas com seis  $\alpha$  hélices (A-F) (Pouderoyen *et al.*, 2001).

As fitas  $\beta$  têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita formam um ângulo de aproximadamente  $90^\circ$  entre si. A Figura 2 mostra o modelo estrutural das  $\alpha/\beta$  hidrolases.

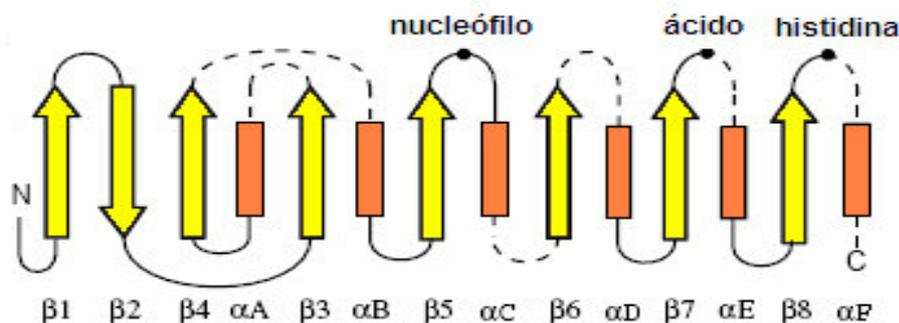


Figura 2 - Modelo estrutural de  $\alpha/\beta$  hidrolases (Fonte: Pouderoyen *et al.*, 2001, com modificações).

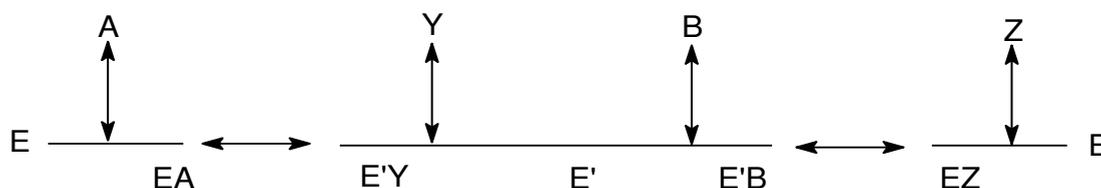
O fragmento mínimo deste dobramento, presente em todas as lipases contém cinco folhas  $\beta$  e duas  $\alpha$  hélices (B e C na Figura 2). Além disso, a hélice A faz parte de todas as lipases, com exceção das lipases de *Rhizomucor miehei*.

### 2.1.4. Mecanismo catalítico das lipases

As lipases, assim como as esterases e as serino-proteases, catalisam suas reações de hidrólise ou esterificação de maneira similar devido à semelhança estrutural entre os seus sítios catalíticos.

O mecanismo catalítico das lipases é normalmente descrito pelo modelo Ping-Pong Bi-Bi e foi proposto para o tipo de reação que envolve dois substratos (A e B) e dois (Y e Z) produtos (Bi Bi). Neste mecanismo, um ou mais produtos são formados antes que todos os substratos tenham se ligado a enzima. A enzima existe como duas espécies cataliticamente ativas, cada uma reconhecendo um substrato específico e

transformando-os em produtos enquanto sofre uma mudança conformacional (Illanes, 2008). A Figura 3 ilustra o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi:

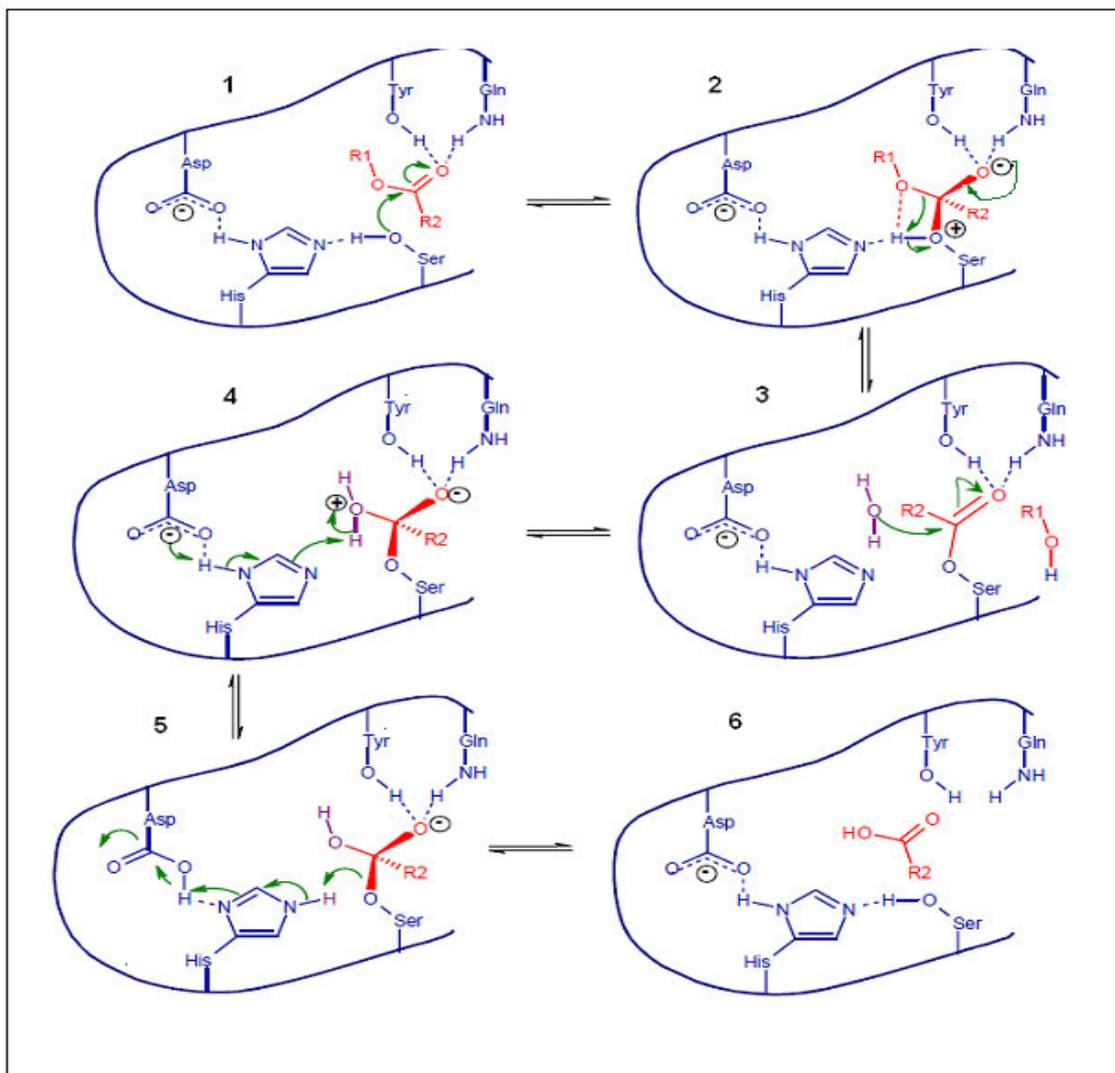


**Figura 3. Representação esquemática do mecanismo Ping-pong Bi-Bi. A e B são substratos; Y e Z são produtos; E e E' são diferentes conformações da enzima livre; EA, E'Y, E'B e EZ são estados de transição. (Fonte: Illanes, 2008).**

No mecanismo apresentado na Figura 3, a enzima E reconhece o substrato A e o converte no produto Y ao mesmo tempo em que sofre uma mudança conformacional passando para a forma E' após a liberação do primeiro produto da reação. Esta nova estrutura não reconhece o substrato A, mas se liga ao substrato B convertendo-o no produto Z sofrendo novamente uma mudança estrutural retornando a conformação inicial E após liberação deste produto.

Independente da reação catalisada este mecanismo é o mais aceito para estas enzimas (Paiva *et al.*, 2000).

Para exemplificar este mecanismo, a Figura 4 ilustra a hidrólise de um éster na presença destas enzimas.



**Figura 4. Mecanismo proposto da reação de hidrólise de ligações éster catalisadas por lipases e esterasas . (1) ataque nucleofílico da hidroxila do resíduo serina ao carbono carbonílico da ligação éster; (2) formação do primeiro intermediário tetraédrico; (3) formação do complexo acil-enzima e ataque nucleofílico da água; (4,5) formação do segundo intermediário tetraédrico e (6) liberação do segundo produto da reação (éster) e restauração do sítio catalítico da enzima para um novo ciclo. (Fonte:Silva, 2012; Ghanem, 2007, com modificações)**

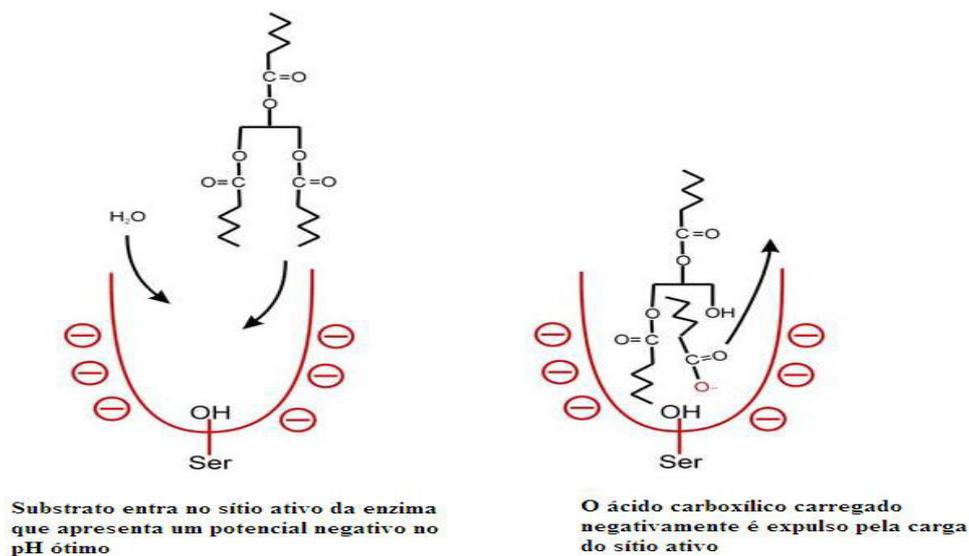
Inicialmente o resíduo de histidina que atua como uma base ativa o grupo hidroxila da serina aumentando o seu caráter nucleófilo. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono da ligação éster do substrato (doador acila) rompendo a ligação C=O e dando origem ao primeiro intermediário tetraédrico (1) que é estabilizado pelos resíduos catalíticos de histidina e aspartato ou glutamato. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas ligações de hidrogênio formadas com as ligações amida entre os resíduos de aminoácidos específicos que pertencem à chamada “cavidade do oxianion” (representados na figura por Tyr e Gln)

que estão localizados de forma apropriada e servem como formadores de pontes de hidrogênio, estabilizando a carga negativa do oxigênio do grupo carbonila.

Na segunda etapa, o intermediário tetraédrico é desfeito pelo restabelecimento da ligação C=O e subsequente clivagem da ligação éster com liberação de uma molécula do primeiro produto, um álcool, formando assim o complexo acil-enzima (3).

No terceiro passo, uma molécula de água (aceptor acila), que atua como nucleófilo ataca o carbono carbonílico do intermediário acil enzima, abrindo a ligação C=O, formando um segundo intermediário tetraédrico (4 e 5). Na última etapa (6), com a formação de uma nova ligação C=O, o segundo intermediário tetraédrico é desfeito, ocorrendo à liberação do segundo produto, um ácido carboxílico e a enzima é regenerada para um novo ciclo de reação (Bornscheuer, 2002; Jaeger *et al.*, 1994).

O desbloqueio do sítio catalítico das lipases para um novo ciclo de reação é atribuído a um mecanismo denominado “catapulta eletrostática” proposto por Petersen (2001). Este mecanismo considera que o sítio catalítico de uma lipase atuando na sua condição de pH ótimo apresenta uma carga negativa que por repulsão eletrostática libera o ácido carboxílico obtido na reação de hidrólise deixando o sítio ativo disponível para um novo ciclo, aumentando a eficiência da enzima. O modelo de desbloqueio do sítio catalítico das lipases proposto por Petersen *et al.* está apresentado na Figura 5.



**Figura 5. Mecanismo da catapulta eletrostática (Almeida, 2005; Petersen *et al.* 2001, com modificações).**

Embora a carga do sítio ativo aumente com o pH, a atividade máxima destas enzimas ocorreria em um intervalo de pH entre 6 e 10. Em valores de pH acima do

ótimo, ocorreria a desestabilização da estrutura da enzima, ocasionando a perda de sua funcionalidade (Petersen *et al.*, 2001).

### 2.1.5. Lipases de *Rhizomucor miehei*

Lipases de *Rhizomucor miehei* (Rml) ou *mucor miehei* são proteínas extracelulares de origem fúngica constituídas de 269 aminoácidos possuindo uma massa molecular de 29 kDa e um ponto isoelétrico (pI) de 3,8 (Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2010; Wu, 1996).

Seus sítios catalíticos são formados pelos resíduos dos aminoácidos serina 144, histidina 257 e aspartato 203 (Brady *et al.*, 1990; Hedfors, 2009). O esqueleto dos resíduos serina 82 e leucina 145 constituem a “cavidade do oxianion” (Norin *et al.*, 1994). A região da tampa hidrofóbica (lid) é constituída de resíduos de aminoácidos que vão desde a posição 85 até a 91 (Brzozowski *et al.*, 1991). A Figura 6 mostra a estrutura secundária da lipase de *Rhizomucor miehei* (Rml).

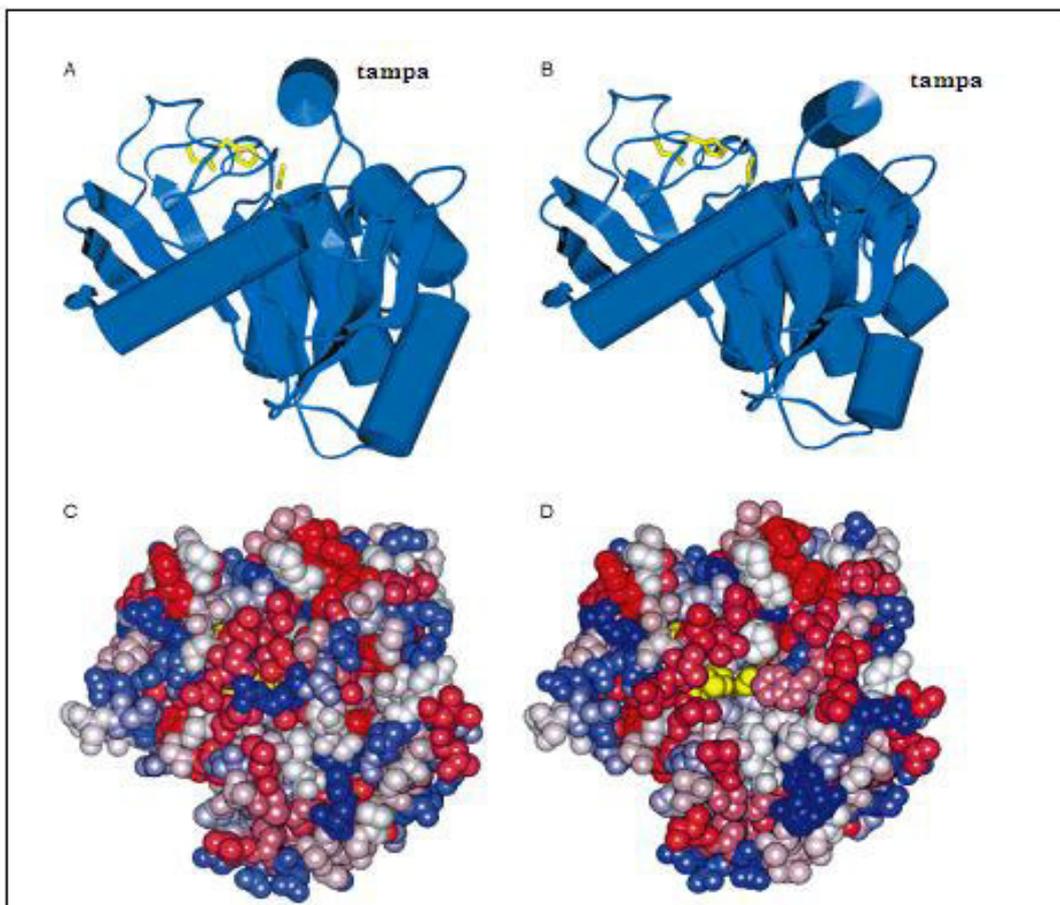


Figura 6. Estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei*. (Fonte: Brzozowski *et al.*, 1992).

A lipase de *Rhizomucor miehei* (Rml) foi a primeira lipase cuja estrutura foi elucidada (Brady *et al.*, 1990; Derewenda *et al.*, 1992).

Estes estudos também comprovaram que esta enzima exibe uma pronunciada ativação interfacial na presença de um substrato específico na interface lipídeo-água.

A Figura 7 mostra a estrutura e o mecanismo de ativação interfacial para esta lipase.



**Figura 7.** Estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei* mostrando sua conformação fechada (A, C) e aberta (B, D). A e B (vista lateral): a tríade catalítica (em amarelo) e a estrutura secundária mostrando o dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase comum a todas as lipases. C e D (vista superior): modelo do espaço preenchido, colorido por decréscimo de polaridade (azul escuro- levemente azul- branco- levemente vermelho-vermelho escuro). Após o deslocamento da tampa hidrofóbica, a tríade catalítica (em amarelo) torna-se acessível ao substrato (D), e a região ligada à interfase torna-se significativamente mais apolar. (Fonte: Schmid & Verger, 1998).

Atualmente, esta enzima é comercializada na forma solúvel (Palatase 200L) ou na forma imobilizada (Lipozyme RM IM) por fabricantes como a Sigma e a Novozymes. O suporte utilizado na imobilização desta lipase é a Duolite ES562, uma resina de troca iônica fraca formada pelo copolímero fenol-formaldeído (Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2010).

### 2.1.6. Reações catalisadas por lipases

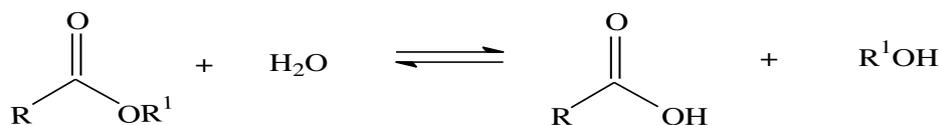
Além da clivagem de ligações éster, as lipases em ambientes aquo-restritos podem catalisar a reação inversa de síntese, com a formação de uma ligação éster a partir de uma molécula de álcool e de um ácido carboxílico específico.

Na presença de lipases, estes mecanismos catalíticos (hidrólise e síntese) podem estar associados resultando em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação) dependendo dos reagentes de partida e do meio reacional utilizado.

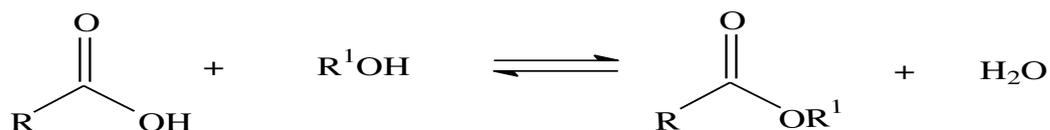
Em função dos reagentes utilizados como nucleófilos, estas enzimas podem catalisar reações de aminólise (formação de amidas), tioesterificação, lactonização, formação de perácidos e polimerização em solventes orgânicos com elevada seletividade.

Alguns exemplos de reações catalisadas por lipases estão mostrados abaixo.

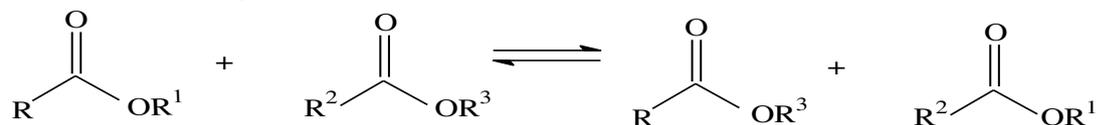
#### 1. Hidrólise



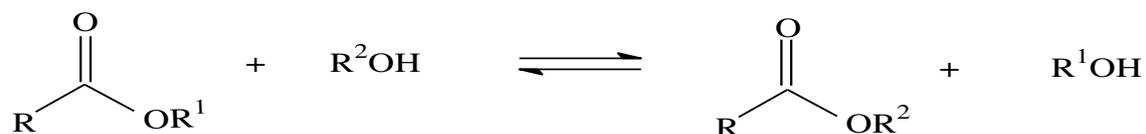
#### 2. Esterificação



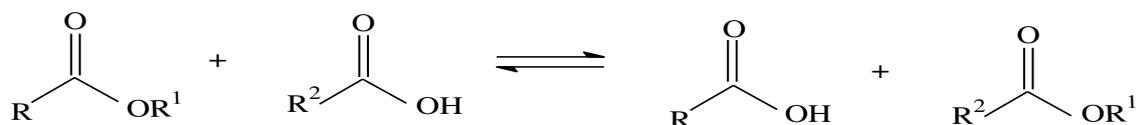
#### 3. Interesterificação



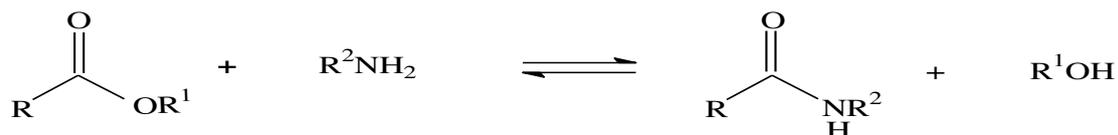
#### 4. Alcoólise



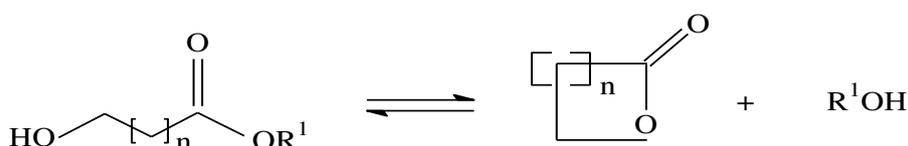
### 5. Acidólise



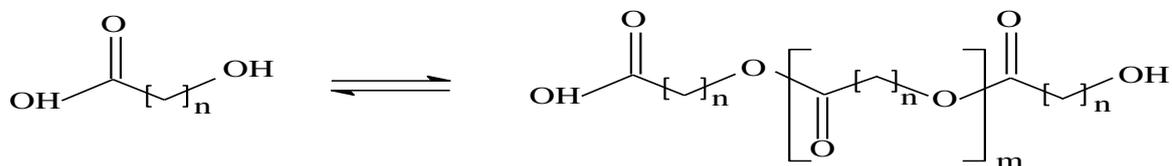
### 6. Aminólise



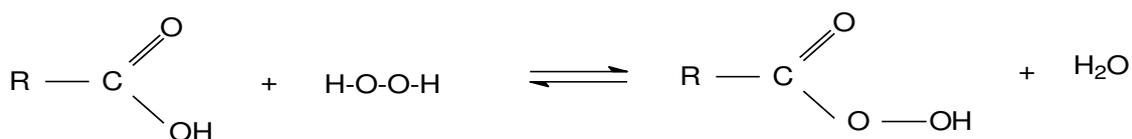
### 7. Lactonização



### 8. Policondensação



### 8. Formação de perácidos



Lipases de diferentes fontes podem catalisar os mesmos tipos de reações, embora o desempenho sob as mesmas condições reacionais possam apresentar diferenças acentuadas (Castro *et al.*, 2004; Yahya *et al.*, 1998).

A grande versatilidade demonstrada por esta classe especial de enzimas deve-se principalmente a algumas de suas características únicas como especificidade, enantiosseletividade e regiosseletividade.

Processos biocatalíticos mediados por lipases permitem a síntese de substâncias com elevado grau de pureza, minimizando problemas de reações laterais como

decomposição, isomerização, racemização e rearranjo. Além destas características, as lipases podem atuar em condições brandas de temperatura e pH.

Em função destas propriedades, o aproveitamento biotecnológico destas enzimas nos mais variados campos de aplicação tem sido estudado (Gupta *et al.*, 2003; Villeneuve, 2007 ; Saxena *et al.*, 2003).

Dados reportados na literatura mostram que as lipases representam cerca de 35% das enzimas utilizadas no desenvolvimento de processos bioquímicos de interesse (Paques & Macedo, 2006).

Neste contexto, lipases de diversas origens vêm sendo empregadas na produção de biossolventes (solventes orgânicos obtidos de fontes renováveis) (Bouaid *et al.*, 2007), de lubrificantes (Åkerman, 2011), de aditivos para combustíveis (Orrego *et al.*, 2009), na obtenção de aromatizantes e flavorizantes (Ghamgui *et al.*, 2006; Rajendran *et al.*, 2009), na síntese de fármacos (Rasor & Voss, 2001), na modificação de óleos e gorduras (Nunes *et al.*, 2010) e na produção de biodiesel (Salis *et al.*, 2008) entre outras aplicações de interesse.

Além das aplicações acima mencionadas, vários estudos para a utilização de lipases em síntese orgânica têm envolvido a resolução de misturas racêmicas. A indústria farmacêutica, por exemplo, é um setor do segmento industrial que tem demonstrado grande interesse nesta área uma vez que a atividade biológica de interesse de algumas drogas comercializadas na forma de misturas racêmicas está associada a apenas um dos enantiômeros (-R ou -S) presentes na mistura (Gotor-Fernandez, 2006; Ghanem, 2007).

Lipases de diferentes fontes tem sido utilizadas com relativo sucesso na resolução cinética de racematos em meio orgânico (separação em virtude da diferença nas velocidades de reação de cada enantiômero com o biocatalisador) para a obtenção de substâncias enantiomericamente puras (Chen *et al.*, 2005; Sharma, 2011; Tauchi, 2006)

Lipase de *Rhizomucor miehei*, em particular, tem sido frequentemente utilizada como catalisador industrial na modificação de gorduras, na indústria de cosméticos, em reações de esterificação e transesterificação e na indústria de alimentos (Houde *et al.*, 2004; Srianta, 2010). Além destas aplicações, esta enzima vem sendo empregada na resolução de misturas racêmicas de álcoois, ésteres e ácidos quirais (Alcántara *et al.*, 1998; Stonkus *et al.*, 2001).

Esta enzima também tem sido empregadas com sucesso na síntese de novas classes de surfactantes e novos emulsificantes de grande interesse na indústria de alimentos (Kiran *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2003), na síntese de ésteres terpênicos (; Laboret *et al.*, 1999; Shieh *et al.*, 2000), na hidrólise e síntese de alguns polímeros (Fernandez-Lafuente *et al.*, 2010; Fehling *et al.*, 2007), em reações de lactonização (Yadav *et al.*, 2007), formação de ligações amida (Liu *et al.*, 2007) e tiotransesterificação (Weber *et al.*, 2006).

## **2.2. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES INDUSTRIAIS**

### **2.2.1. Tecnologia enzimática**

Do ponto de vista técnico e econômico, a utilização de enzimas em processos industriais requer a reutilização ou uso contínuo do biocatalisador por longos períodos de tempo com manutenção de sua atividade catalítica.

A utilização de enzimas na forma solúvel (livre) apresenta uma série de inconvenientes dentre os quais podemos citar o custo relativamente alto das enzimas, inativação parcial durante a estocagem, falta de estabilidade operacional das mesmas e a necessidade de sistemas eficientes de separação enzima-produtos, geralmente dispendiosos, que possibilitem sua reutilização durante vários ciclos de reação evitando a contaminação do produto (Guisán, 2006; Lopez-Gallego *et al.*, 2005) .

Sendo assim, a estabilização da estrutura tridimensional de uma enzima é o fator preponderante para a sua utilização como biocatalisador em processos industriais (Haki e Rakshit, 2003).

Dentre as várias alternativas sugeridas para contornar as limitações impostas pela utilização de enzimas na forma solúvel em processos industriais podemos citar:

- (i) utilização de enzimas termófilas mais resistentes a inativação por efeitos de temperatura (Adams & Kelly, 1998);
- (ii) produção de cepas mais resistentes a condições de desnaturação e adequadas a finalidades específicas através da utilização de técnicas avançadas de engenharia de proteínas (Svendsen, 2000);
- (iii) modificação química da superfície de proteínas (Fernández-Lorente *et al.*, 2008; López-Gallego *et al.*, 2005 );
- (iv) utilização de técnicas de imobilização (Mateo *et al.*, 2004).

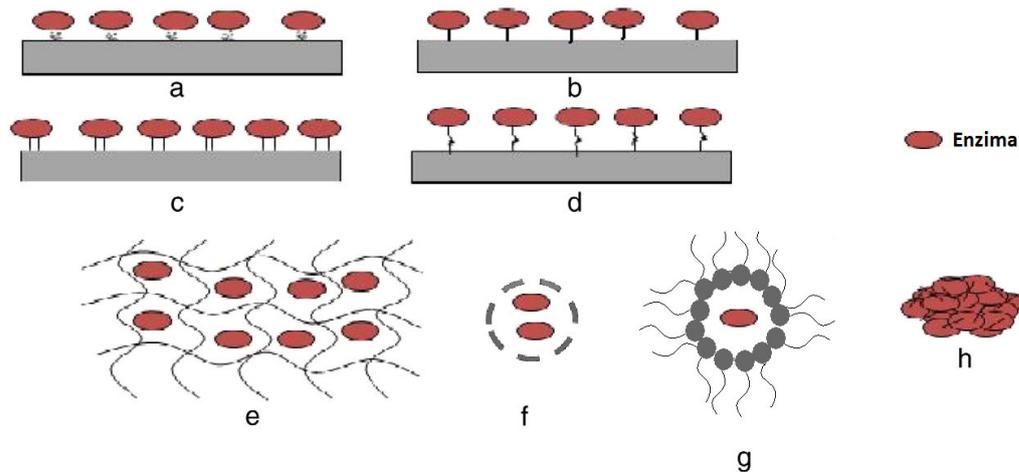
As alternativas citadas acima podem ser utilizadas individualmente ou em alguns casos podem atuar conjuntamente (Abian *et al.*, 2004; Gupta, 1991).

O desenvolvimento de métodos de imobilização ainda é de longe a alternativa mais utilizada para contornar todos os inconvenientes anteriormente citados e vários protocolos de imobilização de enzimas em diversos suportes (matrizes) insolúveis tem sido estudados.

De acordo com a IUPAC (1995), enzimas imobilizadas “são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados numa certa região definida do espaço com a retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente”. No processo de imobilização a enzima pode estar fisicamente confinada em uma matriz sólida ou pode estar ligada física ou quimicamente a um suporte por meio de interações específicas (Vitolo, 2001).

As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, a possibilidade de utilização em processos contínuos, maior controle de processos, fácil separação enzima-produtos, redução do volume de reação (alta concentração de enzima em um menor volume de reator) e a reutilização do biocatalisador durante vários ciclos sem perda significativa de sua atividade (Persson *et al.*, 2002; Palomo *et al.*, 2002).

As técnicas de imobilização de enzimas podem ser agrupadas em três categorias distintas: (i) aqueles que envolvem a interação da enzima com uma matriz (suporte) usualmente através de uma ligação química e (ii) aqueles em que a enzima está confinada em um espaço delimitado e (iii) ligação cruzada intermolecular enzima-enzima. A Figura 8 mostra os principais métodos de imobilização de enzimas.



**Figura 8. Principais métodos de imobilização de enzima. (a) adsorção; (b) ligação covalente unipontual; (c) ligação covalente multipontual; (d) ligação covalente via espaçadores químicos; (e) confinamento em gel; (f) encapsulamento em membranas; (g) encapsulamento em micelas e (h) ligação cruzada intermolecular enzima-enzima. (Fonte: Idris & Bukhari, 2012, com modificações).**

Cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens uma vez que este processo é geralmente acompanhado de mudanças na atividade catalítica, no intervalo de pH ótimo, na faixa de temperatura de atuação e na estabilidade da enzima (Besanger *et al.*, 2003; Bommarius & Riebel, 2004).

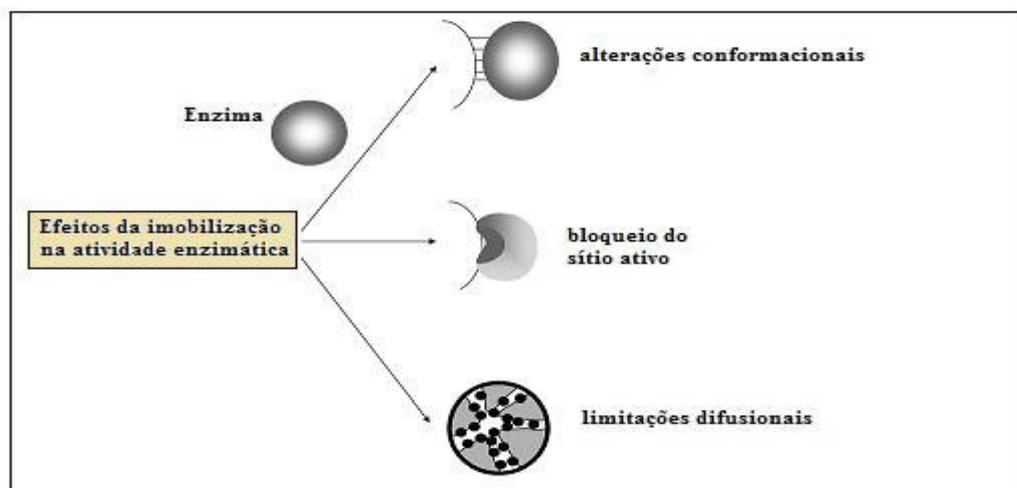
As diferenças de comportamento da enzima após imobilização quando comparada a sua forma solúvel são, devidas principalmente a: (Ozyilmaz, 2009).

(a) alterações conformacionais na molécula da enzima durante o processo de imobilização modificando a estrutura terciária do sítio ativo;

(b) efeitos difusionais ou de transferência de massa internos e externos que limitam a difusão de substratos em direção ao sítio ativo da enzima e dos produtos formados para o meio reacional;

(c) impedimentos estéricos (efeitos estereoquímicos) que tornam o sítio catalítico da enzima inacessível ao substrato.

A Figura 9 apresenta alguns dos principais efeitos gerais causados pela imobilização na atividade enzimática.



**Figura 9. Efeitos da imobilização na atividade enzimática.**

Estas alterações são decorrentes não só de possíveis mudanças estruturais na enzima ao longo do processo de imobilização, mas também das propriedades químicas e físicas do suporte empregado que podem influenciar marcadamente a afinidade da enzima pelo substrato.

É importante ressaltar também que, após a imobilização, a enzima estará circundada por um microambiente diferente do habitual, o que também pode causar alterações pronunciadas na sua atividade.

A adequada seleção do método que deverá ser utilizado na imobilização de enzimas deverá levar em conta:

- (i) o tipo particular de lipase que será imobilizada;
- (ii) as propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada;
- (iii) as características do meio reacional (aquoso, orgânico, sistema bifásico, etc.) e as condições do processo (pH, temperatura e pressão) a que a enzima será submetida após imobilização;
- (iv) a toxicidade dos reagentes empregados na imobilização;
- (v) custo do procedimento de imobilização.

## 2.3. Métodos de imobilização

### 2.3.1. Confinamento (aprisionamento) em gel

Esta técnica de imobilização consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz polimérica de baixa porosidade que ao mesmo tempo retém a proteína e permite a difusão de substratos e produtos da reação.

O processo de imobilização ocorre por polimerização *in situ* de uma solução do monômero na qual a enzima se encontra dissolvida (Sheldon *et. al.*, 2007a). Após polimerização, obtém-se uma rede polimérica artificial rígida ou semi-rígida delimitada por uma membrana porosa.

Polímeros naturais como alginato, carragenana e quitosana e alguns polímeros sintéticos como a poliacrilamida, poliuretanos e álcool polivinílico (PVA) tem sido extensivamente utilizados como matrizes neste tipo de imobilização.

Mais recentemente, matrizes porosas a base de sílica obtidas pelo processo sol-gel através da polimerização hidrolítica de precursores alquilsilanos ( $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ ) e suportes híbridos como o polisiloxano (POS) - álcool polivinílico (PVA) tem sido empregados nesta técnica. Dependendo das condições de polimerização são obtidos xerogéis, aerogéis e ambigéis (Pierre, 2004)

A principal vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage com o polímero evitando, assim, sua desnaturação (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

O confinamento no interior dos poros do gel evita que a enzima tenha contato direto com o meio reacional, minimizando os efeitos deletérios causados por bolhas de ar, agitação mecânica e solventes hidrofóbicos (Lalonde & Margolin, 2002).

Entretanto, este método de imobilização causa restrições significativas à transferência de massa através da membrana sendo necessárias altas concentrações de substrato para minimizar este efeito. Além deste inconveniente, os géis obtidos por esta técnica apresentam baixa capacidade de carga.

### 2.3.2. Inclusão em membranas

Enzimas podem ser retidas em membranas semipermeáveis que permitem a livre passagem de substratos e produtos da reação. A retenção da enzima pode ser conseguida por microencapsulamento ou pela retenção em membranas de ultrafiltração.

As membranas semipermeáveis que formam a microcápsula podem ser permanentes, quando obtidas por reações de polimerização, ou não permanentes quando são compostas por micelas reversas formadas por surfactantes (Arroyo, 1998).

A preparação de microcápsulas permanentes é feita misturando-se a solução enzimática a um fluido polimérico que solidifica em várias formas dependendo da aplicação (geralmente na forma de esferas). Polímeros naturais como alginato, quitosana, ágar, colágeno e polímeros sintéticos como a poliacrilamida tem sido bastante empregados como matrizes na preparação de microcápsulas. Entretanto, este tipo de microencapsulação está sujeito a limitações de transferência de massa e tem aplicação restrita a substratos de baixo peso molecular.

Micelas reversas formadas por surfactantes como o Triton, Tween, o dioctil sulfosuccinato de sódio (AOT) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) têm sido utilizadas com sucesso em várias reações enzimáticas por apresentarem propriedades interessantes uma vez que o microambiente é adequado para determinadas enzimas e limitações de transferência de massa são negligenciáveis (Carvalho & Cabral, 2000; Naoe *et al.*, 2004;).

A grande desvantagem da utilização deste sistema reside na dificuldade de recuperação do produto em larga escala devido à presença do surfactante e de outros possíveis componentes do meio reacional, como proteínas e água (Krieger *et al.*, 2004).

### 2.3.4. Imobilização não covalente em suportes

Geralmente referido como adsorção física, este método promove a ligação entre a enzima e um suporte sólido inerte por meio de interações fracas tipo van der Waals, ligações de hidrogênio ou interações iônicas.

É um método de fácil execução, de baixo custo, que promove pouca perturbação na estrutura nativa da enzima e geralmente é acompanhado por altos rendimentos de imobilização.

Sua principal limitação é que a enzima pode ser facilmente desorvida do suporte em sistemas aquosos ou por alterações de temperatura, pH e força iônica do

meio (Arroyo *et al.*,1998). Contudo, em solventes orgânicos, este fenômeno pode ser negligenciado e por esta razão, biocatalisadores contendo enzimas adsorvidas podem ser empregados com grande sucesso em catálises industriais que utilizam solventes imiscíveis em água (Malcata *et al.*, 1990 ; Secundo *et al.*, 2008).

Fatores como pH, força iônica e as propriedades da enzima (ex. ponto isoelétrico) e do suporte (ex. diâmetro do poro, caráter hidrofóbico/hidrofílico, área superficial, porosidade, etc) exercem influência significativa na eficiência deste tipo de imobilização (Villeneuve *et al.*, 2000).

Alumina, sílica, vidro de porosidade controlada, celite, celulose, nylon, polietileno, polipropileno, zeólitas e outros materiais têm sido empregados como suportes para adsorção de enzimas.

Uma variação dentro da técnica de adsorção consiste na imobilização de enzimas por intermédio de interações iônicas visto que a grande maioria das proteínas tende a ser adsorvida rapidamente em resinas aniônicas ou catiônicas. Por outro lado, meios com baixa força iônica ou súbitas alterações de pH podem promover a dessorção destas enzimas.

### **2.3.5. Imobilizações covalentes em suportes**

Esta técnica de imobilização é baseada na união covalente entre grupos funcionais disponíveis no suporte e grupos funcionais específicos presentes em resíduos de aminoácidos na estrutura da enzima, geralmente grupamentos amino (-NH<sub>2</sub>), hidroxila (-OH), tiol (-SH) e carboxílico (-COOH).

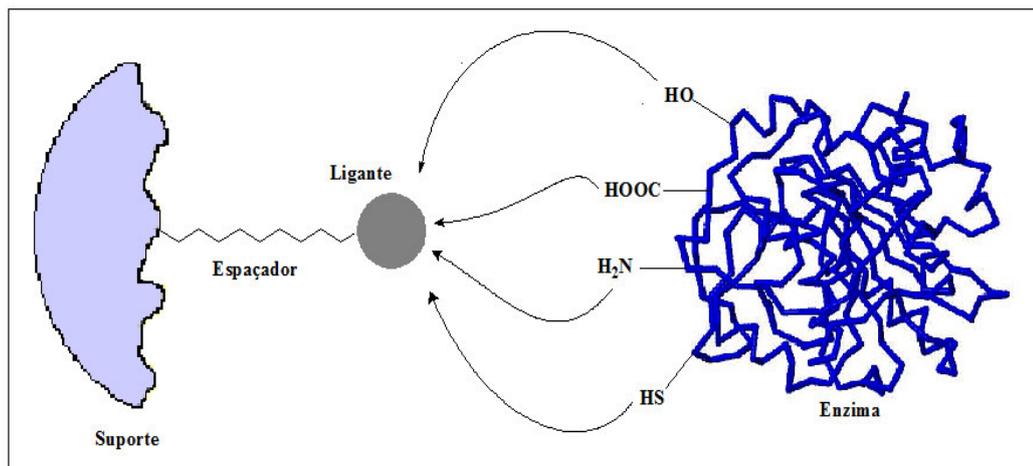
Por serem fortes e estáveis, as ligações covalentes estabelecidas entre a enzima e o suporte promovem uma grande estabilização da estrutura tridimensional da proteína evitando sua dessorção do suporte e prolongando a sua vida útil (Torres-Salas *et al.*, 2011).

Além desta vantagem, enzimas covalentemente ligadas a suportes insolúveis geralmente apresentam maior estabilidade térmica, resistência a variações de pH e exposição à solventes orgânicos (Miletic *et al.*, 2009).

Grande parte destes suportes não apresenta em suas estruturas grupos funcionais reativos que possam ser acoplados a enzima diretamente, mas possuem grupamentos amina, hidroxila, amida e carboxílicos que podem ser funcionalizados (ativados) por reagentes específicos.

A ativação de suportes pode ser efetuada por meio de reagentes como o brometo de cianogênio (CNBr), por espaçadores químicos ou pelo emprego de agentes bifuncionais ou polifuncionais como o glutaraldeído e o glicidol.

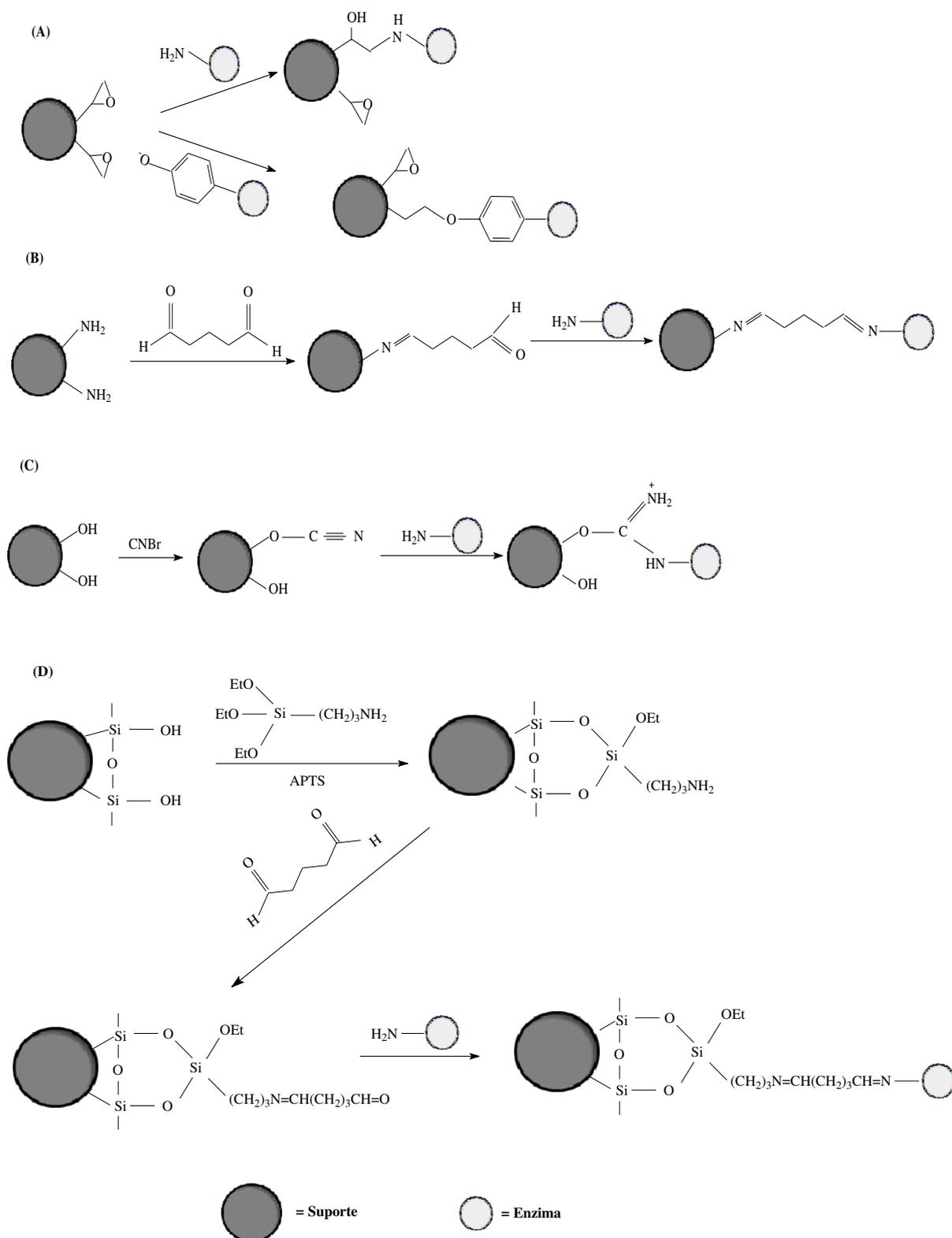
A utilização de espaçadores como agentes de alquilação, silanização e epoxidação (oxiranos) permite o distanciamento entre a enzima e o suporte de maneira que a ocorrência de impedimentos estéricos é minimizada (Cao, 2005; Fernández-Lorente *et al.*, 2001). A Figura 10 ilustra o mecanismo de ligação entre a enzima e o suporte ativado.



**Figura 10. Ligação de enzimas a suportes funcionalizados com espaçadores. ( Fonte: Tardioli, 2003, com modificações).**

A utilização de braços espaçadores curtos promove também uma maior estabilização da enzima tornando-a menos susceptível a inativação por altas temperaturas, presença de solventes orgânicos e variações bruscas de pH (Guisán *et al.*, 1988).

O emprego de reagentes bifuncionais como glicidol e glutaraldeído também tem sido uma estratégia amplamente utilizada na ativação de suportes para imobilização de enzimas. A Figura 11 apresenta resumidamente alguns processos utilizados na ativação de suportes e o mecanismo simplificado de ligação à enzima.



**Figura 11. Protocolos para imobilização covalente de enzimas. (A) ligação de enzimas a suportes contendo grupos epóxi; (B) ativação de suportes aminados com glutaraldeído ; (C) ativação em suportes contendo grupos hidroxilas com CNBr; (D) silanização e ativação de suportes com glutaraldeído. (Torres-Salas *et al.*, 2011, com modificações).**

Para que esta técnica de imobilização seja conduzida com sucesso alguns requisitos devem ser observados (Mateo *et al.*, 2007) :

- i. o suporte e a enzima deverão apresentar adequada congruência geométrica, isto é, o procedimento de imobilização deverá promover o correto alinhamento entre os grupos reativos do suporte e da enzima;
- ii. o suporte deverá apresentar grande superfície interna e uma alta densidade de grupos reativos;
- iii. os grupos reativos do suporte deverão reagir com grupos localizados frequentemente na superfície da enzima;
- iv. os grupos de ligação à enzima devem estar moderadamente afastados do suporte para que possíveis impedimentos estéricos sejam minimizados possibilitando acesso ao substrato ;
- v. os grupos reativos envolvidos na imobilização devem ser suficientemente estáveis quando longos períodos de incubação são necessários;
- vi. ao final do processo de imobilização deve ser obtido um biocatalisador com superfície inerte, eliminando-se ou bloqueando-se grupos reativos remanescentes sem que a enzima seja afetada.

Pelo exposto acima, apesar das vantagens inerentes a este tipo de imobilização, não existe um protocolo geral que possa ser seguido rigorosamente.

Na maioria dos casos, estudos mais aprofundados devem ser efetuados para a seleção de uma condição que atenda a todos ou a maioria dos requisitos acima mencionados, visando a obtenção de biocatalisadores apropriados para utilização em determinados processos.

### **2.3.6. Ligação cruzada intermolecular enzima-enzima**

Nesta técnica, também chamada de auto-agregação ou auto-imobilização por alguns autores, enzimas não são imobilizadas em suportes insolúveis, mas estão ligadas entre si formando uma estrutura tridimensional complexa (Brady *et al.*, 2009).

Utilizando este princípio duas modalidades de imobilização podem ser desenvolvidas.

No primeiro caso, as enzimas são inicialmente purificadas através de cristalização e logo em seguida são reticuladas com agentes bifuncionais como o glutaraldeído formando os CLECs ( cross linked enzyme crystals). Os derivados obtidos

neste procedimento geralmente apresentam alta estabilidade mecânica e resistência a altas temperaturas, solventes orgânicos e condições extremas de pH (Roy & Abraham, 2004). Entretanto, para a obtenção de um biocatalisador com estas características, extensivas etapas de purificação são requeridas visto que os agregados obtidos devem conter somente a enzima de interesse, condição que eleva o custo de sua preparação (Brady *et al.*, 2004).

Uma alternativa de menor custo consiste na reticulação de agregados de proteínas produzidos por técnicas convencionais de precipitação. Na preparação de CLEAS (cross linked enzyme aggregates) a precipitação de enzimas solúveis é efetuada pela adição de sais (ex.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), polietilenoglicol (PEG) ou solventes orgânicos miscíveis em água. Os agregados físicos de proteínas obtidos são em seguida reticulados com glutaraldeído, glutaraldeído-dextrana ou outros reagentes (Majumder *et al.*, 2008; Sheldon *et al.*, 2005).

Esta metodologia e algumas de suas variações tem sido empregadas na imobilização de algumas enzimas como nitrilases (Kaul *et al.*, 2007), penicilina acilase (Pchelintsev *et al.*, 2009), amino acilases (Bode *et al.*, 2003) e lipases (Kartal *et al.*, 2011; López-Serrano, 2002; Sheldon *et al.*, 2007). A Figura 12 ilustra a diferença entre estas duas metodologias

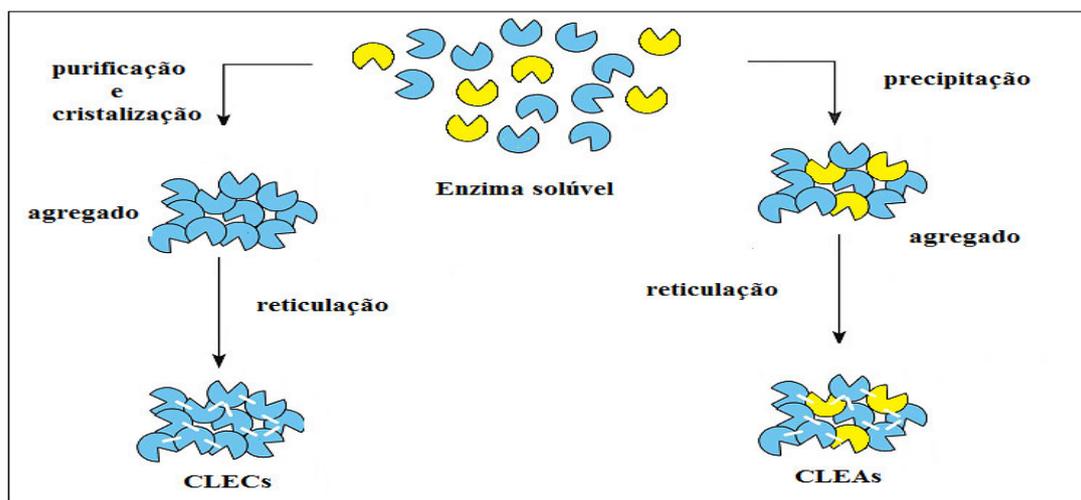


Figura 12. Formação de CLEAs e CLECs. (Fonte: López-Serrano *et al.*, 2002, com modificações).

#### 2.4. Seleção do suporte para imobilização

A escolha do suporte também é um fator determinante para que se obtenham biocatalisadores com características operacionais desejáveis. Os materiais utilizados

como suporte na imobilização de enzimas podem diferir em tamanho, densidade, porosidade e forma.

O suporte ideal deve possuir algumas propriedades como elevada estabilidade mecânica nas condições de operação do reator onde será empregado, deve ser facilmente separado do meio reacional para que possa ser reutilizado e deve apresentar resistência ao ataque microbiano.

Além das propriedades citadas, a seleção do suporte deverá levar em consideração características importantes como área superficial, caráter hidrofóbico/hidrofílico, disponibilidade de grupos funcionais na sua estrutura, capacidade de carga, porosidade, permeabilidade e custo, entre outros. A Figura 13 mostra alguns dos principais suportes de origem orgânica e inorgânica utilizados na imobilização de enzimas.

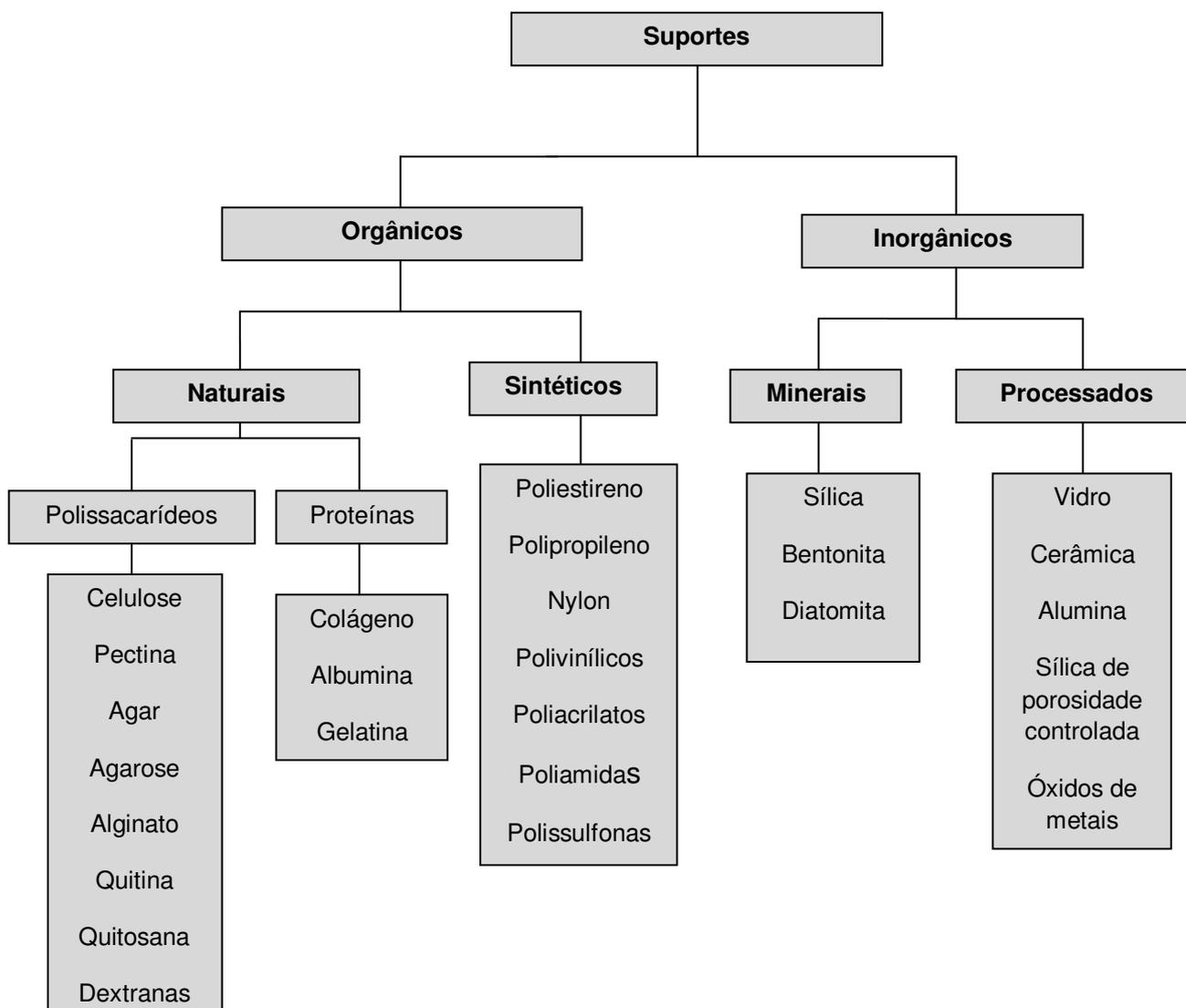


Figura 13. Suportes utilizados na imobilização de enzimas

Quanto à morfologia estes materiais geralmente são classificados como porosos, não porosos e de estrutura de gel (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

Os materiais porosos possuem grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. A imobilização neste tipo de suporte evita que a enzima sofra reações intermoleculares como agregação e autólise além de impedir a ação de proteases (proteólise) presentes no extrato enzimático bem como evita também interações indesejáveis com solventes orgânicos imiscíveis ou bolhas de ar originárias do fornecimento de gases ou da agitação turbulenta requerida para o controle do pH do meio reacional em alguns processos. Entretanto, deve-se observar que a maior área disponível para imobilização de enzimas nestes materiais se localiza na sua estrutura interna. Logo, o diâmetro de poro deste tipo de suporte deverá ser suficientemente elevado para permitir a acomodação da enzima e o transporte do substrato e produtos (Mateo *et al.*, 2007).

Suportes não porosos apresentam como grande limitação a pequena área superficial disponível para imobilização. A diminuição do tamanho das partículas ou a utilização destes materiais na forma de fibras tem sido apontada como uma maneira de contornar este inconveniente. Porém, a utilização do suporte nestas condições pode acarretar uma série de problemas em reatores contínuos entre os quais podemos citar a diminuição acentuada da vazão de operação e a alta queda de pressão no interior do reator.

Como principais vantagens, os suportes não porosos, ao contrário dos materiais porosos, possuem um custo relativamente baixo e apresentam grande compatibilidade por substratos macromoleculares.

Uma grande variedade de suportes naturais, sintéticos orgânicos, inorgânicos e materiais híbridos com diferentes tamanhos, formas e densidades têm sido empregados para a imobilização de enzimas.

Suportes inorgânicos são considerados mais adequados para uso industrial por apresentarem características desejáveis como alta estabilidade mecânica e térmica, resistência frente a solventes orgânicos e ao ataque microbiano além de serem facilmente regenerados por pirólise. Contudo, a ausência de grupos funcionais reativos que possam se ligar a grupos funcionais localizados na superfície das enzimas e o alto custo destes suportes torna sua utilização muitas vezes restrita.

O elevado custo na obtenção de biocatalisadores à base de suportes inorgânicos e polímeros sintéticos têm incentivado pesquisas no intuito de se buscar substâncias alternativas com propriedades semelhantes a estes suportes, porém com baixo custo de obtenção.

Diversos compostos de natureza orgânica têm sido utilizados para a obtenção de biocatalisadores, porém alguns biopolímeros como a quitosana são considerados uma alternativa promissora quando comparados aos suportes sintéticos orgânicos e inorgânicos por reunir características com grande disponibilidade, baixo custo, pouca toxicidade, biocompatibilidade e propriedades multifuncionais.

## **2.5. Quitina e quitosana**

### **2.5.1. Estrutura e propriedades**

A quitina, um polímero linear formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina, é um produto natural, de baixo custo, renovável e de grande importância econômica e ambiental. É o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose.

Este biopolímero está presente nas paredes celulares de fungos, leveduras e insetos sendo também encontrado nas carapaças de crustáceos, notadamente caranguejo, lagosta, siri e camarão que são considerados resíduos típicos da indústria pesqueira.

A quitina é um pó incolor, apresentando estrutura parte cristalina e parte amorfa, insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes, porém pode ser solubilizada em ácidos minerais concentrados com degradação simultânea da cadeia polimérica (Dallan *et al.*, 2005; Rodas *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004).

Estas características aliadas ao fato de que este polímero natural apresenta baixa reatividade química torna sua utilização bastante restrita, muito embora modificações químicas na sua superfície empregando reagentes específicos possam contornar esta limitação (Santos *et al.*, 2004)

A quitosana (poli-N-acetilglicosamina) é um oligossacarídeo proveniente da N-desacetilação da quitina em uma extensão variável caracterizada pelo grau de desacetilação (GD) que é uma medida da quantidade de grupamentos amina no polissacarídeo. Geralmente, o produto N-desacetilado da quitina só passa a ser considerado quitosana quando o grau de desacetilação for igual ou superior a 60%, percentagem a partir da qual o biopolímero se torna solúvel em soluções ácidas diluídas (Gosalves *et al.*, 2011).

Quitina e quitosana podem ser consideradas análogos estruturais da celulose, no qual o grupo hidroxila do carbono 2 (C2) é substituído por um grupo acetoamida e um grupo amina, respectivamente. A Figura 14 mostra as diferenças estruturais entre a celulose, a quitina e a quitosana.

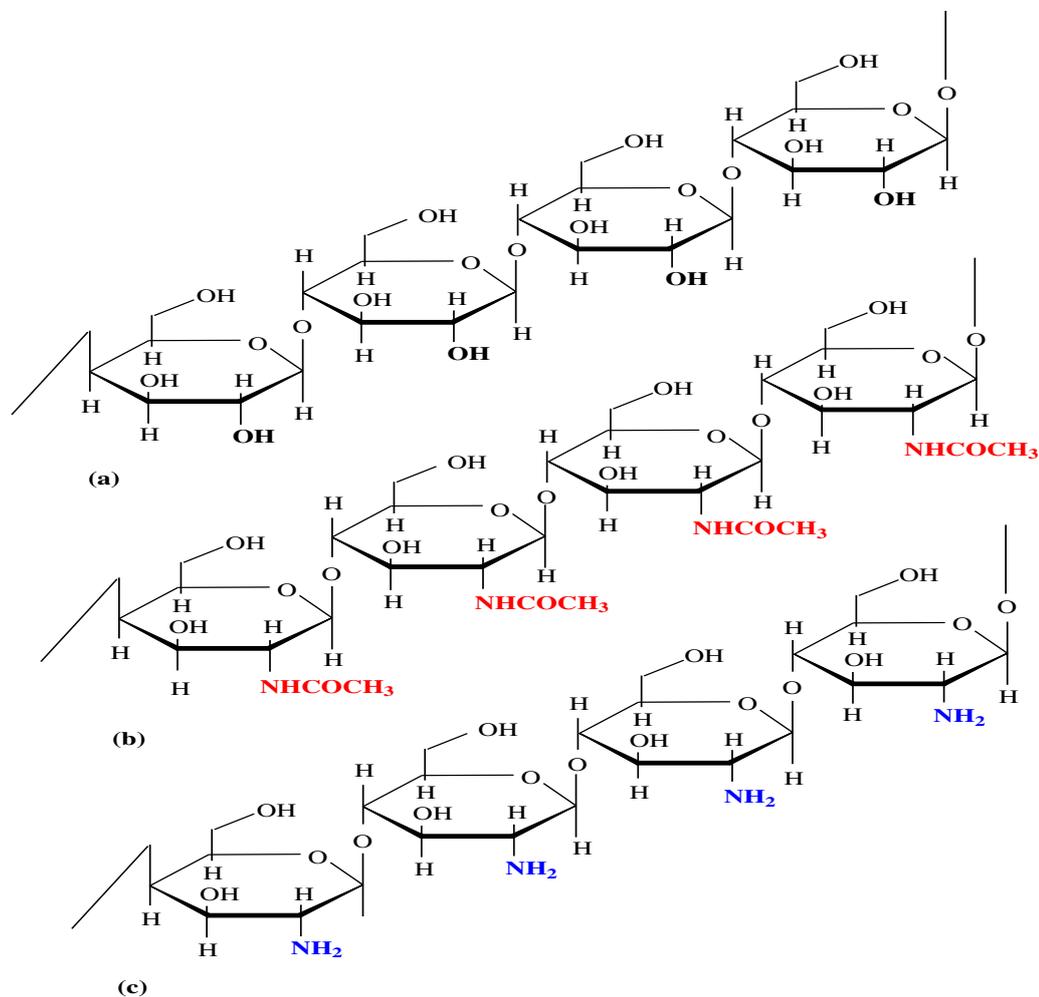


Figura 14. Estrutura da celulose (a) , quitina (b) quitosana(c)

Por ser um heteropolissacarídeo constituído de unidades acetiladas e desacetiladas, o grau de desacetilação (GD) da quitosana influi marcadamente em algumas de suas propriedades como o caráter ácido-base, solubilidade, hidrofobicidade e viscosidade de suas soluções (Gupta *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2000).

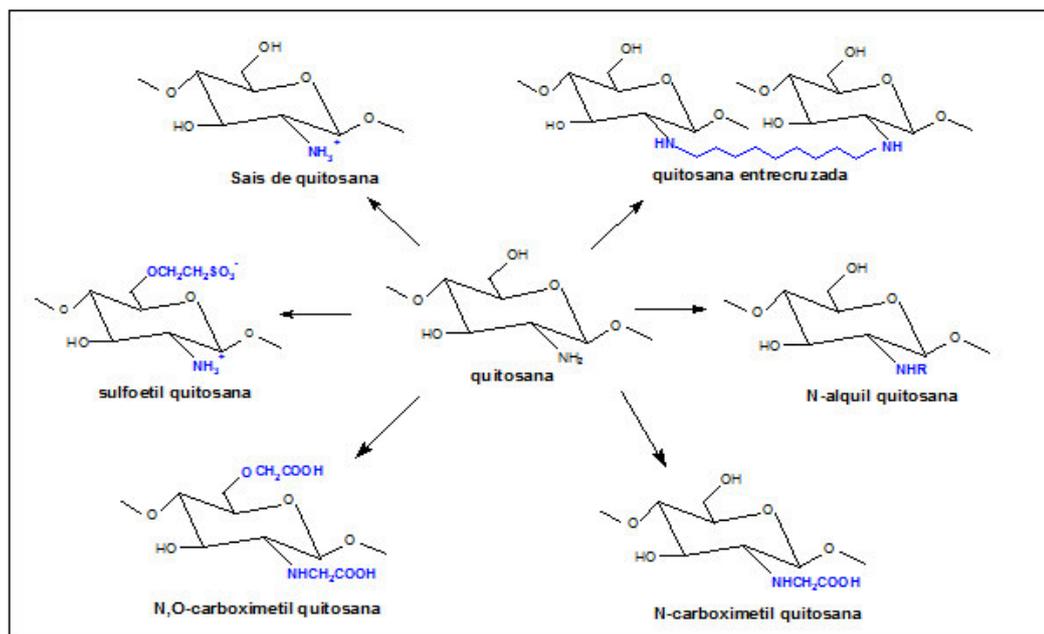
A quitosana pode ser considerada uma base fraca, apresentando pKa de seus grupos amina (-NH<sub>2</sub>) variando em torno de 6,3-7,2 o qual está estritamente relacionado ao seu grau de desacetilação e a sua densidade de carga (Yi *et al.*, 2005).

Este biopolímero, da mesma forma que a quitina, é um polímero insolúvel em água. Porém a presença de grupos amina (-NH<sub>2</sub>) em sua estrutura passíveis de

protonação ( $-\text{NH}_3^+$ ) em valores de pH abaixo de 6,5, torna possível a sua solubilização em soluções aquosas ácidas diluídas.

A quitosana é facilmente dissolvida em soluções diluídas de ácidos orgânicos como o ácido fórmico, acético, tartárico e cítrico, formando soluções altamente viscosas que precipitam formando um gel em pH alcalino ou pela formação de um complexo com polieletrólitos aniônicos (Berger, 2004; Yu, 2009). Géis de quitosana podem ser obtidos na forma de esferas (beads), membranas, filmes, cápsulas e esponjas (Krajveska *et al.*, 2004).

A presença de grupos amina (C-2 > C-6 > C-3) e também de grupamentos hidroxila bastante reativos (C-6 > C-3) permite que este material sofra inúmeras modificações na sua estrutura por intermédio de ligações químicas entre estes grupamentos e reagentes específicos fornecendo novas estruturas que podem ser utilizadas em diversas aplicações (Jayakumar *et al.*, 2007; Prashanth *et al.*, 2007; Rinaudo, 2006). Algumas das estruturas modificadas da quitosana estão mostradas na Figura 15.



**Figura 15. Estruturas modificadas da quitosana**

Em função de sua característica básica, a quitosana se comporta como um polieletrólito catiônico podendo formar agregados com compostos polianiónicos como o alginato, carragenana e pectina (Tapia *et al.*, 2004 ; Yu *et al.*, 2009) e quelatos com vários íons metálicos (Gotho, 2004; Vieira *et al.*, 2004).

Somada a estas propriedades, a quitosana, assim como a quitina, é considerada um polímero biocompatível, biodegradável, não tóxico, fisiologicamente inerte, possuindo também uma elevada afinidade por proteínas (Krajewska, 2004; Kasimova *et al.*, 2011).

Devido a estas peculiaridades aliada a sua grande versatilidade, a utilização da quitina e principalmente da quitosana nas suas mais variadas formas tem sido explorada em várias áreas do conhecimento.

A quitosana e seus derivados, em especial, têm sido empregados em processos de biorremediação na remoção de íons de metais pesados, de graxas, óleos e como agente de floculação de pigmentos e proteínas em efluentes industriais (Chao, 2004; Chen *et al.*, 2005; Simionato, 2006; Varma, 2004), como conservante na indústria de alimentos (Fai *et al.*, 2008), em sistema de liberação controlada de agroquímicos (Du *et al.*, 2007), no encapsulamento de fragrâncias e no preparo de loções e cremes na indústria de cosméticos (Kohei & Maki, 2006).

Na área biomédica a quitosana tem sido utilizada como agente bacteriostático e fungistático, em sistemas de liberação controlada de drogas, em células artificiais, no desenvolvimento de lentes de contato, em membranas para hemodiálise, como peles artificiais e como biomaterial na engenharia de tecidos (Don, 2006; Chae, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Dentre as inúmeras possibilidades de aplicação, este biopolímero tem sido empregado com grande sucesso como suporte para imobilização de uma grande variedade de enzimas (Alsarra, 2002; Altun & Cetinius, 2007; Adriano *et al.*, 2008; Juang *et al.*, 2002)

### **2.5.2. Utilização de quitosana como suporte na imobilização de enzimas**

Enzimas podem ser imobilizadas em quitosana tanto por adsorção, quanto por ligação covalente.

A presença de grupamentos amina (-NH<sub>2</sub>) e hidroxila (-OH) reativa na sua estrutura permite o uso de diferentes agentes de ativação para obtenção de derivados imobilizados através de ligação covalente ou iônica.

Vários métodos de tratamento empregando uma grande diversidade de reagentes têm sido utilizados na modificação química deste suporte. Entretanto, a reticulação com reagentes específicos vem sendo o método de tratamento mais estudado.

Reações de reticulação (entrecruzamento) promovem a união permanente de sítios reativos de cadeias poliméricas diferentes através de ligações intermoleculares ou regiões distintas de uma mesma cadeia por meio de ligações intramoleculares (Lee *et al.*, 2001).

As modificações estruturais da quitosana têm promovido entre outras coisas o aumento do seu caráter hidrofóbico, de sua resistência mecânica, da sua biocompatibilidade e de sua estabilidade química (Li & Bai, 2005; Mendes *et al.*, 2006).

Estas modificações têm sido efetuadas por diferentes reagentes tais como glicidol, epícloridrina, glioxal, formaldeído, e glutaraldeído entre outros, promovendo alterações acentuadas na estrutura e propriedades deste suporte (Altun & Cetinus, 2007; Deng *et al.*, 2009).

A epícloridrina e o glicidol reagem com o grupo hidroxila da quitosana enquanto os aldeídos monofuncionais (formaldeído) e bifuncionais (glioxal e glutaraldeído) reagem preferencialmente com os grupos amino do suporte (Fangkangwanwong *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006).

Enzimas podem ser imobilizadas em quitosana após ativação de um dos grupos funcionais amino ou hidroxila isoladamente ou após ativação simultânea destes dois grupos. Reagentes como o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e alguns compostos aminados como a etilenodiamina (EDA) também podem ser utilizados em combinação com reagentes como o glutaraldeído ou o glicidol na ativação deste suporte (Lafuente *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2012). A Figura 16 apresenta diferentes estratégias de ativação propostas para o suporte quitosana.

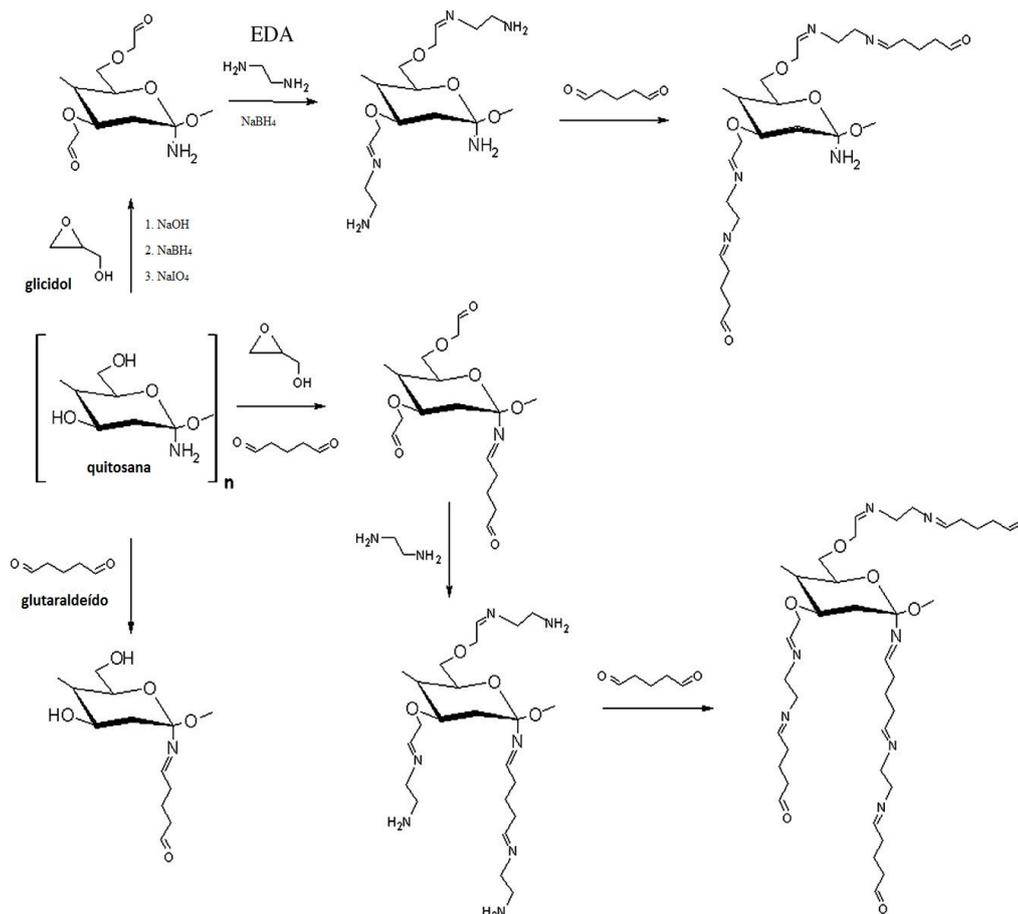


Figura 16. Ativação do suporte quitosana com glutaraldeído, glicidol e EDA e a combinação de todos. (Fonte: Silva *et al.*, 2012).

### 2.5.3. Imobilização de enzimas em suporte quitosana ativado com glutaraldeído

A ativação de suportes com glutaraldeído é uma dos métodos mais utilizados na imobilização de enzimas. Protocolos de ativação utilizando este dialdeído são de fácil execução sendo geralmente efetuados em condições brandas de temperatura e pH (Barros *et al.*, 2003; Betancor *et al.*, 2006).

O glutaraldeído é um reagente extremamente versátil que em condições específicas pode reagir com outra molécula de glutaraldeído ou com diferentes grupos (ex: tióis, imidazóis, etc), mas preferencialmente com grupamentos amino primários de proteínas.

Este composto tem sido amplamente utilizado como agente de reticulação na imobilização de moléculas de proteínas em vários tipos de suportes. Porém, na maioria dos casos, este reagente bifuncional tem sido comumente empregado na imobilização de enzimas em suportes contendo grupamentos amino primários.

O glutaraldeído reage rapidamente com grupos amino ( $-NH_2$ ) em valores de pH neutro e é considerado o mais eficiente em relação a outros aldeídos na obtenção de reticulados térmica e quimicamente estáveis.

Apesar da sua ampla utilização, o seu comportamento em solução aquosa e em diferentes condições de pH e temperatura, bem como a maneira pela qual se liga quimicamente aos suportes e a proteínas tem sido discutida em vários trabalhos (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995; Migneault *et al.*, 2004; Monsan, 1978). A Figura 17 mostra de forma resumida algumas estruturas propostas para este reagente em solução aquosa e em várias condições de pH.

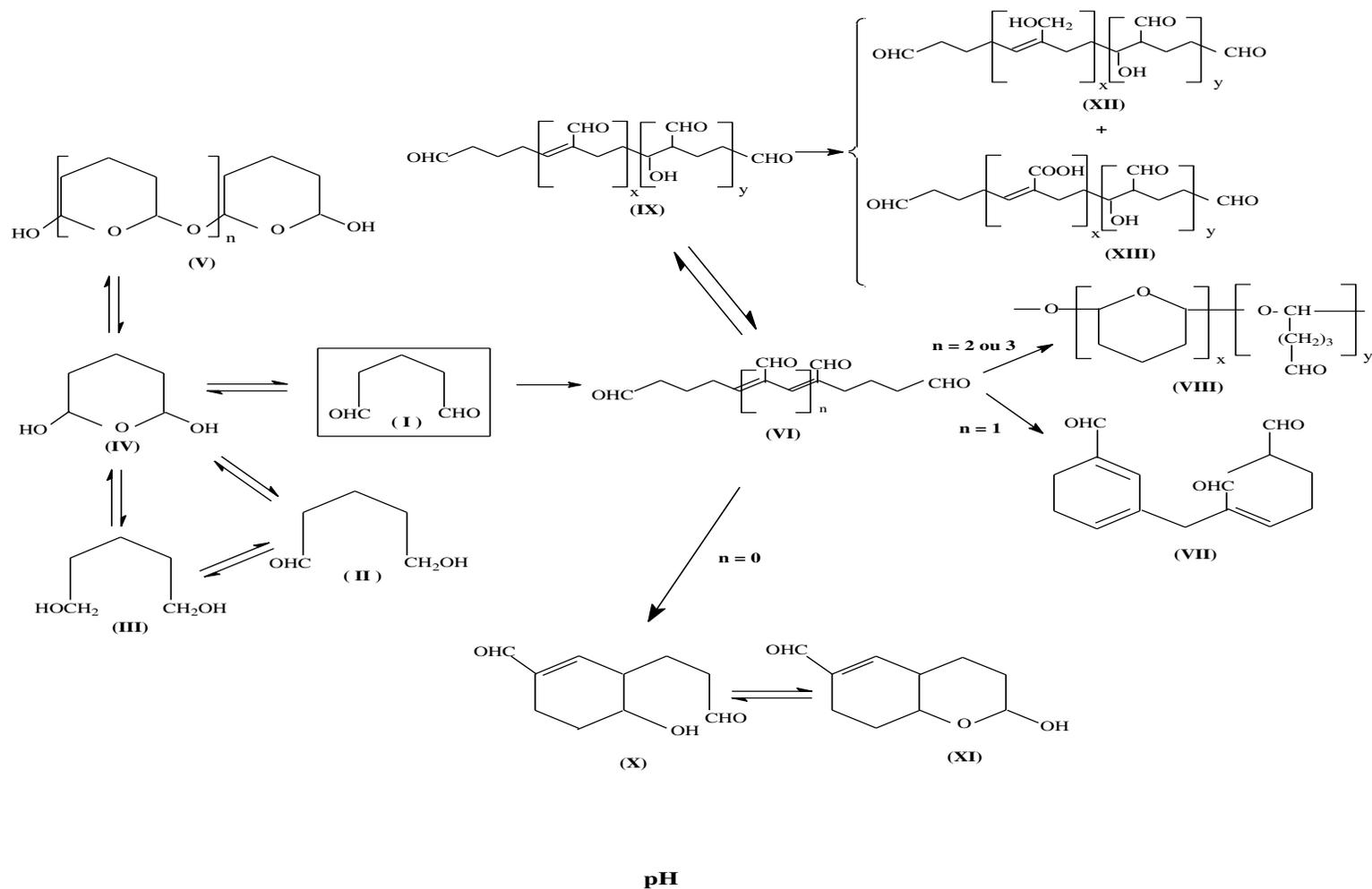
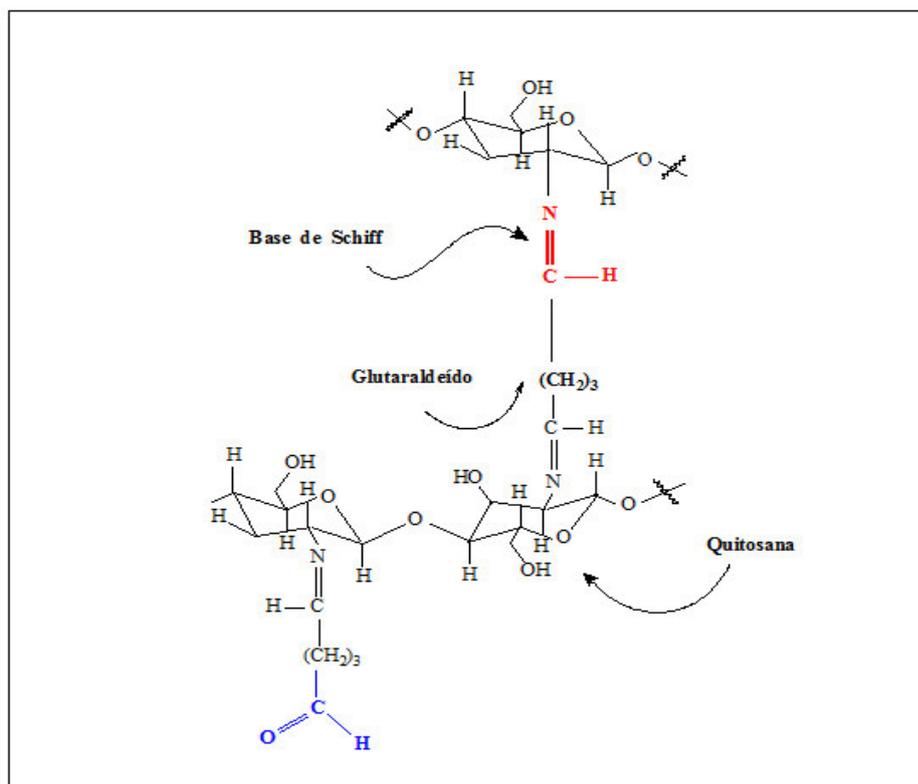


Figura 17. Estruturas do reagente glutaraldeído em função do pH. Estruturas : (I) forma monomérica do glutaraldeído; (II), (III) e (IV) formas reduzidas do glutaraldeído; (V) forma oligomérica da estrutura (IV); (VI) estrutura  $\alpha,\beta$  insaturada; (VII) e (VIII) estruturas derivadas da estrutura (VI) após condensação aldólica; (IX) poliglutaraldeído; (X) e (XI) formas diméricas do glutaraldeído. (Fonte: Migneault et al., 2004, com modificações).

As estruturas apresentadas na Figura 17 evidenciam que o glutaraldeído pode existir na sua forma mais simples (dialdeído monomérico) ou na forma de estruturas mais complexas como dímeros, trímeros e polímeros em função do pH do meio onde se encontra. Desta forma, diferentes mecanismos de interação glutaraldeído-suporte-enzima podem ocorrer influenciando as propriedades finais do biocatalisador produzido.

A ativação do suporte quitosana com glutaraldeído é baseado na formação de uma ligação imina (-C=N) irreversível entre grupamentos amino da quitosana e grupo aldeído do glutaraldeído. O outro grupo aldeído remanescente (reativo) pode ser ligado a grupamentos amino presentes nas cadeias laterais de aminoácidos da enzima pelo mesmo mecanismo.

A Figura 18 ilustra o mecanismo de formação genérico de ligações imina (bases de Schiff) entre o glutaraldeído e o suporte quitosana. Vale aqui enfatizar que outras reações paralelas podem ocorrer entre a quitosana e este reagente (Monteiro & Airoidi, 1999).

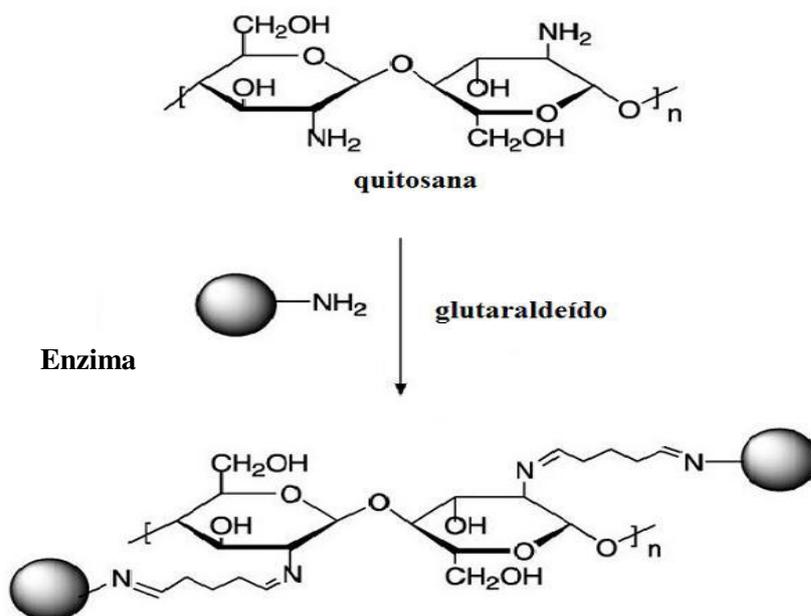


**Figura 18. Ativação do suporte quitosana com glutaraldeído**

O glutaraldeído pode reagir com diversos grupos pertencentes à estrutura das enzimas que se comportam como nucleófilos em determinadas condições.

Porém, estes grupos diferem quanto à reatividade em relação a este reagente na seguinte ordem:  $\epsilon$ -amino >  $\alpha$ -amino > guanidil > amino secundário > hidroxil.

O glutaraldeído se liga reversivelmente a grupos amino em uma grande faixa de pH ( $\geq$  pH 3), porém no intervalo de 7-9 o comportamento reversível da ligação é diminuído acentuadamente. A Figura 19 mostra a ligação entre o suporte quitosana ativado com glutaraldeído e um grupamento amino de uma enzima com formação de uma base de Schiff.



**Figura 19. Formação de base de Schiff entre o suporte quitosana ativado com glutaraldeído e o grupo amino reativo de uma enzima.**

A imobilização de enzimas em suportes ativado com glutaraldeído pode ocorrer de duas maneiras:

- I. formação de uma única ligação entre o grupo aldeído no suporte ativado e o grupo  $\alpha$ -amino terminal da enzima (ligação covalente unipontual) ou
- II. através de múltiplas interações entre os grupos aldeídos do suporte ativado e os grupos  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina presentes na superfície da enzima (ligação covalente multipontual).

Imobilizações covalentes unipontuais são conduzidas geralmente em pH neutro ou próximo da neutralidade uma vez os grupamentos  $\alpha$ -amino terminais das enzimas possuem valores de pKa compreendidos no intervalo de 7-8 (Mateo *et al.*, 2007).

Neste intervalo de pH, o glutaraldeído é bastante estável permitindo um maior controle do processo de imobilização (López-Gallego *et al.*, 2005). Em condições controladas, é possível ativar todos os grupamentos amino do suporte com uma ou no máximo duas moléculas de glutaraldeído por grupo amino (Guisán *et al.*, 1997; Monsan, 1978).

Quando se deseja obter uma maior estabilização da estrutura tridimensional da enzima imobilizada, a imobilização covalente multipontual é sempre considerada a melhor opção.

A maioria das proteínas apresenta em sua estrutura uma quantidade relativamente abundante de resíduos de lisina (Lys) afastada do seu sítio ativo. Estes grupos quando desprotonados são muito reativos atuando como nucleófilos (Guisán *et al.*, 1988).

Os grupamentos  $\epsilon$ -amino dos resíduos de lisina (Lys) apresentam um pKa em torno de 10,5. Desta forma, para que se tenha uma quantidade significativa de grupos amino reativos (desprotonados) disponíveis para a ligação com os grupos aldeídos introduzidos no suporte pelo glutaraldeído, a imobilização deve ser efetuada em pH acima de 10, sendo necessário também longos tempos de incubação (Cowan, 2011; Pedroche *et al.*, 2007).

A imobilização nestas condições promove múltiplas interações entre a enzima e o suporte levando a uma maior estabilização de sua estrutura tridimensional.

Por outro lado, em valores de pH acima de 8 ocorre intensa polimerização do glutaraldeído, o que pode ocasionar uma diminuição da área específica do suporte, devido a ligações estabelecidas entre os grupos reativos da matriz e as terminações das extensas cadeias poliméricas do agente reticulante.

A reticulação excessiva do suporte pode promover uma significativa diminuição no diâmetro dos poros do suporte e desta forma, nesta condição de pH, a imobilização da enzima tende a ocorrer somente na superfície do mesmo. Como consequência, os derivados obtidos nesta condição de imobilização podem apresentar uma diminuição de suas atividades aparentes (Adriano *et al.*, 2008). Além disso, imobilizações em valores

de pH bastante alcalinos empregando este agente de reticulação influenciam consideravelmente a capacidade de carga do suporte.

Uma alternativa proposta no intuito de contornar este inconveniente é a prévia adsorção da enzima no suporte, geralmente por um mecanismo de troca iônica em suportes aminados, seguida de reticulação com glutaraldeído em condições brandas de pH (pH 7).

Nesta estratégia, todos os grupamentos amino primários da enzima e suporte são modificados com apenas uma molécula de glutaraldeído e uma intensa ligação covalente multipontual enzima-suporte pode ser conseguida.

## **2.6. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

### **2.6.1. Técnicas de imobilização de lipases**

No intuito de melhorar ou aperfeiçoar o seu aproveitamento biotecnológico em processos industriais, lipases de diversas fontes tem sido imobilizadas em inúmeros suportes utilizando as várias estratégias comentadas neste trabalho ou mesmo a combinação entre algumas delas.

Em alguns casos, biocatalisadores contendo lipases imobilizadas altamente estabilizadas e reunindo características apropriadas para o seu emprego em processos industriais tem sido desenvolvidos. A Tabela 2 apresenta alguns processos utilizados na imobilização destas enzimas.

Tabela 2 . Técnicas utilizadas na imobilização de lipases

Lipase	Suporte	Método	Aplicação	Referência
<i>C. rugosa</i>	Aerogel de metil-SiO <sub>2</sub>	Adsorção	Avaliação de parâmetros de imobilização	S. Gao <i>et al.</i> , 2009
<i>C. rugosa</i> <i>Lipase de pâncreas de porco</i>	Alginato-Ca <sup>2+</sup>	Encapsulamento	Síntese dos ésteres acetato de isoamila, Acetato de butila e valerato de etila	Ozyilmaz & Gezer, 2010
<i>Burkholderia cepacia</i>	-----	Autoagregação (CLEA)	Transacetilação de citrionelol	Majumder <i>et al.</i> , 2008
<i>Alcaligenes sp.</i>	SiO <sub>2</sub>	Adsorção	Síntese de biodiesel	Park <i>et al.</i> , 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>R. miehei</i>	Polipropileno e poliuretano	Adsorção	Hidólise de gorduras	Adamczak & Bednarski , 2004
<i>Lipase de pâncreas de porco (PPL)</i>	Matriz híbrida PVA-POS <sup>1</sup>	Adsorção	Síntese de surfactantes e biodiesel	Paula <i>et al.</i> , 2007
<i>C. rugosa</i>	Matriz híbrida SiO <sub>2</sub> -Quitosana	Ligação covalente	Avaliação de parâmetros de imobilização	Simões <i>et al.</i> , 2011
<i>Candida antarctica</i> B (CALB)	Reator de membrana (gelatina /PEI/ $\alpha$ -alumina)	Ligação covalente	Síntese de butirato de butila	Lozano <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhizomucor miehei</i> (RmL)	Octyl-agarose Octyl-Sepabeads Butyl-Sepabeads Eupergit C	Adsorção	Resolução enzimática de (R,S)-2-tetralol	Nieto <i>et al.</i> , 2005
<i>Arthrobacter sp</i>	Sílica gel aminada ativada com glutaraldeído	Ligação covalente	Acilação de HMPC <sup>2</sup>	Yang <i>et al.</i> , 2010

Obs : <sup>1</sup>PVA-POS : álcool polivinílico-polisiloxano; <sup>2</sup>HMPC: 4-hidroxi-3-metil-2-(2-propenil)-2-ciclopenteno-1-on

TABELA 2 (CONT.)

<b>Lipase</b>	<b>Suporte</b>	<b>Método</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>C. rugosa</i>	Nanopartículas de quitosana	Adsorção	Avaliação de parâmetros de imobilização	Y. Wu <i>et al.</i> ,2010
<i>P. fluorescens</i> <i>C. rugosa</i> <i>C. antarctica B</i> (CALB)	Quitosana ativada com glutaraldeído	Ligação covalente	Síntese de Oleato de etila	Foresti & Ferreira, 2007
<i>C. rugosa</i> <i>C. antarctica B</i> (CALB)	-Membranas de quitosana -Membranas de quitosana ativadas com glutaraldeído -Membranas de quitosana-ésteres de coroa	-Adsorção  -Ligação covalente	Avaliação de parâmetros de imobilização	Orrego <i>et al.</i> ,2010
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	Peneira molecular 4A tratada com glutaraldeído	Adsorção	Avaliação de parâmetros de imobilização	Raghuvanshi & Gupta, 2010
<i>C. antarctica B</i> (CALB)	Agarose e Quitosana reticuladas com glicidol, epícloridrina e glutaraldeído	Ligação covalente	Avaliação do processo de imobilização	D.S.Rodrigues <i>et al.</i> ,2008
<i>C. antarctica B</i> (CALB)	Carvão ativo	Adsorção	Síntese de butirato de butila	D.S.Rodrigues <i>et al.</i> ,2008
<i>Rhizopus oryzae</i>	Filme <sup>1</sup> PVA-HMPC	Confinamento	Síntese de ésteres de citronelol	Dhake <i>et al.</i> ,2011
<i>C. rugosa</i>	Bentonita	Adsorção	Avaliação de parâmetros de imobilização	Yesiloglu, 2005

O crescente avanço na preparação de biocatalisadores contendo lipases imobilizadas tem permitido a substituição de processos químicos convencionais por processos enzimáticos mesmo que de forma discreta por algumas indústrias de transformação. A Tabela 3 relaciona alguns destes processos.

**Tabela 3. Processos industriais que utilizam lipases imobilizadas (Fonte: Krishna, 2002)**

Companhia	Produtos	Lipase	Processo	Meio
BASF	Aminas e alcoóis quirais (intermediários farmacêuticos, pesticidas)	<i>B.plantarum</i> imobilizada (comercial)	hidrólise	MTBE
*BMS	(3R, 4S)-acetato de azetidina (Taxol)	<i>P.cepacia</i> imobilizada (comercial)	hidrólise	Aquoso
BMS	Hidroximetil coenzima A	<i>P.cepacia</i> imobilizada (comercial)	acetilação	Tolueno
Glaxo Welcome	Lotrafibrin	CAL B imobilizada (comercial)	hidrólise	**n.e
Schering P	SCH 56592	CAL B imobilizada (comercial)	acilação	n.e
Schering P	SCH 66336	<i>P. aeruginosa</i> (comercial)	Acilação	n.e
Sepracor	S-ibuprofen	<i>C. cylindrace</i> imobilizada em membranas (comercial)	hidrólise	Multifásico

\*BMS= Bristol-Myers-Squibb ; \*\* n.e = não especificado

As aplicações apresentadas na Tabela 3 mostram que a totalidade dos bioprocessos é conduzida por enzimas imobilizadas vendidas comercialmente, geralmente a custos elevados, o que efetivamente aumenta também o custo de produção destes compostos.

Desta forma, a imobilização de lipases ainda é um campo aberto para o desenvolvimento de novos biocatalisadores com boas propriedades catalíticas e estabilidade operacional desejáveis utilizando matrizes de baixo custo e empregando técnicas de imobilização de fácil execução.

## **2.6.2. Estratégias para o aumento da atividade catalítica de lipases em protocolos de imobilização**

As lipases em solução possuem duas conformações em equilíbrio dinâmico: uma fechada (inativa) onde o sítio catalítico encontra-se recoberto por uma tampa hidrofóbica e uma aberta (ativa) onde esta tampa é deslocada e o sítio catalítico é completamente exposto ao meio reacional.

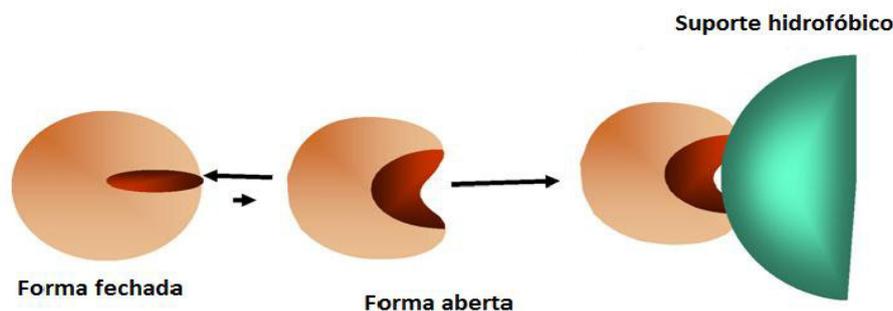
Desta forma, para que se tenha um biocatalisador com alta atividade catalítica estas enzimas devem ser imobilizadas na sua conformação aberta (ativa).

Na presença de uma interface hidrofóbica o equilíbrio conformacional entre as formas aberta e fechada das lipases pode ser deslocado no sentido de sua conformação aberta (ativação interfacial).

Aproveitando esta propriedade, algumas estratégias de imobilização têm sido utilizadas para a imobilização de lipases na sua forma ativa.

### **2.6.2.1. Adsorção em suportes hidrofóbicos**

A maioria das lipases mostra um grande aumento de sua atividade catalítica quando adsorvidas em suportes hidrofóbicos e em condições de baixa força iônica (tampão fosfato 5-25 mmol.L<sup>-1</sup>) pelo fato de reconhecerem a superfície destas matrizes de maneira similar ao seu substrato natural (gotas de óleo). Desta forma, a enzima é imobilizada na sua conformação aberta (ativa) produzindo biocatalisadores com alta atividade (Guisán *et al.*, 1998). A Figura 20 mostra a adsorção de uma lipase na superfície de um suporte hidrofóbico.



**Figura 20. Adsorção de lipases em suportes hidrofóbicos . (Fonte : Mateo et. al, 2007, com modificações).**

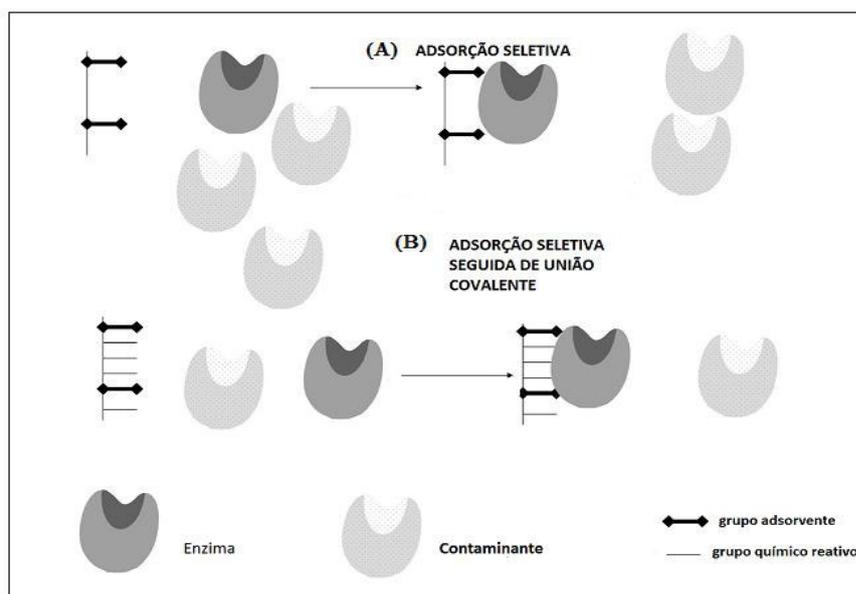
Derivados obtidos de algumas lipases imobilizadas em suportes altamente hidrofóbicos como a octil-agarose e octadecil-Sepabeads além de mostrarem alta atividade, também aumentaram sua capacidade enantiosseletiva em algumas reações quando comparados à enzima na forma solúvel (Batisda *et al.*, 1998; Guisán *et al.*, 2002).

A imobilização em suportes com características hidrofóbicas permite também o isolamento (purificação) destas enzimas em um extrato enzimático aquoso contendo diferentes proteínas contaminantes.

Em um meio com baixa força iônica, proteínas solúveis em água possuem pouca afinidade por suportes hidrofóbicos enquanto as lipases são fortemente adsorvidas na sua forma ativa. Nesta condição, tem-se um processo integrado purificação-imobilização (Bastida *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998).

Apesar destas vantagens, deve-se levar em consideração que as interações hidrofóbicas estabelecidas entre a enzima e o suporte são de fraca intensidade restringindo o campo de aplicação do biocatalisador obtido neste processo em meios de reação não convencionais (ex. solventes orgânicos).

No intuito de contornar esta limitação, alguns trabalhos propõem a utilização da união covalente após adsorção da lipase. A Figura 21 ilustra bem estas duas possibilidades de imobilização de lipases.



**Figura 21. Estratégias para imobilização de lipases (A) adsorção seletiva de lipases em suportes hidrofóbicos e (B) adsorção seletiva seguida de reticulação do suporte com um reagente específico na presença de contaminantes. (Fonte: Garcia-Galan *et al.*, 2011, com modificações).**

A introdução de um grupo reativo que promova a união covalente entre enzima e suporte traz, além dos benefícios já explicitados, o aumento da estabilidade química do biocatalisador ampliando também sua utilização.

#### **2.6.2.2. Imobilização na presença de surfactantes**

A utilização de surfactantes tem permitido a estabilização da conformação aberta e aumento da atividade das lipases na sua forma solúvel e em vários procedimentos de imobilização.

Braco (1995) e Fukunaga (2003) observaram um grande aumento da atividade catalítica de lipases precipitadas na presença de detergentes quando utilizadas em meio orgânico.

Entretanto, a pouca estabilidade dos agregados de enzima formados permitem sua utilização somente em meios orgânicos visto que em soluções aquosas ocorre a solubilização dos mesmos (Garcia Galan *et al.*, 2011)

Quando são utilizados suportes aminados, uma estratégia que vem sendo utilizada com bastante frequência é a imobilização de lípases na presença de baixas concentrações de algumas classes de surfactantes que promovem a estabilização da conformação aberta (ativa) das enzimas (Fernandez-Lorente *et al.*, 2006).

A lipase é incubada no suporte na presença de surfactantes e, após este período de incubação, é feito o entrecruzamento dos grupamentos amino do suporte e da enzima com reagentes bifuncionais como o glutaraldeído com o objetivo de conferir rigidez à estrutura da enzima necessária para evitar alguma distorção do seu sítio catalítico (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007) . A Figura 22 mostra as etapas desta estratégia de imobilização.

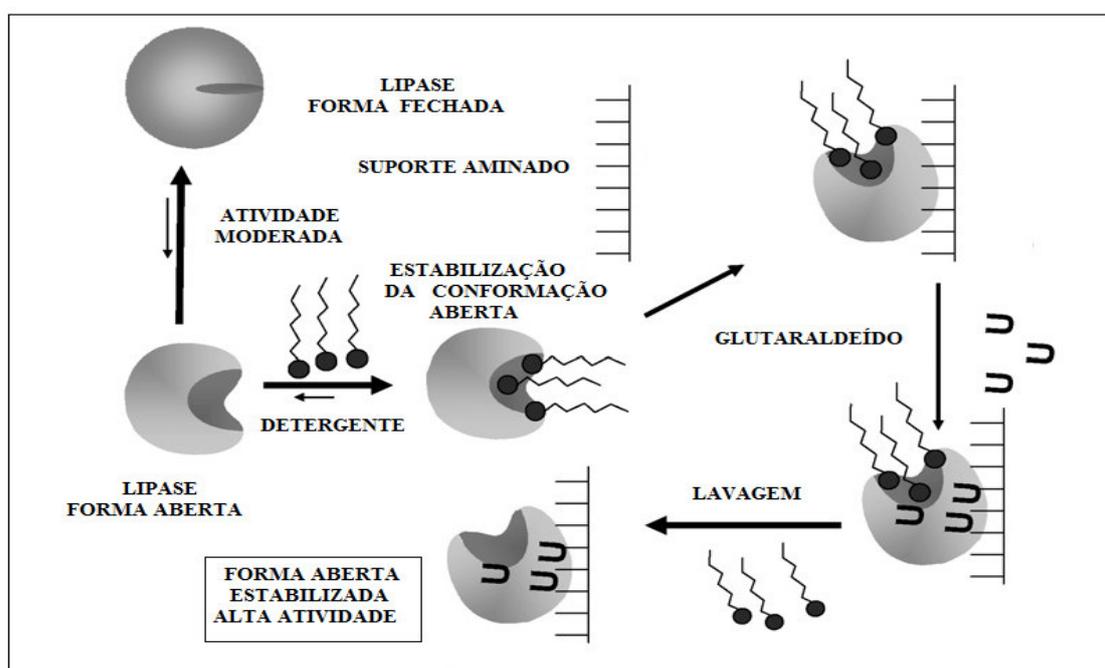


Figura 22. Imobilização de lipases na presença de surfactantes. (Fonte: Mateo *et al.*, 2007, com modificações).

Surfactantes de várias classes como o Triton X-100, o dodecilsulfato de sódio (SDS) e o brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) têm sido empregados na estabilização da estrutura aberta das lipases de diversas origens na sua forma livre ou no desenvolvimento de protocolos de imobilização (Mogensen *et al.*, 2000; Michaux *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2009).

A adição de tensoativos no meio de imobilização pode produzir dois efeitos significativos na atividade catalítica da enzima: (i) a interação do tensoativo com o sítio catalítico da enzima pode ser suficientemente intensa podendo ocasionar uma diminuição da afinidade da enzima pelo substrato (aumento do valor de  $K_m$ ) pelo mecanismo de inibição competitiva e (ii) o deslocamento do equilíbrio para a conformação aberta (ativa) da enzima promove um aumento na velocidade máxima ( $V_{máx.}$ ) da enzima (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007).

Geralmente, concentrações de surfactantes acima de suas concentrações micelares críticas (cmc) podem promover distorções no sítio ativo da enzima

diminuindo a sua atividade catalítica ou mesmo inativando-a (Fernandez-Lorente *et. al*, 2006)

Alguns trabalhos comprovam que a estabilização da conformação aberta (ativa) das lipases em processos de imobilização na presença de surfactantes é influenciada não só pela natureza e concentração do tensoativo utilizado, mas também pelo tipo de suporte, estratégia de imobilização adotada e a origem da enzima utilizada (Filice *et. al*, 2011).

## **2.7. SÍNTESE DE ÉSTERES**

### **2.7.1. Ésteres: definição e aplicações**

Os ésteres são considerados atualmente uma das mais importantes classes de compostos orgânicos. Em virtude de suas grandes variações em termos de composição e propriedades, estes compostos têm encontrado variadas aplicações em diversos segmentos da indústria.

Estes compostos são utilizados como monômeros na produção de plásticos e resinas e como solventes em reações orgânicas (Costa, 2003).

Alguns ésteres do álcool isopropílico têm sido empregados como bio solventes (solventes verdes) em diversas sínteses orgânicas (Bouaid *et al.*, 2007)

Ésteres de açúcares são utilizados como surfactantes não iônicos biodegradáveis e com propriedades antimicrobianas que os tornam atrativos na indústria de cosméticos, farmacêuticas e de alimentos (Coulon *et al.*, 1998; Gumel *et al.*, 2011).

Ésteres de glicidol (glicidol quiral) são importantes “blocos de construção” na síntese de vários fármacos enantiopuros, incluindo beta-bloqueadores e substâncias antivirais (Lozano *et al.*, 2004)

Ésteres do ácido mirístico e do ácido palmítico têm sido utilizados na formulação de produtos de higiene pessoal como emolientes em cremes para a pele e óleos de banho (Hasan *et al.*, 2002)

Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos, lauratos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel (Tan *et al.*, 2010)

Oleato de etila é utilizado como aditivo biológico, plastificante do policloreto de vinila (PVC), agente resistente à água e como fluido hidráulico (Hazarika *et al.*, 2002).

## 2.7.2. Ésteres componentes de aromas

Ésteres utilizados como flavorizantes e aromatizantes são geralmente compostos de cadeia curta (C2-C8) obtidos principalmente a partir de reações de esterificação entre um ácido e um álcool com eliminação de água (Güvenç *et al.*, 2002; Majumder *et al.*, 2006; Salah *et al.*, 2007).

Acetatos de etila, butila, amila e isoamila são frequentemente utilizados como componentes de flavorizantes enquanto acetatos de isopropila, benzila e metila são importantes aditivos utilizados na formulação de perfumes (Radzi, *et al.*, 2011). A Tabela 4 apresenta alguns dos principais ésteres que são utilizados como flavorizantes e aromatizantes em várias indústrias.

**Tabela 4. Flavorizantes e aromatizantes utilizados na indústria**

<b>Fórmula estrutural</b>	<b>Nome</b>	<b>Aroma</b>
$\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$	Acetato de isoamila	banana
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-COO-CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Propanoato de isobutila	rum
$\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$	Acetato de benzila	pessego, rum
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COO-CH}_3$	Butirato de metila	morango
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COO-CH}_2\text{CH}_3$	Butirato de etila	abacaxi
$\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-(CH}_2)_6\text{CH}_3$	Acetato de n-octila	laranja
$\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{CH}_3$	Acetato de butila	abacaxi
$\text{CH}_3\text{-COO-(CH}_2)_4\text{CH}_3$	Acetato de pentila	<u>pera</u>
$\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{CH}_3$	Acetato de etila	menta
$\text{CH}_3\text{-COO-(CH}_2)_3\text{CH}_3$	Acetato de butila	<u>morango</u>

Fonte: SAFC Flavor & Fragrances Catalog 2007-2008.

Estes compostos podem ser obtidos através da extração direta de fontes naturais, por síntese química ou por processos biotecnológicos como fermentação ou síntese enzimática (Franco, 2004).

A extração direta de fontes naturais é limitada em função da baixa concentração dos materiais desejados nas matérias-primas, sendo necessários processos de extração e purificação mais rigorosos, o que torna este processo bastante oneroso. Além disso, a

produção de matéria-prima em grande quantidade é dependente de fatores climáticos nem sempre favoráveis e sazonalidade que são condições de difícil controle (Longo & Sároman, 2006).

A obtenção de ésteres por via química ainda é o processo mais utilizado e o de menor custo quando comparado aos demais processos.

Neste processo, as reações químicas são geralmente conduzidas na presença de catalisadores inorgânicos como ácidos fortes (ex: ácido sulfúrico ou ácido clorídrico anidro), bases fortes ou compostos à base de metais (ex. oxalato de estanho) que atuam como ácidos de Lewis (Battistel *et al.*, 2011; Hills, 2003).

Devido a sua viabilidade econômica, o processo químico mais utilizado para a obtenção industrial de ésteres baseia-se na esterificação de Fischer, que é uma reação de substituição nucleofílica do grupamento acila catalisada por ácido mineral (ex.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), entre um ácido carboxílico e um álcool. O ácido protona o átomo de oxigênio do grupo carbonila, tornando o ácido carboxílico muito mais reativo ao ataque nucleofílico do álcool. A posterior eliminação de água do intermediário tetraédrico formado leva a formação do éster. A Figura 23 mostra o processo de obtenção de ésteres pelo método de Fischer.

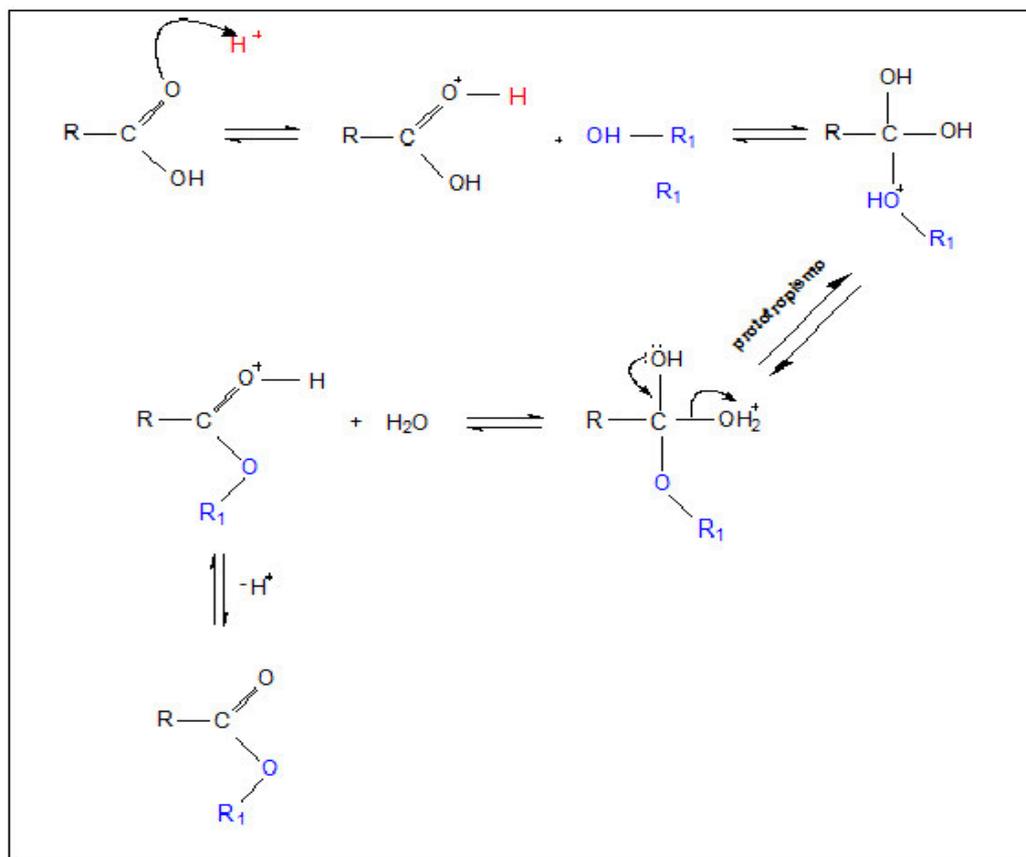


Figura 23. Mecanismo da catálise ácida de ésteres

Estas reações são caracterizadas por apresentarem, em alguns casos, baixas taxas de conversão, são consideradas não seletivas e agressivas ao ambiente e geralmente ocorrem com formação de produtos secundários, requerendo extensivas etapas de purificação e concentração para a obtenção dos produtos desejados (Bicas *et al.*, 2010; Radzi, 2001). Além destes inconvenientes, o ácido mineral utilizado como catalisador pode promover a desidratação do substrato alcoólico, diminuindo o rendimento da reação.

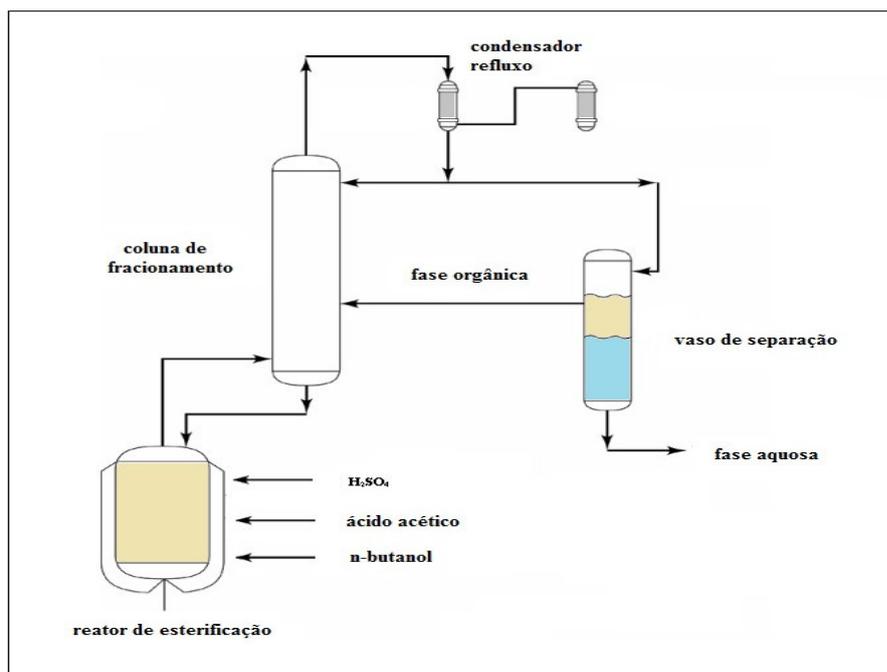
Altas taxas de conversão só são conseguidas quando um grande excesso de um dos reagentes (geralmente álcool) é utilizado ou quando um dos produtos da reação é removido do meio reacional.

Na síntese de ésteres por via química, a eliminação de água formada durante o processo é considerada um ponto crítico, pois devido ao equilíbrio, interrompe a reação em um ponto de baixo rendimento de éster (Liu *et al.*, 2006).

Uma das maneiras de se contornar este problema consiste na adição de agentes secantes como cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ou sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) no sistema de reação para a remoção da água formada ou a utilização de um solvente auxiliar que solubilize os reagentes e produtos da reação exceto a água, desta forma, favorecendo o deslocamento máximo de equilíbrio no sentido da formação do éster (Medeiros, 2008).

Além das desvantagens mencionadas, os processos químicos de obtenção de ésteres utilizam reagentes que podem causar corrosão nos equipamentos e em muitos casos temperaturas acima de  $160^\circ\text{C}$  que favorecem o escurecimento do sistema reacional e a formação de odores que implicam em tratamentos adicionais como branqueamento, desodorização e neutralização para que o produto final apresente características adequadas para comercialização (Kiss *et al.*, 2004).

As técnicas de pós-tratamento são selecionadas em função das propriedades finais do meio reacional (ex. solubilidade em água) e da volatilidade do éster obtido. Geralmente são baseadas em processos de decantação, destilação e retificação ou em alguns casos, a combinação destes três processos. A Figura 24 mostra o processo industrial por bateladas para a obtenção do acetato de butila, um éster de média volatilidade bastante utilizado como flavorizante na indústria de alimentos e cosméticos.



**Figura 24 . Obtenção industrial do acetato de butila por processo tipo batelada (Fonte: Barcza, com modificações).**

O esquema apresentado na Figura 24 mostra também que a utilização da via química para a obtenção de ésteres em larga escala é também acompanhada pelo grande consumo de energia em função das várias etapas de isolamento do produto final.

Os ésteres obtidos por processo químicos são classificados como “artificiais” ou “aromas sintéticos idênticos aos naturais” e seu valor econômico tem diminuído consideravelmente nas últimas décadas devido a grande exigência do mercado consumidor por substâncias de origem natural (Bicas *et al.*, 2010).

A utilização de processos biotecnológicos, especialmente a catálise enzimática mediada por lipases tem sido apontada como um grande salto tecnológico na obtenção destes compostos (Hasan *et al.*, 2002).

Devido às características já explicitadas neste trabalho, estas enzimas reúnem propriedades desejáveis para sua utilização na síntese destes compostos.

A alta seletividade e especificidade destas enzimas permite a obtenção de produtos com elevada pureza sem geração de sub-produtos ou resíduos tóxicos, não sendo necessárias, portanto, na maioria dos casos, etapas subsequentes de purificação, diminuindo os custos de produção (Aravindan *et al.*, 2007).

Em adição a estes fatores, ésteres obtidos em processos de biotransformação como a catálise enzimática são considerados “naturais” ou “naturalmente produzidos”, apresentando maior valor de mercado (Bicas *et al.*, 2010; Demyttenaere, 2001).

Reações de esterificação catalisadas por lipases podem ser conduzidas em baixas temperaturas na presença de solventes orgânicos, em meios livres de cosolventes ou outros sistemas como fluidos supercríticos e líquidos iônicos.

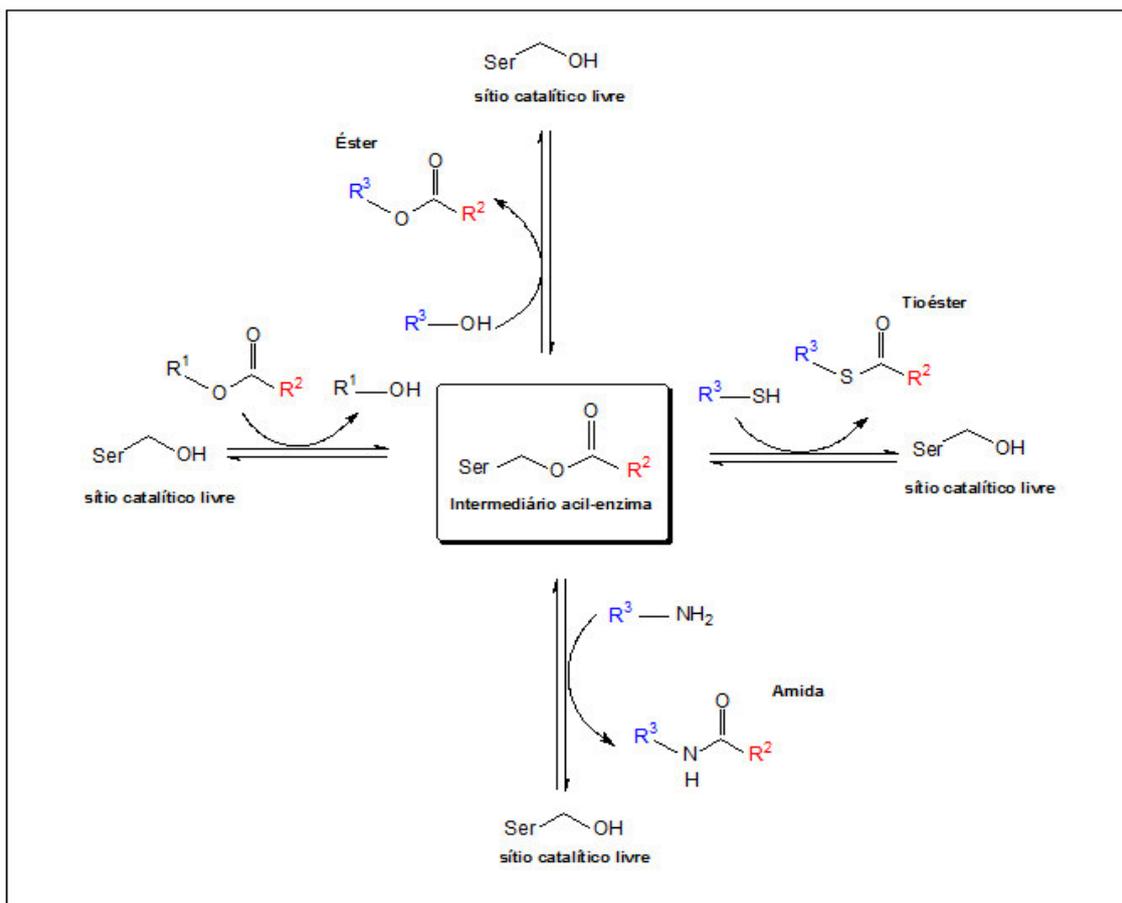
## **2.8. BIOCATALÍSE EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS UTILIZANDO LIPASES**

A idéia pré-concebida de que enzimas como as lipases sofreriam desnaturação em meios diferentes do seu ambiente natural (aquoso) restringiu durante algum tempo a utilização destas enzimas em síntese orgânica, tendo em vista que grande parte dos compostos utilizados como reagentes e os produtos destas reações é insolúvel e instável em meio aquoso.

Nas últimas décadas, entretanto, vários trabalhos reportados na literatura demonstraram que estas enzimas podem reter sua integridade estrutural e sua atividade catalítica na presença de pequenas quantidades de água no meio reacional.

Desta forma, reações consideradas importantes do ponto de vista industrial como esterificação, transesterificação e tiotransesterificação, que em meio aquoso seriam inviáveis, passaram a ser efetuadas na presença destas enzimas em meios aquo-restritos, onde são termodinamicamente favorecidas.

Em meios não-aquosos, um álcool, um tiol ou uma amina podem ser utilizados como nucleófilos (aceptores acila) e os produtos finais de reação serão respectivamente um novo éster, um tioéster ou uma amida. O esquema simplificado para estas reações está ilustrado na Figura 25.



**Figura 25. Produtos de reação obtidos em catálises mediadas por lipases em meios não-aquosos em função dos aceptores acila. (Fonte: Hedfors, 2009, com modificações).**

Em biocatálise, o termo meio não-aquoso, aquo-restrito ou não-convencional é utilizado para designar sistemas em que a água é substituída por solventes ou sistemas onde aditivos são adicionados à água no intuito de favorecer algumas propriedades específicas do biocatalisador ou a reação catalisadas por ele (Krieger *et al.*, 2004).

Os meios aquo-restritos para biocatálise incluem os solventes orgânicos, fluidos supercríticos, sistemas em que solventes orgânicos não são utilizados (fases sólidas, líquidas e gasosas), ou líquidos iônicos (Aires-Barros, 2002).

Os sistemas não convencionais utilizados em biocatálise podem ser classificados como macro heterogêneos e micro heterogêneos. Nos sistemas macro heterogêneos onde a separação de fases é visível, são utilizadas enzimas imobilizadas ou enzimas sólidas (liofilizadas) suspensas em solventes orgânicos. Já nos sistemas micro heterogêneos como aqueles que empregam micelas reversas, a separação de fases só consegue ser visualizada com o auxílio da microscopia (Krieger *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2004).

Geralmente, por conta de sua simplicidade e disponibilidade de reagentes, a maioria das reações de esterificação catalisadas por lipases tem sido conduzida em solventes orgânicos. A utilização de fluidos supercríticos e líquidos iônicos em reações de esterificação são processos que apesar de serem utilizados, ainda estão limitados pelo custo e execução.

Mais recentemente, a síntese de ésteres em meios livres de co-solventes (o meio reacional contém apenas os substratos e o biocatalisador) tem sido proposta como uma alternativa a utilização de solventes orgânicos, tendo em vista que neste sistema, ao término da reação, a etapa de remoção do solvente seria eliminada, minimizando a geração de resíduos e barateando os custos de produção (Foresti *et al.*, 2005; Plazl, 2009).

## **2.9. Utilização de lipases em solventes orgânicos**

A utilização de solventes orgânicos em reações de esterificação mediadas por lipases apresentam as seguintes vantagens (Baron *et al.*, 2005; Krieger *et al.*, 2004):

- ◇ redução da inibição devido a substratos e produtos;
- ◇ facilidade de recuperação de produtos e biocatalisador;
- ◇ aumento da termoestabilidade do biocatalisador;
- ◇ aumento da estereoespecificidade na resolução de misturas racêmicas;
- ◇ variação na especificidade de algumas enzimas por seus substratos;
- ◇ aumento da solubilidade de substratos hidrofóbicos;
- ◇ o deslocamento do equilíbrio termodinâmico a favor das reações de síntese;
- ◇ a eliminação da possibilidade de reações secundárias causadas pela água e a proteção contra contaminação microbiana;
- ◇ inibição da ação de enzimas proteolíticas que atuam em meio aquoso.

Apesar das vantagens acima citadas, o desenvolvimento de um processo em que se deseje obter uma elevada eficiência catalítica empregando lipases neste tipo de sistema é influenciado por diversos fatores como temperatura, solvente utilizado, concentração dos substratos, relação molar álcool/ácido, quantidade de biocatalisador, agitação, entre outros.

*Capítulo 3 - PARTE*  
*EXPERIMENTAL*

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Etapas do trabalho

No intuito de se obter biocatalisadores apropriados para aplicação na síntese de alguns ésteres de interesse comercial, uma série de derivados foram sintetizados utilizando lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas no suporte quitosana e os biocatalisadores obtidos foram caracterizados de acordo com alguns critérios usualmente adotados na avaliação das propriedades catalíticas de derivados imobilizados. O fluxograma da Figura 26 mostra os procedimentos adotados na obtenção, caracterização e seleção do biocatalisador.

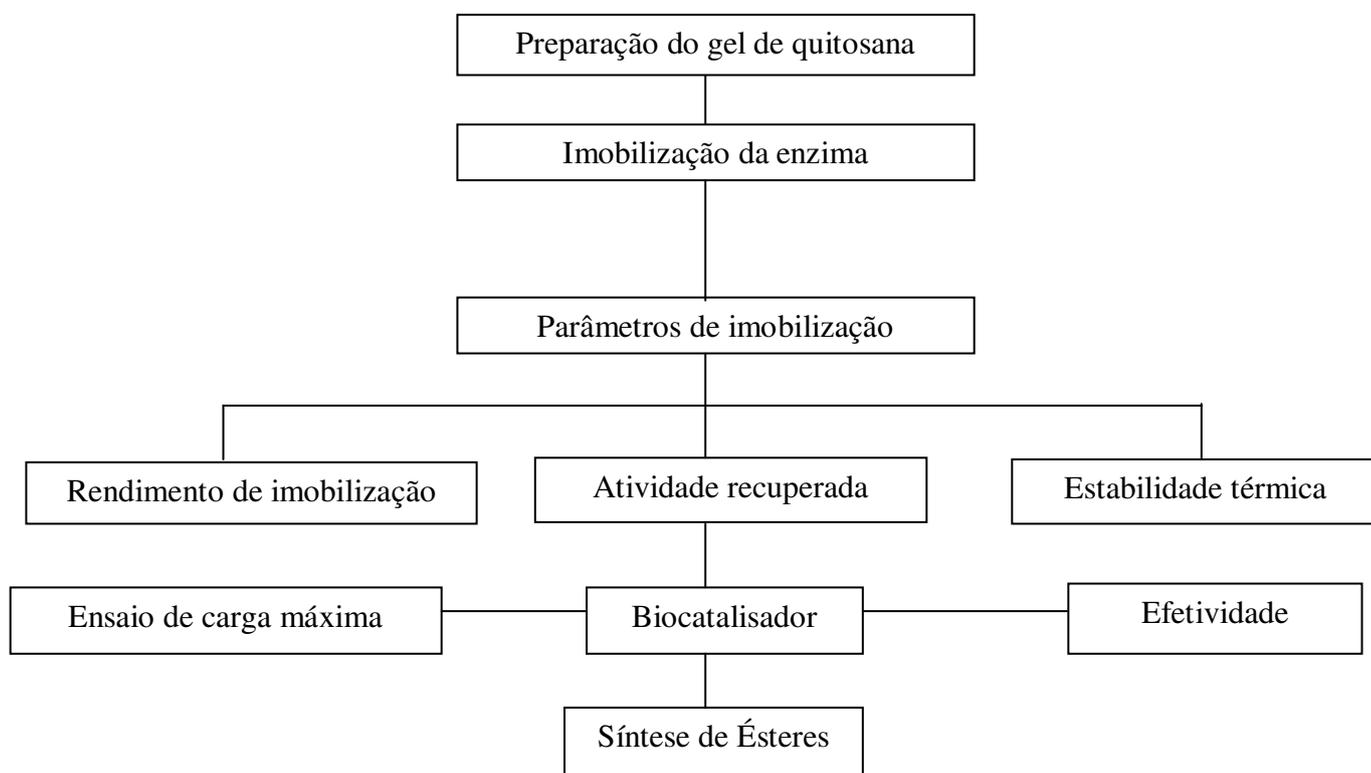


Figura 26. Fluxograma das etapas de obtenção, caracterização e seleção do suporte de quitosana

## 3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1. Materiais

#### 3.2.1.1. Enzimas

Lipase de *Rhizomuchor miehei* (128 U.mL<sup>-1</sup> de atividade enzimática; 4,134 mg.mL<sup>-1</sup> de acordo com Bradford, 1976) e Lypozyme® obtida de *mucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica (atividade > 30 U.g<sup>-1</sup>) foram adquiridas junto a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

#### 3.2.1.2. Suporte

Quitosana em pó com grau mínimo de desacetilação de 85% foi adquirida junto a Polymar Ind. Ltda (Fortaleza-Ce).

#### 3.2.1.3. Reagentes

Para a determinação da atividade hidrolítica da enzima solúvel e enzima imobilizada foi utilizado o butirato de p-nitrofenila (pNPB) adquirido junto a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Para a imobilização da lipase foram utilizados os surfactantes Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) adquiridos junto a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Glutaraldeído 25 % (v.v<sup>-1</sup>) fornecido pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) foi utilizado como agente de ativação do suporte quitosana.

Álcool isopropílico UV/HPLC foi fornecido pela VETEC. Demais reagentes foram de grau analítico e fornecidos por diversos fabricantes.

## 3.3. Métodos

### 3.3.1. Preparação do suporte quitosana 2,5% m.v<sup>-1</sup>

Quitosana em pó (grau de desacetilação 85%) foi dissolvida em solução de ácido acético 5 % (v.v<sup>-1</sup>). Após completa dissolução, a solução resultante foi adicionada lentamente a uma de solução de NaOH 100 mmol.L<sup>-1</sup> (proporção quitosana/NaOH = 1:10) mantida sob agitação lenta e constante. Em seguida, o sistema foi deixado em repouso por 24h à temperatura ambiente. O gel obtido após este tempo foi lavado

exaustivamente com água destilada até a neutralidade sendo, em seguida, secado por filtração a vácuo.

### 3.3.2. Reticulação dos suportes com glutaraldeído

O gel de quitosana foi reticulado em solução tampão fosfato de sódio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7 contendo glutaraldeído  $0,6 \text{ \% v.v}^{-1}$  (razão  $V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$  de 1/10) por 1h a  $25^\circ\text{C}$  sob lenta agitação. Após reticulação, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada para remoção do excesso de glutaraldeído e, em seguida, foi secado por filtração a vácuo.

### 3.3.3. Imobilização de lipases de *Rhizomucor miehei* na presença de surfactantes

Nesta etapa do projeto, duas estratégias de imobilização foram utilizadas:

**Estratégia 1:** reticulação do suporte com glutaraldeído  $0,6 \text{ \% (v.v}^{-1})$  seguida de imobilização das enzimas na presença dos surfactantes Triton X-100 e SDS adicionados em várias concentrações em tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7. O fluxograma da Figura 27 mostra as etapas da metodologia utilizada.

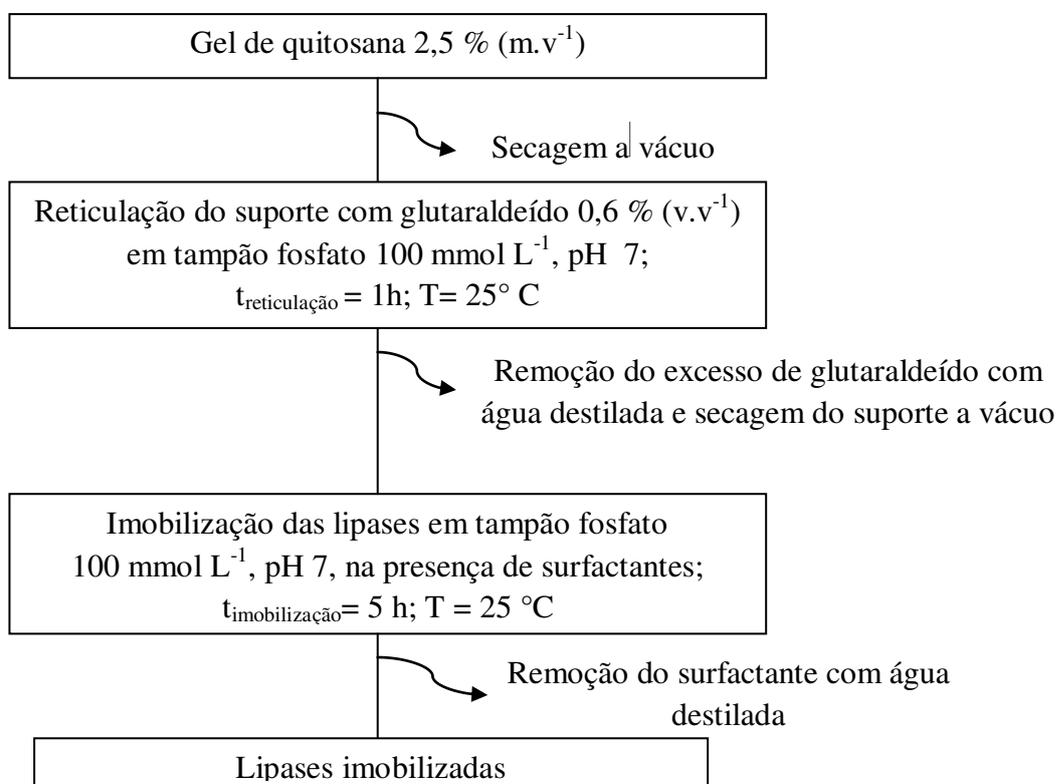
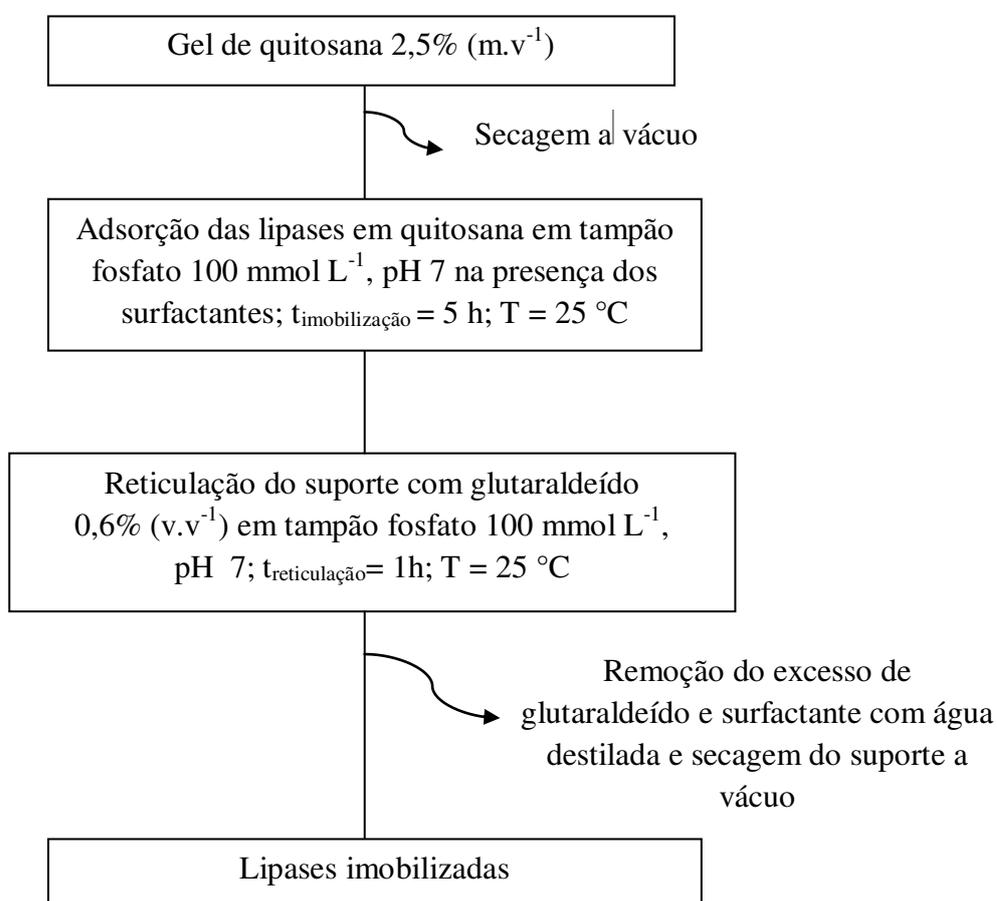


Figura 27. Fluxograma das etapas de imobilização de lipases em quitosana  $2,5\% \text{ (m.v}^{-1})$  reticulada com glutaraldeído  $0,6\% \text{ (v.v}^{-1})$  na presença dos surfactantes Triton X-100 e SDS.

Antes da adição do gel ( $t=0$ ) e após o término da imobilização ( $t= 5h$ ), alíquotas do meio reacional foram retiradas para a determinação do rendimento de imobilização. A carga oferecida em todos os experimentos foi de  $16 \text{ U.g}^{-1}$ . Após imobilização os derivados obtidos foram submetidos a ensaios de atividade hidrolítica de acordo com a metodologia proposta neste trabalho.

**Estratégia 2:** adsorção física das lipases no suporte quitosana na presença dos surfactantes Triton X-100 e SDS em tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7, seguida de reticulação com glutaraldeído  $0,6 \%$  ( $\text{v.v}^{-1}$ ) de acordo com o procedimento descrito no item anterior. O fluxograma apresentado na Figura 28 detalha as etapas envolvidas nesta estratégia.



**Figura 28.** Fluxograma das etapas de adsorção de lipases em gel de quitosana na presença dos surfactantes Triton X-100 e SDS seguida de reticulação do suporte com glutaraldeído  $0,6 \%$  ( $\text{v.v}^{-1}$ ).

Antes da adição do gel ( $t=0$ ) e após o término da imobilização ( $t= 5h$ ), alíquotas do meio reacional foram retiradas para a determinação do rendimento de imobilização.

Os derivados obtidos após imobilização foram submetidos a ensaios de atividade hidrolítica. A carga oferecida em todos os experimentos foi de 16 U.g<sup>-1</sup>.

### 3.4. Determinação da atividade hidrolítica das lipases

A atividade hidrolítica da lipase solúvel e imobilizada foi quantificada através da hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB) 0,5 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7, sendo o produto da reação o p-nitrofenol (pNP) monitorado espectrofotometricamente utilizando um comprimento de onda de 400 nm em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1cm (adaptado de Mogensen *et al.*, 2005). A reação de hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB) é mostrada na Figura 29.

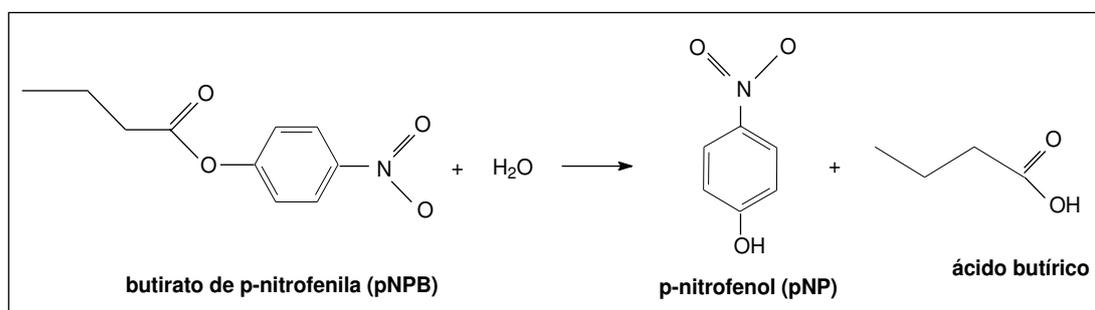


Figura 29. Reação de hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB)

#### 3.4.1. Atividade da enzima solúvel (livre)

Para a determinação da atividade enzimática da enzima solúvel foi previamente obtida uma taxa de consumo (hidrólise) do pNPB a partir da construção de uma curva de calibração com diferentes concentrações de pNP. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de pNPB por minuto em pH 7 à 25 °C. A determinação da atividade da enzima solúvel (livre) e das alíquotas do sobrenadante antes e após o processo de imobilização da enzima no suporte foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$A_t = \frac{\alpha \cdot f_c \cdot V_r \cdot D}{V_{enzima}} \quad (1)$$

Em que:

$A_t$  = Atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>)

$\alpha$  = (coeficiente angular da curva Abs x t (min) para a solução da enzima – coeficiente angular da curva Abs x t (min) para o branco) (abs.min<sup>-1</sup>)

$f_c$  = fator da curva de calibração do pNP ( $f_c = 0.092281$ )

$V_r$  = volume de reação (mL)

D= diluição da amostra

$V_{enzima}$  = volume da solução de enzima (mL)

### 3.4.2. Atividade hidrolítica dos derivados ( $At_{derivado}$ )

Nestas determinações, a reação foi conduzida em reator de 30 mL à temperatura ambiente sob contínua agitação, sendo a mesma iniciada com a adição de uma massa pré-estabelecida do biocatalisador. A hidrólise do pNPB é monitorada retirando-se alíquotas de 2 mL do meio reacional em diferentes tempos de reação lendo-se a absorbância da solução no espectrofotômetro nas condições citadas anteriormente. O tempo de monitoramento da reação estabelecido para esta determinação foi de 12 minutos. A atividade hidrolítica do derivado foi dada em unidades por grama de biocatalisador ( $U_{pNPB} \cdot g_{gel}^{-1}$ ).

$$At_{derivado} = \frac{\alpha \cdot f_c \cdot V_r}{m_{derivado}} \quad (2)$$

onde:

$At_{derivado}$  (ou Atividade aparente) é a atividade enzimática do derivado ( $U_{pNPB} \cdot g_{gel}^{-1}$ );  $\alpha$  (coeficiente angular da curva A x t (min) para o derivado – coeficiente angular da curva A x t (min) para o branco);  $f_c$  é o fator da curva de calibração do p-nitrofenol (pNP),  $V_r$  é o volume de reação (mL) e  $m_{derivado}$  é a massa de derivado utilizada (g).

### 3.5. Determinação da atividade recuperada ( $At_{rec.}$ ) e do rendimento de imobilização ( $\%R_I$ )

O rendimento de imobilização  $R_I(\%)$ , foi calculado medindo-se a diferença entre a atividade hidrolítica do sobrenadante (enzima solúvel) antes ( $At_0$ ) e após ( $At_f$ ) imobilização, de acordo com a eq (3):

$$R_I(\%) = \frac{At_0 - At_f}{At_0} * 100 \quad (3)$$

Neste trabalho, a atividade recuperada ( $A_R$ ) foi definida como sendo a razão entre atividade hidrolítica aparente (ou atividade do derivado) , obtida pela medida direta da atividade hidrolítica do derivado ( $At_d$ ) e a atividade teórica do derivado.

$$At_{rec.} = \frac{At_{derivado}}{At_{teórica}} * 100 \quad (4)$$

sendo:

$At_{derivado}$ : a atividade hidrolítica no derivado ( $U_{pNPB} \cdot g_{gel}^{-1}$ )

$At_{teórica}$ : atividade teórica do derivado ( $U_{pNPB} \cdot g_{gel}^{-1}$ )

A atividade teórica ( $At_{teórica}$  do derivado foi definida como sendo o produto da carga enzimática oferecida ou atividade oferecida ( $At_{oferecida}$ ) em  $U_{pNPB} \cdot g_{suporte}^{-1}$  pelo rendimento de imobilização ( $R_I$ )

$$At_{teórica} = At_{oferecida} * R_I \quad (5)$$

### 3.6. Determinação da estabilidade térmica, do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e fator de estabilidade (FE)

Ensaio de inativação térmica da enzima solúvel e imobilizada foram conduzidos incubando-se a lipase solúvel e os suportes em tampão fosfato 25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7 à 60 °C. Amostras das soluções e suspensões enzimáticas foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos sendo as atividades residuais medidas a temperatura ambiente de acordo com o método de determinação da atividade enzimática descrito anteriormente.

O tempo de meia-vida da enzima livre e derivados foi calculado utilizando o modelo de dois parâmetros de Sadana e Henley (Sadana & Henley, 1987) ajustado para os resultados experimentais de inativação térmica segundo a equação :

$$a_R = (1-\alpha) * \exp^{-kt} + \alpha \quad (6)$$

onde:

$a_R$  = atividade relativa (adimensional);

$\alpha$  = relação entre atividade específica no estado final A e no estado inicial  $A_1$ ;

$k$  = constante de desativação de primeira ordem ( $\text{tempo}^{-1}$ )

$k$  descreve o processo de desdobramento ou inativação enzimática e  $\alpha$  a estabilização da atividade

O fator de estabilidade foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ derivado}}{t_{1/2} \text{ enzima livre}} \quad (7)$$

### 3.7. Avaliação de efeitos difusionais externos e internos no biocatalisador selecionado

A presença de resistência de transferência de massa externa foi estudada variando-se a velocidade de agitação no intervalo de 200-800 rpm do sistema reacional mantendo-se todas as demais condições constantes. A carga enzimática nestes experimentos foi de  $8 \text{ U.g}^{-1}$  para assegurar que a reação de hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB) em estudo ocorresse na ausência de limitações difusionais internas.

A avaliação da presença de efeitos difusionais internos foi efetuada variando-se as cargas enzimáticas oferecidas medindo-se as atividades dos derivados ( $At_{\text{derivado}}$  ou aparente  $-At_{\text{ap}}$ ) para cada carga adicionada.

Em seguida, um gráfico de efetividade ( $\eta$ ) x carga oferecida ( $\text{U.g}^{-1}$ ) foi plotado. O fator de efetividade ( $\eta$ ) foi calculado pela seguinte expressão:

$$\eta = \frac{\text{Atividade Aparente}}{\text{Atividade teórica}} \quad (8)$$

### 3.8. Microscopia de varredura eletrônica (MEV)

O objetivo deste ensaio foi verificar as mudanças estruturais causadas pelo agente de ativação (glutaraldeído) na superfície do suporte quitosana. Neste contexto, análises do suporte utilizado neste trabalho antes e após reticulação com glutaraldeído foram efetuadas por microscopia de varredura eletrônica (MEV). Estas análises foram efetuadas em microscópio eletrônico TESCAN SEM (Modelo VEGA/XMU, Brno,

Czech Republic) utilizando tensão de aceleração de 30Kv. Todas as amostras analisadas foram previamente recobertas com uma camada de ouro (~ 15nm).

### **3.9. Análise dos ésteres por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros vibracionais na região do Infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro FTLA 2000-102, ABB-BOMEM, na região de 4000 a 250  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras (filme líquido) foram depositadas sobre cristais de seleneto de zinco. Para a análise foram efetuados 15 scans.

### **3.10. Síntese de ésteres**

As reações de esterificação foram efetuadas em erlenmeyers de 125 mL fechados com rolha esmerilhada. Os reagentes utilizados nestes experimentos foram adicionados ao solvente selecionado nos experimentos preliminares e a mistura reacional ( $V = 20 \text{ mL}$ ) contendo o biocatalisador foi incubada sob agitação constante em um shaker tipo orbital (Tecnal TE-420, Piracicaba, Brasil).

Neste trabalho, alguns fatores que influenciam os rendimentos em reações de esterificação foram avaliados:

- (i) Seleção do solvente adequado;
- (ii) Influência da temperatura;
- (iii) Influência da concentração dos substratos;
- (iv) Influência da razão molar álcool/ácido ( $[\text{álcool}]/[\text{ácido}]$ );
- (v) Influência da carga enzimática adicionada ao meio reacional;
- (vi) Influência da massa de biocatalisador;
- (vii) Influência da agitação;
- (viii) Influência da quantidade de água;
- (ix) Influência da presença de agente dessecante;
- (x) Estabilidade operacional do biocatalisador.

### 3.10.1. Seleção do solvente

No intuito de selecionar o meio reacional mais adequado para a síntese dos ésteres estudados, solventes de diferentes polaridades e estruturas foram utilizados nos experimentos prévios de esterificação. Os solventes utilizados nestes experimentos foram o n-hexano ( $\log P = 3,5$ ), n-heptano ( $\log P = 4,0$ ), ciclo-hexano ( $\log P = 3,2$ ) e 1,4-Dioxano ( $\log P = -1,1$ ). As reações foram conduzidas a 25 °C sob agitação constante de 150 rpm. A razão molar [álcool]/[ácido] utilizada em foi a de 1:1 (0,2 mol L<sup>-1</sup> de cada substrato) e a massa do biocatalisador foi de 100 mg para o butirato de metila e 200 mg para o butirato de etila. Os percentuais de conversão foram determinados após 8h de reação. A carga do biocatalisador utilizada foi de 1,61 mg<sub>proteína</sub>·g<sup>-1</sup><sub>suporte</sub> .

### 3.10.2. Influência da temperatura

Neste estudo, as reações de esterificação foram conduzidas no solvente selecionado sob agitação constante de 150 rpm em várias temperaturas situadas no intervalo de 25-60 °C. A razão molar [álcool]/[ácido] utilizada em todos os experimentos foi a de 1:1 (0,2 mol L<sup>-1</sup> de cada substrato) e a massa do biocatalisador foi de 100 mg para o butirato de metila e 200 mg para o butirato de etila. Os percentuais de conversão foram determinados após 8h de reação. A carga do biocatalisador utilizada foi de 1,61 mg<sub>proteína</sub>·g<sup>-1</sup><sub>suporte</sub>

### 3.10.3. Influência da concentração dos substratos

Nestes experimentos, concentrações equimolares de álcool e ácido butírico no intervalo de 0,1-1 mol L<sup>-1</sup> foram adicionadas ao meio reacional na temperatura selecionada e os rendimentos das reações foram determinados após 8h de reação . A velocidade de agitação foi de 150 rpm e a carga do biocatalisador utilizada foi de 1,61 mg<sub>proteína</sub>·g<sup>-1</sup><sub>suporte</sub>. A massa do biocatalisador utilizada nestes experimentos foi de 100 mg para o butirato de metila e 200 mg para o butirato de etila.

### 3.10.4. Influência da razão molar álcool/ácido ([álcool]/[ácido])

Nestes experimentos, no intuito de avaliar possíveis efeitos inibitórios na atividade da enzima imobilizada causados pelos substratos, as reações de esterificação foram executadas sob constante agitação na temperatura ótima determinada no item 5.2 de duas maneiras: (a) mantendo uma concentração fixa de ácido e variando a

concentração de álcool e (b) mantendo a concentração do álcool constante e variando a concentração de ácido.

A massa de biocatalisador utilizada em todas as reações foi de 100 mg para o butirato de metila e 200 mg para o butirato de etila. As taxas de conversão foram determinadas após 8h de reação sob contínua agitação de 150 rpm. A carga do biocatalisador utilizada nestes experimentos foi de  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ .

### **3.10.5. Influência da massa de biocatalisador adicionada ao meio reacional**

Nesta série de experimentos, a catálise enzimática foi avaliada variando-se a quantidade de enzima imobilizada adicionada ao meio reacional. Os percentuais de biocatalisador adicionado variaram de 50-250 mg. As reações foram efetuadas nas condições otimizadas de temperatura e concentração de substratos determinadas nos itens anteriores. A velocidade de agitação nestes experimentos foi de 150 rpm. Os percentuais de rendimento foram calculados após 8 h de reação. A carga do biocatalisador utilizada nestes ensaios foi de  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ .

### **3.10.6. Influência da quantidade de enzima adicionada ao meio reacional**

Neste estudo, com o objetivo de se obter altas taxas de conversão em tempos relativamente curtos de reação cargas enzimáticas variando de 0,52 a  $3,22 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  ( $16-100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) foram imobilizadas no suporte quitosana. Os derivados obtidos nestas preparações foram utilizados nas sínteses do ésteres estudados e os rendimentos de reação foram calculados para cada carga utilizada. A velocidade de agitação nestes experimentos foi de 150 rpm. Os percentuais de rendimento foram calculados após 8 h de reação.

### **3.10.7. Influência da velocidade de agitação nos rendimentos das esterificações**

Neste estudo, nas condições otimizadas dos itens anteriores, a mistura reacional foi incubada em shaker em diferentes velocidades de agitação (50-250 rpm) com o objetivo de se avaliar possíveis efeitos de transferência de massa externa na reação. O tempo de reação nestes experimentos foi de 8 h e os percentuais de conversão foram calculados de acordo com o procedimento adotado.

### **3.10.8. Influência da quantidade de água nos rendimentos das esterificações**

Neste experimento, a síntese dos ésteres foi efetuada na presença de concentrações crescentes de água que foi adicionada ao meio reacional no intervalo de 0,5-2,0 % (m.m<sup>-1</sup>) em relação ao peso total dos reagentes. Os resultados obtidos foram comparados com as reações executadas na ausência de água. As sínteses foram realizadas nas condições otimizadas para cada éster de acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores. O tempo de reação nestes experimentos foi de 8 h.

### **3.10.9. Influência da presença de agente dessecante nas taxas de conversão**

Neste ensaio, com o intuito de verificar se a remoção de água do meio reacional exerce efeito significativo nos rendimentos das reações estudadas, foi utilizado como agente dessecante a Peneira Molecular 4A previamente ativada a 300 °C por 24 h. O agente dessecante foi adicionado em quantidades situadas no intervalo de 5-40 % (p.v<sup>-1</sup>) sendo os rendimentos das reações medidos após 8 h.

### **3.10.10. Acompanhamento das reações de esterificação**

Dentro das condições de reação otimizadas para cada éster, obtidas a partir dos experimentos anteriores, foi traçado um perfil cinético da reação tomando-se alíquotas do meio reacional em intervalos de tempo pré-determinados. As determinações dos rendimentos foram efetuadas segundo a metodologia proposta e uma curva taxa de conversão vs. tempo de reação foi construída para cada éster.

### **3.10.11. Estabilidade operacional do biocatalisador**

Este estudo visa estabelecer o número máximo de ciclos consecutivos em que o biocatalisador pode ser utilizado sem perda significativa de sua atividade catalítica e diminuição dos rendimentos de esterificação. Neste ensaio, nas condições otimizadas de síntese, o biocatalisador, após cada ciclo de reação, foi lavado com n-heptano para remover reagentes e produtos adsorvidos na matriz sendo em seguida secado a vácuo a temperatura ambiente e ressuspensão em um novo meio reacional que foi novamente incubado nas mesmas condições anteriores. Os rendimentos em termos de conversão de éster foram calculados para cada ciclo de acordo com o método utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

Neste trabalho, um estudo comparativo dos rendimentos de esterificação obtidos com a utilização do biocatalisador selecionado nestes experimentos nas condições otimizadas e a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> foi efetuado.

### 3.10.12. Determinação do rendimento de esterificação na síntese dos ésteres

O percentual de esterificação para cada síntese foi calculado a partir da concentração de ácido inicial e consumido na reação medido por titulação com solução alcoólica de KOH 0,01 mol L<sup>-1</sup> ou 0,02 mol L<sup>-1</sup> utilizando fenolftaleína como indicador.

O rendimento de esterificação foi calculado através da seguinte expressão:

$$\text{Esterificação}(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100 \quad (9)$$

onde C<sub>0</sub> é a concentração de ácido real medida antes do início da reação e C é a concentração de ácido residual medida após o tempo t(h) de reação.

A Tabela 5 apresenta algumas propriedades dos reagentes e produtos das sínteses estudadas neste trabalho.

**Tabela 5. Propriedades físico-químicas dos reagentes e ésteres**

Composto	PM (g.mol <sup>-1</sup> )	PE (°C)	d (g/cm <sup>3</sup> )	Solubilidade em água	log P
Butirato de metila	102,13	103	0,900	1,5 x 10 <sup>4</sup> mg L <sup>-1</sup> a 25 ° C	1,29
Butirato de etila	116,16	121	0,879	4,9 x 10 <sup>3</sup> mg L <sup>-1</sup> a 20 ° C	1,73
Ácido butírico	88,10	163,5	0,960 (20°C)	6,0 x 10 <sup>4</sup> mg L <sup>-1</sup> a 25°C	0,79
Metanol	32,04	64,7	0,790	miscível	-0,77
Etanol	46,07	78,5	0,789	miscível	-0,31

Fonte: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), acessado em 02/12/2012

*Capítulo 4- RESULTADOS E  
DISCUSSÃO*

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. IMOBILIZAÇÕES NA PRESENÇA DE SURFACTANTES

#### 4.1.1. Efeito da adição de surfactantes na atividade da enzima solúvel

Vários trabalhos têm demonstrado que em meio aquoso homogêneo algumas lipases, incluindo as lipases de *Rhizomucor miehei* (RmL), tendem a formar agregados bimoleculares (dímeros) com reduzida atividade (Palomo *et al.*, 2003, 2005)

De acordo com o mecanismo proposto por Palomo *et al.* (2003), duas lipases em sua conformação aberta podem interagir entre si através de suas grandes superfícies hidrofóbicas que circundam seus centros catalíticos. O agregado resultante desta interação terá um centro ativo aberto, porém parcialmente bloqueado, o que levará a certas implicações em algumas de suas propriedades bioquímicas como atividade, estabilidade e enantiosseletividade. Os resultados obtidos em vários experimentos no trabalho acima citado comprovaram esta hipótese. A Figura 30 mostra o mecanismo de formação de dímeros de lipases

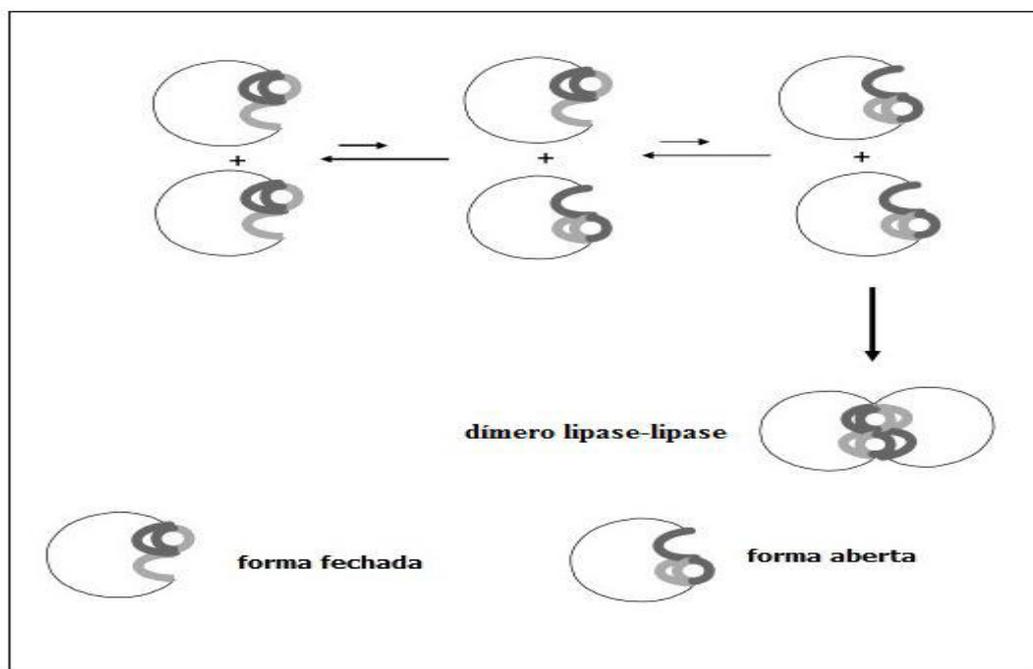


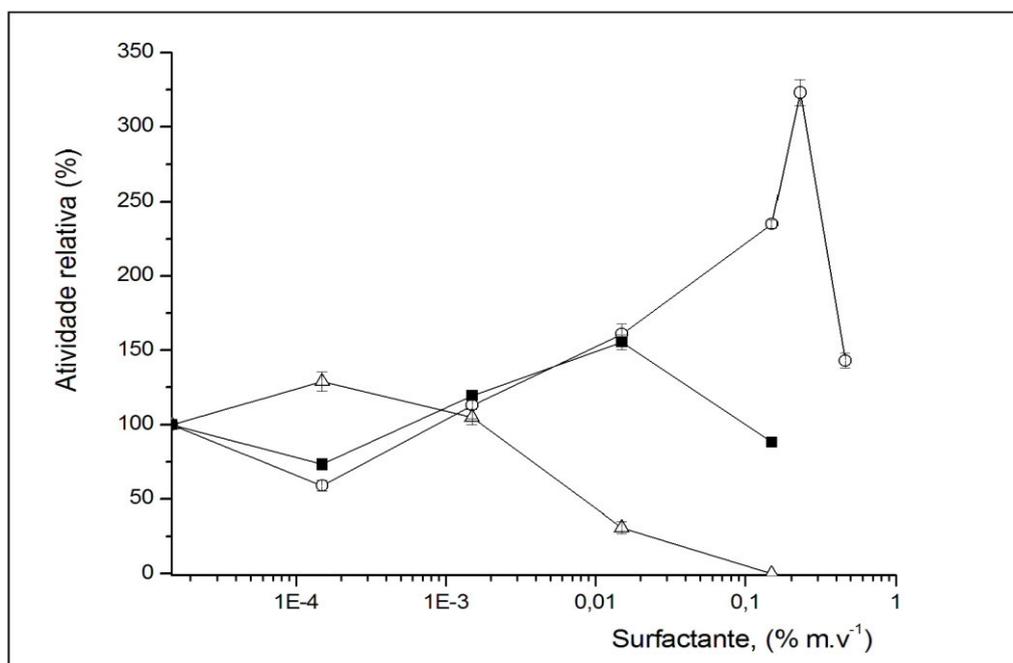
Figura 30. Mecanismo de formação de dímeros lípase-lipase. (Fonte: Palomo *et al.*, 2003, com modificações).

No mesmo trabalho, a forma monomolecular (enzimas individuais) das enzimas foi observada somente em soluções diluídas ou na presença de detergentes.

Alguns trabalhos tem evidenciado que as atividades catalíticas de algumas lipases podem ser significativamente aumentadas na presença de certas classes de surfactantes. Este efeito geralmente tem sido atribuído principalmente: (i) a quebra dos agregados ou dímeros lipase-lipase em solução e/ou (ii) o deslocamento do equilíbrio forma fechada-forma aberta das moléculas individuais das enzimas em direção a conformação aberta (forma ativa) das lipases. O mecanismo de interação lipase-surfactante tem sido discutido em vários trabalhos, porém ainda não foi completamente elucidado. Acredita-se que estas interações sejam primariamente hidrofóbicas, mas a natureza dos grupos hidrofílicos nas estruturas dos detergentes também contribui para esta interação exercendo efeitos nas propriedades finais da enzima.

Desta forma, o efeito de concentrações crescentes de diferentes surfactantes na atividade hidrolítica da lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL) na forma solúvel foi inicialmente avaliado e os resultados estão apresentados na Figura 31.

A presença de diferentes tensoativos adicionados em vários níveis no meio de reação, promoveu diferentes efeitos sobre a atividade hidrolítica da RmL solúvel vs. pNPB após exposição. A atividade inicial para todos os casos foi considerada 100% na ausência do tensoativo.



**Figura 31.** Efeito dos surfactantes na atividade da lipase de *R. miehei* solúvel vs. pNPB. A atividade da lipase foi considerada 100% na ausência dos surfactantes. Eixo x está plotado em escala logarítmica. (O) SDS; (■) Triton X-100; (△) CTAB.

Como pode ser observado na Figura 31, a enzima solúvel exibiu um moderado aumento em sua atividade (1,5 vezes) na presença do surfactante não-iônico Triton X-100 adicionado na sua concentração micelar crítica ( $cmc = 0,015\%$ ) (Helisto & Korpela, 1998). Em valores de concentração acima deste nível a atividade da enzima diminuiu marcadamente.

A enzima solúvel também mostrou um aumento quase linear de sua atividade hidrolítica após incrementos consecutivos do tensoativo aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS), exibindo um valor máximo de atividade quando a concentração do surfactante foi adicionada em torno de sua concentração micelar crítica ( $0,23\% \text{ m.v}^{-1}$ ). Nesta concentração, a atividade hidrolítica da enzima solúvel foi aproximadamente 3 vezes maior quando comparada a atividade medida na ausência deste surfactante. Acima da concentração micelar crítica do surfactante, a atividade da enzima solúvel diminuiu sensivelmente, porém ainda foi maior do que a atividade medida na ausência de SDS.

Este mesmo comportamento foi observado na atividade da enzima solúvel da lipase de *Thermomyces lanuginosus* vs. pNPB na presença deste surfactante (Mogensen *et al.*, 2005).

Os efeitos observados na Figura 31 podem ser atribuídos a quebra da estrutura dimérica lipase-lipase na presença destes tensoativos, levando a formação de moléculas individuais que podem ser estabilizadas em solução na sua conformação mais ativa (forma aberta) tendo como consequência um incremento em suas atividades. Por outro lado, moléculas adicionais de detergentes adicionadas ao meio reacional acima da  $cmc$  (nestes experimentos, em particular), podem se ligar a região em torno do sítio ativo da enzima, bloqueando o acesso do substrato, induzindo a inibição da enzima, aumentando o valor de  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten).

Também pode ser observado na Figura 31 que o surfactante SDS adicionado na sua concentração micelar crítica ( $cmc$ ) promoveu efeitos mais positivos na atividade da enzima solúvel quando comparado ao Triton X-100.

Neste caso, há duas possíveis considerações para explicar este fenômeno: (i) o SDS, através de uma interação específica na região do sítio ativo da enzima, promovendo um aumento na atividade enzimática e (ii) em adição a isto, este surfactante, pode se ligar inespecificamente à superfície da proteína, e a sua carga pode ocasionar um enfraquecimento das interações eletrostáticas da enzima na sua forma nativa, tornando-a mais flexível (parcialmente desestabilizada), permitindo a

acomodação de mais moléculas de substrato, aumentando assim, o  $k_{cat}$  (número de *turnover*, que é uma medida do número máximo de moléculas de substrato que podem ser convertidas em produtos por centro ativo de enzima e por unidade de tempo,  $s^{-1}$ ) e, portanto, aumentando a atividade enzimática (Mogensen *et al.*, 2005)

Ao contrário, o tensoativo não iônico Triton X-100, interage com superfície da proteína sem promover alterações significativas na estrutura nativa e na estabilidade da enzima.

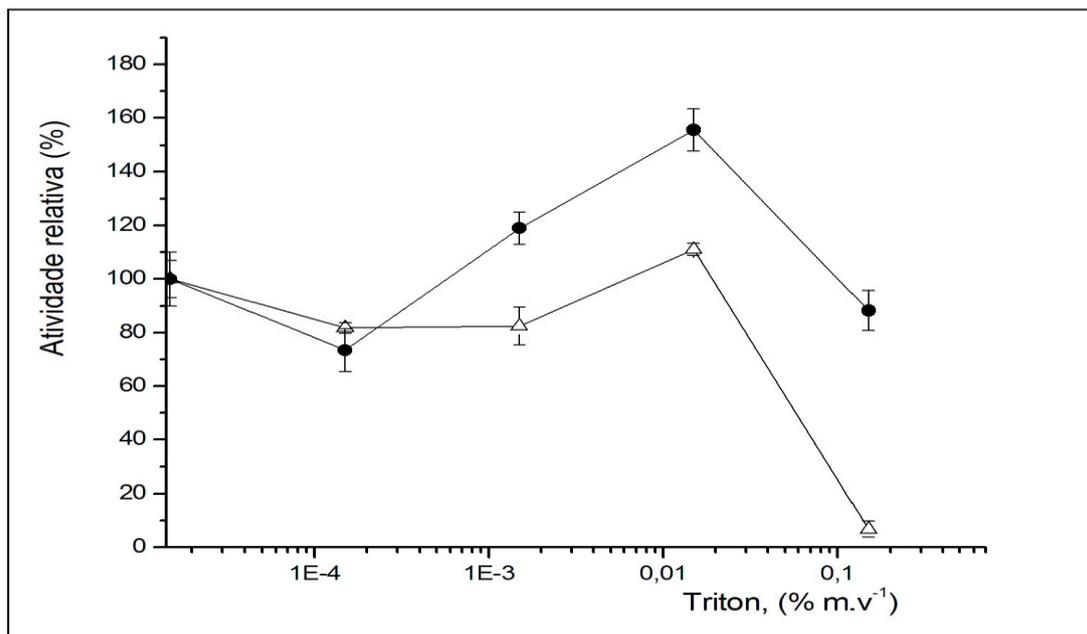
A presença do brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), um tensoativo catiônico no meio reacional, exerceu um efeito negativo nas atividades hidrolíticas medidas. Após um ligeiro aumento na atividade da RmL solúvel quando adicionado em baixa concentração (0,000 15 % m.v<sup>-1</sup>), sucessivos incrementos deste detergente resultaram em um decréscimo nas atividades hidrolíticas determinadas. Em concentrações acima de 0,1 % foi evidenciada uma completa inibição da atividade enzimática. Surfactantes carregados positivamente tendem a formar complexos com a lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL) em uma grande faixa de pH devido a combinação de atrações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (Folmer *et al.*, 1997; Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2010).

Levando-se em consideração estes resultados preliminares, os procedimentos de imobilização adotados foram efetuados somente na presença dos surfactantes SDS e Triton X-100.

## **4.2. Efeito da presença dos surfactantes triton X-100 e SDS na atividade da lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL) imobilizada no suporte quitosana**

### **4.2.1. Efeito do surfactante Triton X-100**

Nestes experimentos, Triton X-100 foi adicionado nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios preliminares efetuados para a enzima solúvel. Os resultados das duas estratégias de imobilização empregadas neste trabalho estão mostrados na Figura 32. A atividade inicial para todos os casos foi considerada 100% na ausência do tensoativo. As atividades dos derivados foram medidas após 5h de imobilização.



**Figura 32.** Efeito do surfactante Triton X-100 na atividade dos derivados preparados utilizando a primeira (△) e a segunda estratégia de imobilização (●). Os experimentos foram executados de acordo com o procedimento experimental descrito na seção materiais e métodos. A atividade relativa foi considerada 100% para os derivados produzidos na ausência do surfactante. O eixo x está plotado em escala logarítmica.

Triton X-100 é um surfactante comumente utilizado para desorver enzimas imobilizadas em suportes, incluindo as lipases. Contudo, em muitos casos, este detergente tem sido adicionado durante alguns procedimentos de imobilização de lipases resultando em rendimentos de imobilização variando de 60-100 % (Palomo *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2002).

Nas duas estratégias de imobilização inicialmente efetuadas neste trabalho, as estratégias, os rendimentos de imobilização ( $R_1$ ) foram similares variando no intervalo de 80-99 %, estando de acordo com dados reportados na literatura. Entretanto, em termos de atividade relativa dos derivados obtidos, os dois métodos de imobilização exibiram diferenças bastante acentuadas.

Os resultados mostrados na Figura 32 indicam que a reticulação do suporte seguida de imobilização da enzima na presença de Triton X-100 (primeira estratégia) não resultou em aumentos significativos nas atividades catalíticas dos derivados produzidos. Um ligeiro aumento na atividade foi observado somente quando a concentração do surfactante no meio de imobilização foi 0,015 % m.v<sup>-1</sup>. Acima desta concentração, as atividades dos derivados foram marcadamente reduzidas a valores menores quando comparadas aos derivados obtidos na ausência do surfactante.

Em contraste, a Figura 32 mostra que a reticulação com glutaraldeído de enzimas previamente adsorvidas no suporte utilizado, parece ser a melhor estratégia para se obter derivados com boa atividade catalítica, utilizando este detergente.

A quitosana é um suporte de característica hidrofílica enquanto a lipase de *Rhizomucor miehei* possui um número apreciável de aminoácidos apolares em sua estrutura.

A adsorção destas enzimas em quitosana pode ser atribuída à combinação de dois fatores:

- (i) troca iônica, através dos aminoácidos carregados (ex: Asp e Glu ) da proteína com os grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana em valores de pH nas proximidades de seu pKa onde a fração  $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$  está em torno de 0,5;
- (ii) através de interações hidrofóbicas (ex; forças de van der Waals) e ligações de hidrogênio envolvendo os grupos  $\text{NH}_2/\text{OH}$  do suporte.

A Figura 33 mostra as possíveis interações entre a lipase de *Rhizomucor miehei* e o suporte quitosana por união covalente ao suporte ativado com glutaraldeído e por adsorção propostas por Collins *et al.*, 2011.

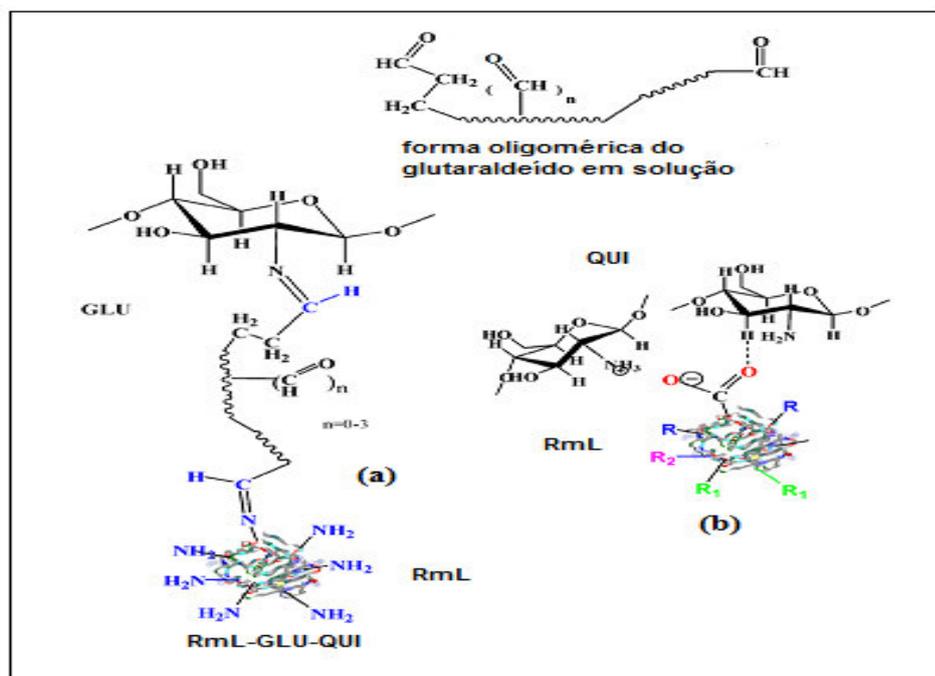


Figura 33. Mecanismos de interação entre a lipase de *Rhizomucor miehei* e o suporte quitosana: (a) por união covalente ao suporte ativado com glutaraldeído e (b) por adsorção. (Fonte: Collins *et al.*, 2011, com modificações.)

Concentrações situadas no intervalo de 0,00015 %-0,015 % m.v<sup>-1</sup> resultaram em derivados imobilizados com atividades catalíticas aumentadas quando comparados com os derivados obtidos quando a primeira estratégia de imobilização foi utilizada.

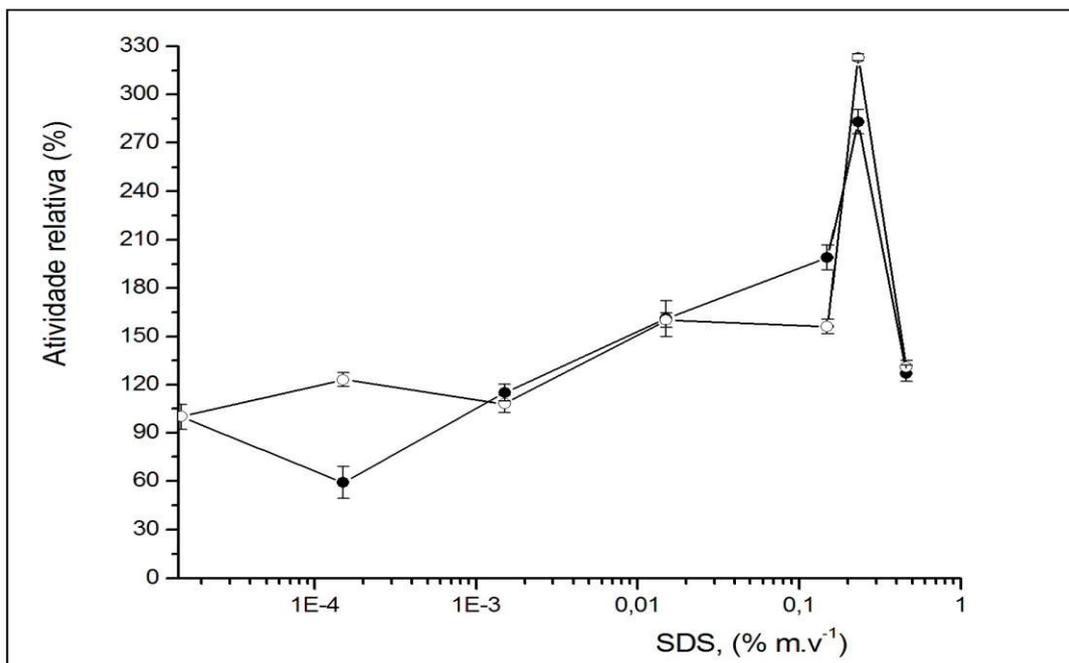
Assim como na primeira estratégia de imobilização, a máxima atividade para os derivados foi observada quando a concentração de Triton X-100 adicionada foi de 0,015 % m.v<sup>-1</sup>. Acima deste nível de concentração, as atividades dos derivados diminuíram apreciavelmente, contudo em menor extensão em comparação aos derivados produzidos pela primeira estratégia de imobilização ou quando a imobilização foi conduzida na ausência de surfactante.

Lipase de *Geobacillus thermoleovorans* foi imobilizada em polipropileno (Accurel EP-100) na presença de Triton X-100 0,1 % em pH 6,5. O derivado obtido nestas condições apresentou um aumento de 4-5 vezes na atividade lipolítica utilizando laurato de p-nitrofenila como substrato quando comparada ao derivado produzido nas mesmas condições, porém, na ausência de surfactante (Sanchez-Otero *et al.*, 2008).

É consensual que o grau de hiperativação das lipases na presença de certas classes de tensoativos é marcadamente influenciado pelo tipo de enzima utilizado, pelas características e concentração do surfactante adicionado ao meio de imobilização, pelas propriedades do suporte, condições de imobilização bem como pelos substratos utilizados na determinação das atividades, uma vez que os surfactantes também podem alterar a seletividade das enzimas em relação a diferentes substratos (Fernandez-Lorente, *et al.*, 2007; Mogensen *et al.*, 2005) .

#### **4.2.2. Efeito do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS)**

Nestes experimentos, o surfactante SDS foi adicionado nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios preliminares efetuados para a enzima solúvel. Os resultados para as duas estratégias de imobilização utilizadas neste trabalho estão mostrados na Figura 34. A atividade inicial para todos os casos foi considerada 100 % na ausência do tensoativo. As atividades dos derivados foram medidas após 5 h de imobilização.



**Figura 34.** Efeito do surfactante SDS na atividade dos derivados preparados utilizando a primeira (●) e a segunda estratégia de imobilização (○). Os experimentos foram executados de acordo com o procedimento experimental descrito na seção materiais e métodos. A atividade relativa foi considerada 100% para os derivados produzidos na ausência do surfactante. O eixo x está plotado em escala logarítmica.

Os rendimentos de imobilização ( $R_i$ ) variaram no intervalo de 82-98 % quando a primeira estratégia (reticulação do suporte quitosana com glutaraldeído seguida de imobilização da lipase na presença do surfactante) foi utilizada e se situaram no intervalo de 74-99 % quando a segunda estratégia (adsorção prévia da enzima seguida de reticulação com glutaraldeído) foi empregada.

A Figura 34 mostra que ao contrário do que foi observado nas imobilizações efetuadas na presença de Triton X-100, a adição do surfactante SDS no intervalo de concentrações de 0,00015- 0,23 % m.v<sup>-1</sup>, independente da estratégia de imobilização utilizada, foi sempre acompanhada de um aumento crescente nas atividades dos derivados obtidos. Nas duas estratégias, a atividade máxima foi conseguida quando a concentração do tensoativo adicionada foi 0,23 % m.v<sup>-1</sup>. Nesta concentração, as atividades dos derivados foram aumentadas por um fator de 2,9 vezes e 3,4 vezes respectivamente, para a primeira e para a segunda estratégia de imobilização. Os resultados apresentados foram bastante similares aos resultados obtidos com a enzima solúvel. Para concentrações acima de sua concentração micelar crítica, foi verificado um decréscimo nas atividades dos derivados. Porém os valores de atividades medidos

ainda foram superiores aos valores observados quando as imobilizações foram efetuadas na ausência deste surfactante.

Em trabalho recente, lipase de *Rhizomucor miehei* foi imobilizada em diferentes suportes na presença do detergente aniônico laurato de sacarose utilizando três protocolos de imobilização (Filice *et al.*, 2011). Quando a enzima foi fisicamente adsorvida no suporte Sepharose-Q, um forte trocador aniônico, em pH 7 e a 25 °C, após prévia purificação e hiperativação com o detergente mencionado na concentração de 0,5 % m.v<sup>-1</sup>, o derivado obtido reteve mais de 90 % de sua hiperativação mesmo após a remoção do surfactante com água. Quando a enzima foi ligada unipontualmente ao suporte Sepharose-CNBr, a hiperativação foi completamente eliminada após a remoção do detergente. Em um terceiro procedimento, a imobilização da enzima previamente hiperativada no suporte glioxil-agarose foi efetuada em pH 10 (ligação covalente multipontual). Neste procedimento, os autores observaram uma queda em torno de 50 % na atividade da enzima durante a imobilização nestas condições, sendo evidenciado também que após a remoção do tensoativo a hiperativação, já reduzida na etapa de imobilização, foi inteiramente eliminada.

O melhor resultado obtido com a resina aniônica foi atribuído a uma possível mudança na região de maior densidade de cargas negativas envolvidas na adsorção da enzima quando a forma fechada (inativa) da lipase é deslocada para a sua conformação aberta (ativa). Além deste fator, a presença do detergente aparentemente induziria uma complexa mudança no centro ativo da enzima promovendo um rearranjo estrutural nas outras regiões da proteína.

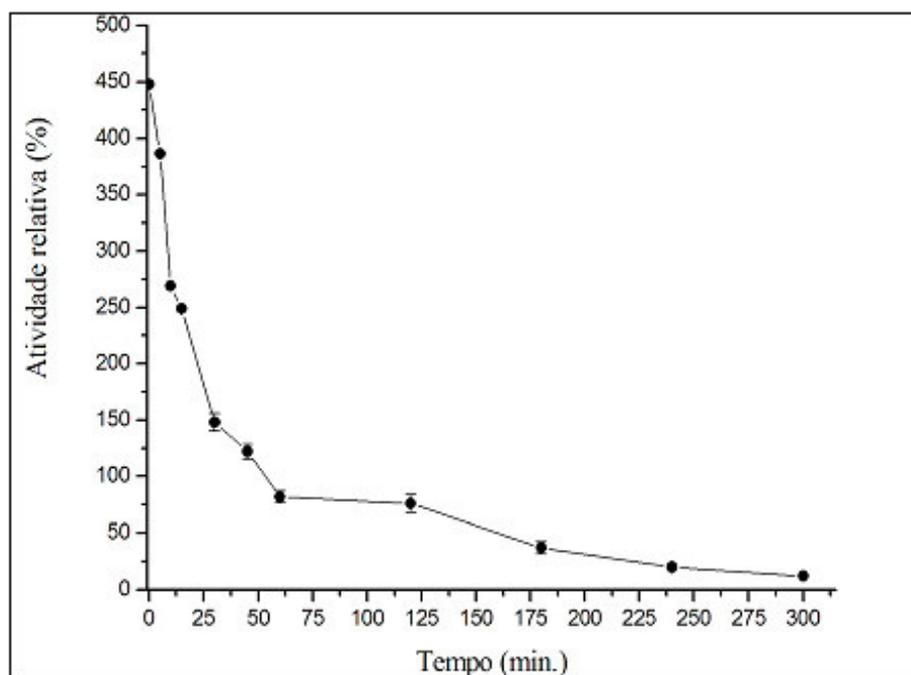
Estas considerações podem em parte explicar os resultados obtidos neste trabalho. A quitosana em pH 7 é um eletrólito policatiônico atuando como um trocador aniônico tal como o suporte Sepharose-Q. Portanto, a presença do surfactante SDS no meio de imobilização pode causar as mesmas alterações estruturais na molécula da enzima levando a uma estabilização de sua forma ativa, mesmo após a remoção do surfactante.

Os resultados apresentados nas Figuras 32 e 34 também comprovaram que o tensoativo aniônico SDS foi muito mais efetivo do que o Triton X-100 na obtenção de derivados com alta atividade catalítica.

Desta forma, na continuidade deste trabalho, baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios de imobilização, todos os experimentos subsequentes foram efetuados

utilizando a segunda estratégia de imobilização na presença do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), adicionado ao meio de imobilização na concentração de 0,23 % m.v<sup>-1</sup>.

No intuito de verificar possíveis efeitos inibitórios provocados pela exposição prolongada da enzima solúvel ao surfactante SDS durante a imobilização, a cinética de hiperativação da enzima solúvel na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup> foi acompanhada por 5 horas. A Figura 35 mostra os resultados obtidos neste experimento. A atividade inicial para todos os casos foi considerada 100 % na ausência do tensoativo.



**Figura 35.** Cinética de hiperativação da lipase de *R. miehei* imobilizada em quitosana na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup> utilizando a segunda estratégia de imobilização.

Os resultados mostrados na Figura 35 mostram que a lipase de *R. miehei* na forma solúvel sofrem uma queda acentuada em suas atividade após exposição prolongada ao surfactante SDS nas condições experimentais estabelecidas. Após uma intensa ativação inicial, a atividade da enzima solúvel decresce após poucos minutos de contato com o surfactante. Entretanto, pode-se observar também, que após um tempo de incubação de 50 minutos, mesmo com a atividade diminuída, a enzima solúvel exibiu ainda uma atividade maior quando comparada a enzima solúvel incubada na ausência do surfactante (considerada como 100 %).

Em função dos resultados observados no ensaio anterior e com o objetivo de minimizar os efeitos da exposição prolongada das enzimas nas condições estabelecidas,

novas imobilizações foram efetuadas variando-se a velocidade de agitação, temperatura e tempos de imobilização. A Tabela 6 mostra os efeitos destes parâmetros de imobilização nos biocatalisadores produzidos. O tempo de ativação com glutaraldeído foi mantido em 1h a 25 °C e velocidade de agitação de 25 rpm para todas as imobilizações.

**Tabela 6. Resultados para imobilização de lipases em quitosana utilizando o segundo método de imobilização na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup>. Carga oferecida: 16 U.g<sup>-1</sup>; (n=3). Temperatura de imobilização (T<sub>imob.</sub>, °C), tempo de imobilização (t<sub>imob.</sub>,h), velocidade de agitação (v<sub>agitação</sub>,rpm), Rendimento de Imobilização (R<sub>I</sub>- %), Ativ.Derivado (At<sub>der.</sub>- U<sub>pNPB</sub>·g<sub>gel</sub><sup>-1</sup>), Ativ. Recuperada (At<sub>rec.</sub>- %)**

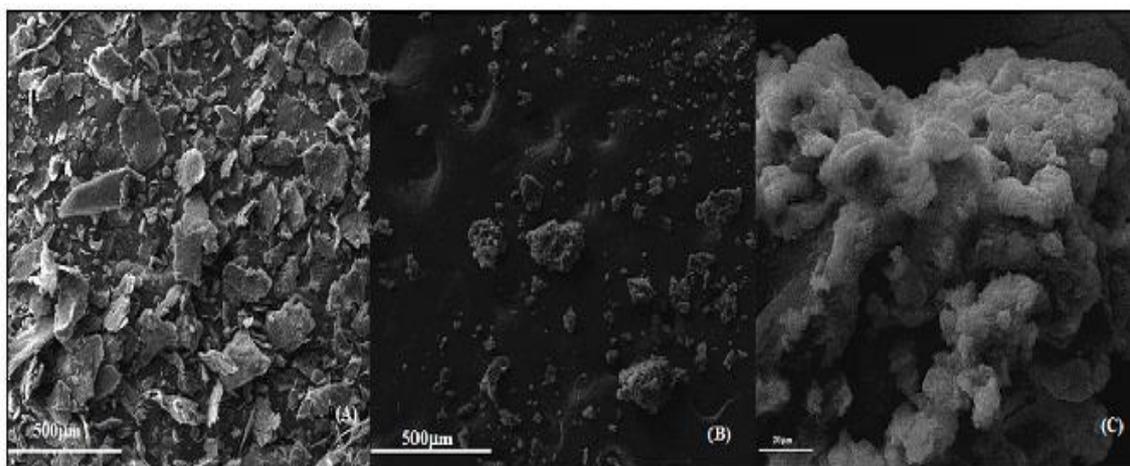
% SDS (m.v <sup>-1</sup> )	T <sub>imob.</sub> (°C)	t <sub>imob.</sub> (h)	v <sub>agitação</sub> (rpm)	R <sub>I</sub>	At <sub>der.</sub> (U <sub>pNPB</sub> ·g <sub>gel</sub> <sup>-1</sup> )	At <sub>rec.</sub> (%)
0,00	4	1	220	100	4,10 ± 0,2	24,9 ± 2
0,23	4	1	220	96,2 ± 1	10,64 ± 0,1	69,1 ± 1
0,00	25	5	25	93,9 ± 2	2,60 ± 0,3	16,9 ± 2
0,23	25	5	25	99,1 ± 4	8,10 ± 0,3	49,8 ± 1
0,00	25	1	25	91,1 ± 1	4,10 ± 0,1	27,4 ± 1
0,23	25	1	25	95,6 ± 1	8,65 ± 0,4	56,4 ± 2
0,23	25	1	220	96,1 ± 2	6,90 ± 0,1	45,1 ± 2

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram a grande influência das condições de imobilização avaliadas nas atividades dos biocatalisadores produzidos. Os rendimentos de imobilização não sofreram variações significativas. Porém, as atividades dos derivados foram grandemente influenciadas pelas condições de imobilização.

Em função dos resultados apresentados na Tabela 6 as melhores condições de imobilização da lipase de *R. miehei* na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup> foram observadas na temperatura de 4 °C, velocidade de agitação de 220 rpm, tempo de imobilização de 1h e reticulação com glutaraldeído 0,6 % v.v<sup>-1</sup> por 1h a 25 °C, 25 rpm. Estas condições otimizadas de imobilização permitiram a obtenção de biocatalisadores com elevada atividade catalítica.

#### 4.2.3. Caracterização do suporte quitosana por microscopia de varredura eletrônica (MEV)

O suporte quitosana pode sofrer apreciáveis modificações em sua morfologia após tratamento com glutaraldeído. Neste sentido, as possíveis mudanças na superfície deste suporte antes e após reticulação da quitosana com glutaraldeído 0,6 % v.v<sup>-1</sup> foram examinadas utilizando-se a técnica de microscopia de varredura eletrônica (MEV). Além disso, outro experimento utilizando esta técnica foi efetuado para verificar as mudanças estruturais deste suporte após imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* nas condições otimizadas no ítem anterior . A Figura 36 mostra três microfotografias de varredura eletrônica de: (a) Quitosana comercial (QUIT ), (b) Quitosana tratada com glutaraldeído 0,6 % v.v<sup>-1</sup> (QUIT/GLU 0.6% v.v<sup>-1</sup>) e (c) Suporte quitosana reticulado com glutaraldeído 0,6 % v.v<sup>-1</sup> após imobilização por adsorção de lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) QUI/GLU 0,6 % (v.v<sup>-1</sup>) / RML



**Figura 36. Microfotografias de varredura eletrônica de: (a) Quitosana comercial (QUIT), (b) Quitosana tratada com glutaraldeído 0,6 % v.v<sup>-1</sup> (QUIT/GLU 0.6% v.v<sup>-1</sup>) e (c) Suporte quitosana reticulado com glutaraldeído 0,6 % v.v<sup>-1</sup> após imobilização por adsorção de lipases de *Rhizomucor miehei* (RmL) QUI/GLU 0,6 % (v.v<sup>-1</sup>) / RmL**

Os ensaios de microscopia de varredura eletrônica (MEV) nas condições descritas na seção materiais e métodos evidenciam a grande mudança estrutural causada pelo agente de reticulação no suporte utilizado nas imobilizações. Podemos observar na Figura 36 uma grande diferença entre a quitosana comercial (quitosana em pó) (Fig. 36A) e a quitosana após 1h de tratamento com glutaraldeído 0,6% v.v<sup>-1</sup> em tampão fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7 a 25 °C (Fig. 36B). Após ativação, a superfície do suporte utilizado fornece uma maior área de contato para a imobilização das lipases. Esta

mudança estrutural pode explicar em parte os altos rendimentos de imobilização observados nos experimentos de imobilização (Foresti, 2007). As estruturas arredondadas na Figura 36C podem ser atribuídas à formação de agregados de proteínas sobre o suporte durante a imobilização (Foresti, 2007).

#### 4.2.4. Determinação da estabilidade térmica dos biocatalisadores

Os derivados produzidos na segunda metodologia de imobilização em condições otimizadas nos experimentos anteriores foram avaliados quanto a sua estabilidade térmica a 60 °C. Os resultados obtidos foram comparados com a estabilidade térmica da enzima solúvel e com a enzima comercial Lipozyme® na mesma temperatura. O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e o fator de estabilidade (FE) foram determinados para cada derivado utilizado nestes ensaios.

Adicionalmente, o efeito da concentração de glutaraldeído adicionado na etapa de reticulação do suporte contendo a enzima adsorvida também foi avaliado nestes experimentos. A concentração de glutaraldeído nestes experimentos variou no intervalo de 0,6-5 % v.v<sup>-1</sup>.

Alguns trabalhos têm mostrado que diferentes concentrações de glutaraldeído utilizadas na reticulação ou ativação de suportes como a quitosana podem resultar na obtenção de biocatalisadores com diferenças significativas em suas propriedades tais como atividade e estabilidade térmica (Silva *et al.*, 2012). Os resultados para estes experimentos estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7. Resultados para estabilidade térmica a 60°C de lipases imobilizadas em quitosana utilizando o método II na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup>. Carga oferecida: 16 U.g<sup>-1</sup>; (n=3). Tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ,min) , Fator de estabilidade (FE), Rendimento de Imobilização ( $R_I$ - %), Ativ. Derivado( $At_{der}$ - U.g<sup>-1</sup>), Ativ. Recuperada ( $At_{rec}$ - %)**

Biocatalisador	$R_I$ , %	$At_{der}$ . ( $U_{pNPB} \cdot g_{gel}^{-1}$ )	$At_{rec}$ . %	$t_{1/2}$ ,min	FE
Enzima solúvel	-	-	-	0,64	-
Lipozyme®	-	-	-	3,15 ± 0,6	4,80 ± 0,9
QUI-GLU 0,6% v.v <sup>-1</sup>	96 ± 4	9,45 ± 0,4	61 ± 2	42,54 ± 3,5	64,44 ± 5,3
QUI-GLU 1,5% v.v <sup>-1</sup>	93,1 ± 1	7,50 ± 0,2	50,5 ± 1	19,85 ± 1,7	30,10 ± 2,5
QUI-GLU 2,5% v.v <sup>-1</sup>	96,9 ± 1	7,20 ± 0,2	46,8 ± 1	14,95 ± 0,7	22,65 ± 1,1
QUI-GLU 5% v.v <sup>-1</sup>	97,1 ± 1	7,54 ± 0,2	45,7 ± 3	22,49 ± 6,2	34,10 ± 9,4

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que os rendimentos de imobilização em todos os experimentos foram muito similares e acima de 90%.

Entretanto, os dados apresentados também indicam que o melhor derivado em termos de atividade recuperada ( $At_{rec.}$ ) e estabilidade térmica à 60 °C foi obtido quando a ativação do suporte foi efetuada em baixa concentração de glutaraldeído (0,6 % v.v<sup>-1</sup>).

O derivado obtido ( $t_{1/2} = 42,54$  min) foi 65 vezes mais estável do que a enzima solúvel ( $t_{1/2} = 0,64$  min) e 13 vezes mais estável do que a enzima comercial Lipozyme® ( $t_{1/2} = 3,15$  min) na temperatura do experimento.

Podemos observar também que quantidades crescentes de glutaraldeído na etapa de reticulação do suporte provocaram uma diminuição na atividade dos derivados bem como uma redução nos tempos de meia-vida dos biocatalisadores produzidos.

A Figura 37 mostra o perfil de inativação térmica dos derivados produzidos na temperatura de 60°C.

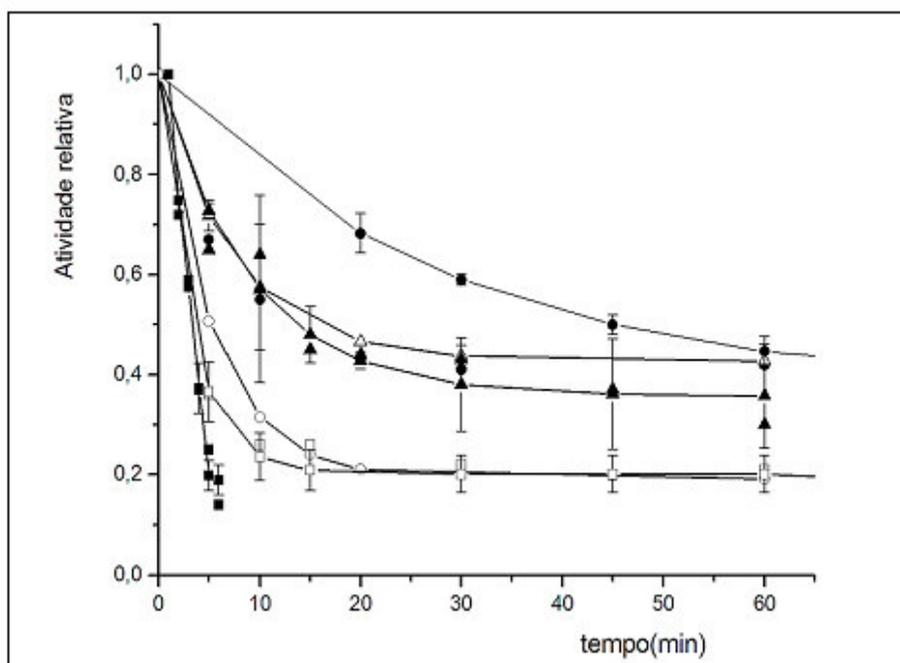


Figura 37. Perfil de inativação térmica da lipase de *R. miehei* solúvel e dos derivados quitosana-glutaraldeído (QUI-GLU). Imobilização em pH 7, 4°C, 1h. carga oferecida: 16 U.g<sup>-1</sup>. Enzima solúvel e derivados foram incubados em tampão fosfato de sódio 25 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7 a 60 °C. (■) RML solúvel; (□) Lipozyme®; (●) QUI-GLU 0,6%; (△) QUI-GLU 1,5%; (○) QUI-GLU 2,5%; (▲) QUI-GLU 5%. As linhas representam o ajuste do modelo de Sadana e Henley.

A diminuição nas atividades dos derivados obtidos pode ser explicado pela redução do diâmetro dos poros do suporte após reticulação, devido a alta reatividade do glutaraldeído. Além disso, este agente de reticulação também pode reagir com outros grupos da enzima e um grande número de ligações entre os grupos ativos da enzima e

do suporte podem ser estabelecidas promovendo distorções na estrutura terciária da enzima (Silva *et al.*, 2012).

Sendo assim, o biocatalisador obtido por adsorção das lipases a 4° C seguida de reticulação com glutaraldeído 0,6 % v.v<sup>-1</sup> a 25 °C foi selecionado para a continuidade deste trabalho.

A estabilidade térmica do melhor derivado também foi avaliada a 37 °C. Os resultados deste experimento estão mostrados na Figura 38.

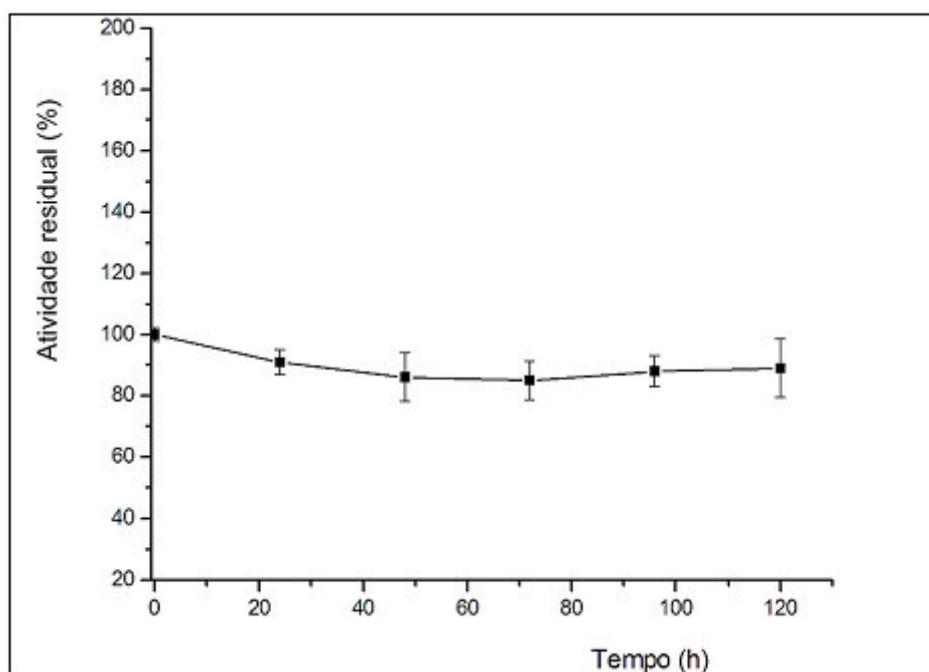


Figura 38. Estabilidade térmica do derivado QUI-GLU 0,6% v.v<sup>-1</sup> a 37°C.

Os resultados apresentados na Figura 38 mostram que o biocatalisador produzido em condições otimizadas foi bastante estável em condições brandas de temperatura. Após 120 h de incubação a 37 °C, o derivado reteve 89 % de sua atividade inicial indicando que o derivado selecionado pode ser utilizado sem perda significativa de sua atividade na síntese de compostos que requeiram longos tempos de reação nesta temperatura.

#### 4.2.5. Influência dos efeitos de transferência de massa externa e interna na hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB).

Quando se trabalha com enzimas imobilizadas, assim como com qualquer outro catalisador suportado, os substratos, para atingirem o centro catalítico das enzimas localizadas na superfície externa do biocatalisador, devem primeiro se difundir do seio

da fase líquida até à superfície das partículas e atravessar uma camada estagnada de fluido (camada de Nernst) que rodeia a sua superfície e que é responsável pelo transporte de substratos e produtos por difusão.

Para enzimas imobilizadas em suportes porosos, além do efeito de resistência de transferência de massa externa mencionado anteriormente, podem ocorrer efeitos de resistência à difusão interna do substrato, uma vez que este deve ser transportado no interior dos poros do biocatalisador até atingir o centro ativo da enzima para que a reação ocorra (Cabral *et al.*, 2003).

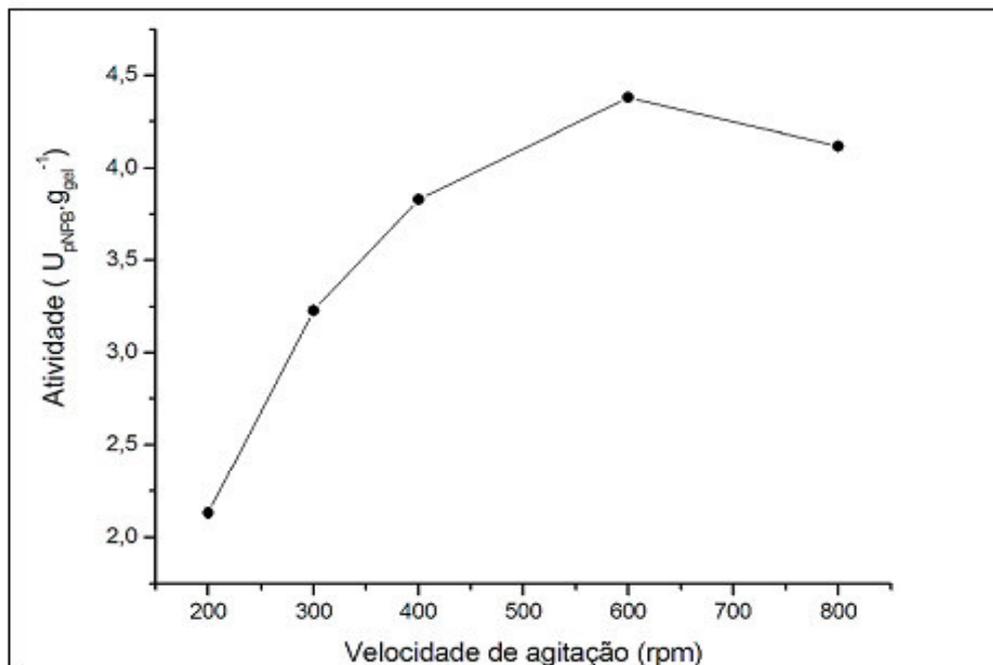
Desta maneira, um gradiente de concentração do substrato no interior dos poros é estabelecido, ocasionando uma diminuição da concentração do substrato ao longo da distância em relação à superfície do suporte de imobilização.

A mesma consideração deve ser feita para os produtos de uma reação particular que também devem se difundir do interior dos poros do biocatalisador para o macroambiente da solução.

Efeitos de transferência de massa externa podem ser minimizados ou mesmo eliminados reduzindo-se a espessura da camada de filme em torno do biocatalisador aumentando-se a velocidade de agitação da mistura reacional.

A influência da transferência interna de massa num determinado processo pode ser minimizada reduzindo-se o tamanho de partícula, desta forma, diminuindo o caminho para a difusão do substrato, podendo resultar em um aumento da velocidade de reação.

A presença de resistência de transferência de massa externa foi estudada variando-se a velocidade de agitação do sistema reacional mantendo-se todas as demais condições experimentais constantes. A carga enzimática nestes experimentos foi de  $8 \text{ U.g}^{-1}$  para assegurar que a reação de hidrólise em estudo ocorresse na ausência de limitações difusionais internas. As velocidades de agitação nestes ensaios variaram no intervalo de 200-800 rpm. Os resultados para estes experimentos estão apresentados na Figura 39.



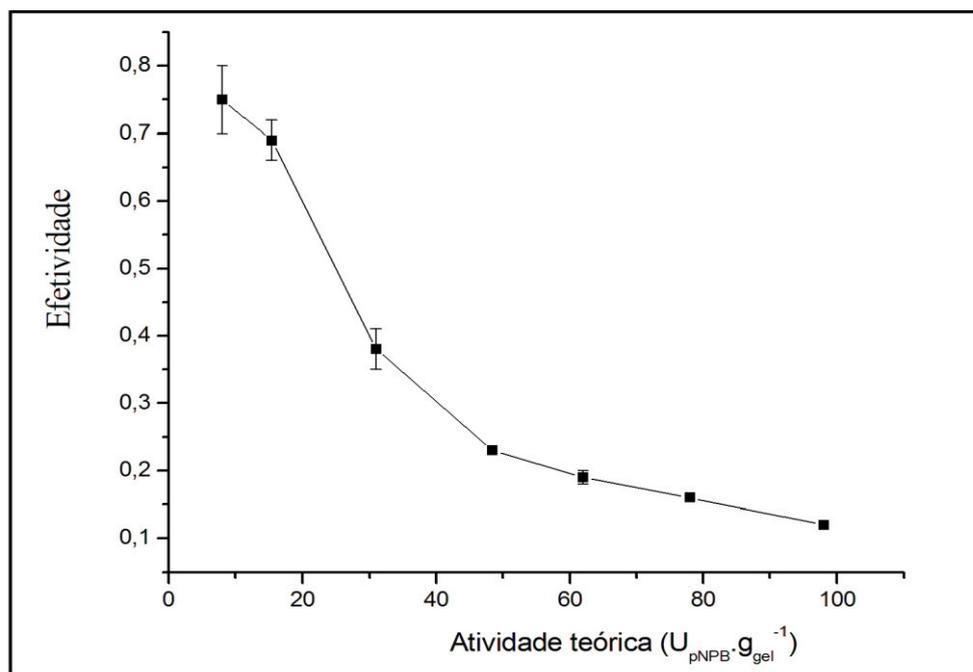
**Figura 39.** Influência da velocidade de agitação na atividade hidrolítica das lipases de *R. miehei* immobilizadas no suporte quitosana na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup>. Carga oferecida: 8 U.g<sup>-1</sup>

Os resultados mostrados na Figura 39 mostram que as atividades hidrolíticas dos derivados aumentaram progressivamente com o aumento da agitação atingindo um valor máximo quando a velocidade de agitação foi de 600 rpm.

Acima deste valor, uma ligeira diminuição nas atividades medidas foi observada, indicando que a resistência de transferência de massa externa pode ser negligenciada nestas velocidades de agitação. O aumento gradual da velocidade de agitação reduz a espessura da camada de filme que circunda a partícula do biocatalisador, reduzindo os efeitos de resistência de transferência de massa externa.

Neste trabalho, experimentos também foram efetuados no intuito de se avaliar a capacidade de adsorção das microesferas de quitosana e os efeitos de difusão de massa internos na atividade hidrolítica dos derivados. As cargas oferecidas nestes experimentos situaram-se no intervalo de 8-100 U.g<sup>-1</sup>. A velocidade de agitação foi mantida constante (600 rpm) em todos os experimentos de hidrólise do substrato utilizado.

Os resultados destes ensaios estão mostrados na Figura 40.



**Figura 40.** Efetividade ( $\eta$ ) x carga oferecida ( $U \cdot g^{-1}$ ) para lipases de *R. miehei* immobilizadas no suporte quitosana 2,5 % m.v<sup>-1</sup> na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup>. Efetividade foi calculada como a razão entre a atividade do derivado e atividade teórica.

Como mostrado na Figura 40, houve um decréscimo nos valores das efetividades calculadas à medida que quantidades crescentes de enzima foram oferecidas ao suporte a 25 °C.

Este fato pode ser explicado por restrições difusionais impostas pela grande quantidade de enzimas no interior dos poros do gel que podem formar barreiras efetivas limitando a difusão do substrato do seio da solução para o interior dos mesmos (Adriano, 2005)

Além deste fator, a dificuldade de acesso da molécula do substrato ao sítio ativo da enzima (impedimento estérico) que pode ter sido immobilizada com orientação errada, obstruindo o sítio ativo pode explicar o fenômeno observado (Silva *et al.*, 2012).

### 4.3. SÍNTESES DOS ÉSTERES BUTIRATO DE METILA E BUTIRATO DE ETILA

#### 4.3.1. Seleção do solvente

A natureza do solvente pode influenciar a velocidade de reações enzimáticas direta ou indiretamente. Os efeitos indiretos estão relacionados à partição de substratos e produtos, o deslocamento do equilíbrio químico da reação e fenômenos de transferência de massa entre as fases que compõem o sistema reacional. Já os efeitos diretos estão estritamente relacionados à interação entre o solvente e a enzima e geralmente são responsáveis pela atenuação da atividade ou inativação da proteína (Lima & Angnes, 1999).

A inativação da enzima pode ocorrer através da interação do solvente com regiões hidrofóbicas da enzima provocando a quebra de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio na sua estrutura nativa ou pela remoção da camada de água que envolve a enzima, considerada essencial para a manutenção de sua atividade catalítica (Dordick *et al.*, 1989, Macarie & Baratti, 2000; Wu *et al.*, 2002).

Desta forma, a seleção de um solvente apropriado que apresente um bom grau de compatibilidade com a enzima e os substratos da reação é de fundamental importância para que as reações de esterificação ocorram com elevada eficiência (Villeneuve, 2007).

Considerando estes fatores, um estudo inicial foi efetuado com a finalidade de selecionar o solvente mais adequado que minimizasse os efeitos negativos acima citados promovendo altas taxas de conversão para os ésteres estudados.

Neste estudo, a seleção dos solventes foi baseada nos valores de seus respectivos coeficientes de partição octanol/água ( $\log P$  ou  $\log P_{ow}$ ) que é uma medida do caráter hidrofóbico ( $\log P > 3,0$ ) ou hidrofílico ( $\log P < 2,0$ ) de um solvente.

De acordo com o procedimento descrito no item 3.10.1. , a Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para as sínteses dos ésteres butirato de metila e butirato de etila nos solventes selecionados nesta etapa inicial do estudo.

**Tabela 8. Influência do solvente nas taxas de conversão dos ésteres butirato de metila e butirato de etila. Condições: massa de biocatalisador(m): 100mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Temperatura(T)= 25°C; Razão molar [álcool]/[ácido]= 1:1;  $V_{\text{reação}} = 20\text{mL}$ ; Conc. dos substratos:  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ ; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t): 8h.**

Solvente	Log P	% de conversão	
		Butirato de metila	Butirato de etila
n-heptano	4,0	$30 \pm 1$	$85 \pm 2$
n-hexano	3,5	$20 \pm 1$	$82 \pm 2$
Ciclo-hexano	3,2	$19 \pm 1$	83
1,4-dioxano	-1,1	0	0

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que as maiores taxas de conversão para os dois ésteres estudados foram observadas quando o solvente n-heptano foi utilizado nas condições reacionais descritas. Para o butirato de etila, o rendimento de esterificação máximo foi de 85 % utilizando n-heptano como solvente e para o butirato de metila a maior taxa de conversão foi de 30 % utilizando o mesmo solvente.

Observando os dados apresentados na tabela 8, podemos constatar que nenhuma diferença significativa em termos de rendimento de esterificação foi evidenciada quando os solventes n-heptano (85 %), n-hexano (82 %) e ciclo-hexano (83 %) foram utilizados nas reações de síntese do butirato de etila. Estes resultados podem ser explicados em função da proximidade dos valores de log P para estes solventes, embora exista uma diferença estrutural entre o ciclohexano e os solventes n-heptano e n-hexano.

Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado na síntese do butirato de metila. Diferenças significativas podem ser observadas quando os mesmos solventes foram utilizados na síntese deste éster. O solvente n-heptano aumentou em 50 % o rendimento da reação quando comparado aos solventes n-hexano e ciclohexano.

Desta forma, pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos na síntese destes compostos, que a utilização de solventes com valores próximos de log P podem ou não fornecer graus de esterificação bastante divergentes. O butirato de metila e o butirato de etila de acordo com os dados apresentados não foram sintetizados na presença do solvente 1,4-dioxano, que devido a sua natureza altamente hidrofílica pode ter eliminado a camada de água presente na superfície da enzima, essencial para a sua atividade, distorcendo a sua conformação nativa e promovendo sua completa inativação.

Tomando por base estas considerações e os resultados obtidos nos experimentos realizados, dois solventes de natureza química similar (n-hexano e n-heptano) poderiam ser utilizados na síntese dos ésteres estudados.

Entretanto, o hexano possui baixo ponto de ebulição (p.e.= 68,5 °C) e alguns trabalhos demonstraram que em temperaturas superiores a 40 °C altas taxas de evaporação deste solvente no meio reacional foram observadas limitando a sua utilização (Castro *et al.*, 1997).

Diante do exposto, o solvente n-heptano (p.e.= 98,4 °C) foi selecionado para as demais etapas deste estudo.

#### **4.3.2. Efeito da temperatura nas reações de esterificação**

Em reações catalisadas por lipases, a temperatura influencia marcadamente a velocidade inicial da reação, posição de equilíbrio e a estabilidade da enzima podendo modificar também algumas das propriedades dos substratos e produtos da reação como estado de ionização e solubilidade (Mahapatra *et al.* 2009; Ozyilmaz & Gezer, 2010).

Reações conduzidas em temperaturas próximas a ambiente, na maioria dos casos, resultam em baixos rendimentos de reação. Porém, quando efetuadas em temperaturas mais elevadas, aumentam as taxas de reação resultando em aumentos significativos nos seus rendimentos (Lortie *et al.*, 1997).

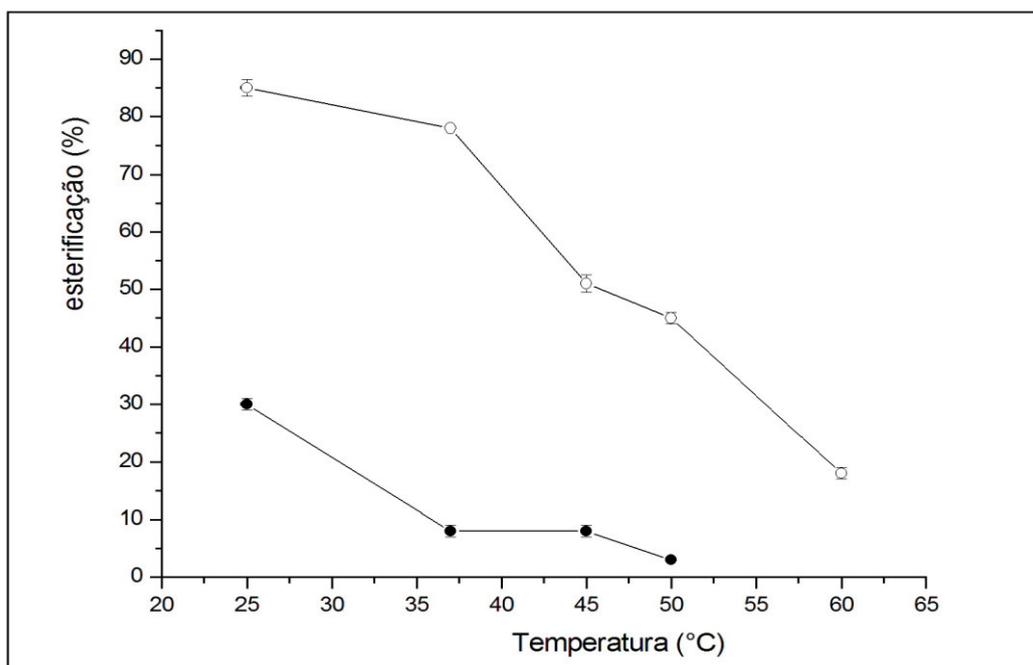
Apesar destes efeitos desejáveis, o aumento da temperatura de grande parte das reações de síntese catalisadas por lipases vem sempre acompanhado de um declínio na estabilidade das enzimas e na conversão de substratos (Foresti & Ferreira, 2007; Garcia *et al.*, 1999), embora trabalhos recentes tenham demonstrado que algumas lipases como a lipase de *C. antarctica* B (Novozyme 435) podem ser empregadas em reações de esterificação em temperaturas de 60-80 °C, sem perda significativa de sua atividade catalítica (Šabeder *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 1999).

Em adição a isto, a utilização de altas temperaturas pode ocasionar a perda do solvente e dos substratos por volatilização (Lu *et al.*, 2007; Sebrão *et al.*, 2007).

A temperatura ótima para uma dada conversão enzimática geralmente é influenciada por fatores como o tipo de enzima utilizada, as características do suporte empregado na imobilização destas enzimas e da natureza do solvente e dos substratos utilizados na reação (Güvenç *et al.*, 2002).

Entretanto, alguns autores sugerem que a temperatura máxima que pode ser utilizada nestas reações sem ocasionar a desnaturação das lipases deve estar situada em torno de 45 °C, pois acima deste valor a maioria das lipases sofre gradual desnaturação (Yong & Al-Duri, 1996).

De acordo com o procedimento experimental descrito no ítem 3.10.2., a Figura 41 apresenta os resultados obtidos para o estudo da influência da temperatura nas sínteses dos ésteres butirato de metila e butirato de etila em n-heptano.



**Figura 41. Estudo do efeito da temperatura na síntese dos ésteres butirato de metila (●) e butirato de etila (○). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; carga oferecida =  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador (m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido] = 1:1; Conc. dos substratos:  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ ; Agitação = 150 rpm; Tempo de reação(t): 8h.**

Os resultados apresentados na Figura 41 evidenciam que as maiores taxas de conversão, para os dois ésteres, contrariando as afirmações comentadas inicialmente, foram obtidas à temperatura de 25 °C. Nas condições estudadas, o butirato de metila apresentou um rendimento de reação de 30 % e o butirato de etila apresentou uma taxa de conversão de 85 %.

Em temperaturas acima deste valor, as reações de esterificação experimentaram um declínio em seus rendimentos. Temperaturas superiores a 45 °C reduziram acentuadamente os rendimentos para ambas as reações, muito provavelmente devido a desnaturação térmica das lipases.

O aumento da temperatura pode afetar os vários equilíbrios envolvidos em reações de esterificação notadamente os equilíbrios de ligação enzima-substratos e enzima-éster envolvidos na reação. Além disso, exerce efeito na solubilidade e partição do ácido na interface microaquosa enzima-água-solvente. Altas temperaturas também podem aumentar a dissociação do ácido utilizado na reação. Desta forma, enquanto a constante de equilíbrio de ligação decresce com o aumento da temperatura, a dissociação e a solubilidade do ácido aumentam, tornando menos favorável a reação de esterificação (Krishna *et al.*, 1999).

Vários trabalhos reportados na literatura indicam que baixas temperaturas de reação favorecem a síntese de ésteres de ácido butírico catalisados por lipases.

Shieh *et al.* (1996) mostraram que altas taxas de obtenção na síntese por transesterificação do éster butirato de geranila foram conseguidas quando a temperatura do meio reacional foi fixada em 35°C utilizando lípase de *Candida rugosa*.

Da mesma forma, butirato de isoamila foi sintetizado com altos rendimentos de esterificação a 30 °C pela enzima comercial Lipozyme IM-20 (lipase de *Rhizomucor miehei*) (Krishna *et al.*, 1999).

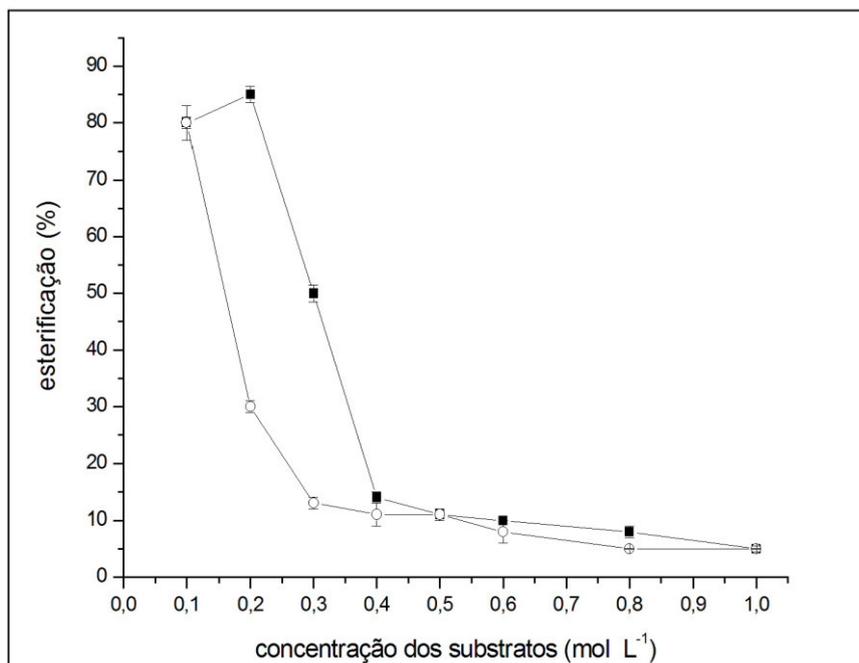
Butirato de etila foi sintetizado com 72,9 % de rendimento a 34 °C utilizando a enzima comercial Novozym 435 (lipase de *C. Antarctica*) em n-heptano (Rodriguez-Nogales *et al.*, 2005).

Levando-se em consideração os resultados apresentados neste estudo, a temperatura de 25 °C foi selecionada para os estudos posteriores de otimização das sínteses destes dois ésteres.

#### **4.3.3. Influência da concentração inicial dos substratos nas reações de esterificação**

No intuito de verificar o aumento ou diminuição das taxas de conversão dos ésteres estudados em função das concentrações dos substratos utilizados nas reações de esterificação, experimentos foram executados variando-se as concentrações de misturas equimolares dos substratos utilizados. As concentrações variaram de 0,1-1 mol L<sup>-1</sup>. O solvente utilizado nestes experimentos foi o n-heptano e as reações foram conduzidas a 25 °C sob agitação de 150 rpm

A Figura 42 apresenta os resultados obtidos para os dois ésteres nas condições experimentais descritas após 8 h de reação.



**Figura 42.** Influência da concentração dos substratos nas reações de síntese do butirato de metila (○) butirato de etila (■). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; carga oferecida =  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador (m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido] = 1:1; Agitação = 150 rpm; Tempo de reação (t): 8h.

Os resultados apresentados na Figura 42 mostram que a concentração dos substratos exerce um efeito significativo nas taxas de esterificação para ambos os ésteres. Para o butirato de metila (em vermelho no gráfico) a máxima taxa de conversão (80 %) foi verificada quando a concentração dos substratos foi de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Concentrações equimolares dos substratos acima deste valor promoveram uma queda bastante acentuada nos rendimentos de esterificação.

Já para o butirato de etila, após um ligeiro incremento no rendimento de reação no intervalo de concentração de substratos de  $0,1\text{-}0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , as taxas de conversão para concentrações de substratos superiores a  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  foram reduzidas sensivelmente. A maior taxa de conversão para este composto foi observada quando a concentração dos substratos foi de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (85 %).

Uma das possíveis explicações para os resultados observados é que na presença de altas concentrações dos substratos (ácido e álcool), a polaridade do meio é alterada, tornando a fase orgânica mais hidrofílica. Como consequência, os coeficientes de partição tornam-se menos favoráveis aos ésteres formados (mais hidrofóbicos), deslocando o equilíbrio da reação no sentido contrário ao da formação destes compostos (Romero *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados na Figura 42 sugerem também que um ou os dois substratos utilizados nas reações podem exercer efeitos inibitórios na função catalítica da enzima (Krishna *et al.*, 2001).

#### **4.3.4. Estudos de otimização da razão molar álcool/ácido na síntese dos ésteres**

A razão molar entre os substratos é um dos parâmetros que mais influenciam o rendimento de reações de esterificação catalisadas por lipases. Uma vez que a reação é reversível, o aumento da concentração de um dos reagentes pode deslocar o equilíbrio no sentido da formação de produtos, resultando em altas conversões ou por efeitos de inibição tanto dos substratos como dos produtos da reação podem diminuir drasticamente o rendimento das mesmas (Belafi-Bakog *et al.*, 2004, Ceni *et al.*, 2010).

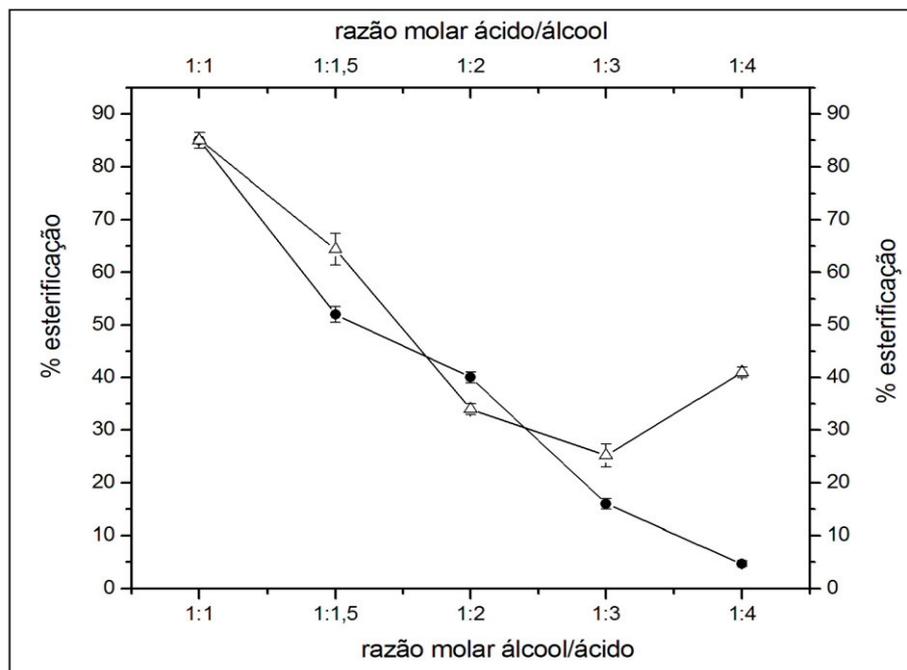
Neste sentido, no intuito de avaliar possíveis efeitos inibitórios causados pelos substratos utilizados, experimentos foram conduzidos fixando-se a concentração dos álcoois utilizados variando-se a concentração do ácido butírico.

Em outra série de experimentos, a concentração do ácido butírico foi mantida constante e concentrações crescentes de etanol e metanol foram adicionadas ao sistema reacional.

Para o butirato de etila, na primeira série de experimentos a concentração de etanol foi fixada em  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e as concentrações de ácido butírico foram acrescentadas no intervalo de  $0,2-0,8 \text{ mol L}^{-1}$ .

Para o mesmo éster, uma segunda série de experimentos foi efetuada desta vez mantendo-se a concentração de ácido butírico constante em  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e adicionando concentrações crescentes do álcool também no intervalo de  $0,2-0,8 \text{ mol L}^{-1}$ .

Os resultados para a síntese do butirato de etila estão mostrados na Figura 43.



**Figura 43. Influência da razão molar álcool/ácido no rendimento da síntese do butirato de etila.**  
**Condições:** Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador(m): 200 mg;  $T = 25$  °C; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t): 8h.  
**Legenda:** concentração de ácido (●); concentração de álcool (△)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 43 a máxima conversão em éster (85 %) foi observada quando a razão molar álcool/ácido foi 1:1 para concentrações de ácido butírico e etanol de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

Os resultados apresentados mostram também que mantendo-se uma concentração fixa de etanol ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ), concentrações crescentes de ácido acima da concentração inicialmente utilizada ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) promoveram uma grande inibição da atividade enzimática. Quando a concentração de ácido adicionada foi de  $0,8 \text{ mol L}^{-1}$  (razão molar álcool/ácido = 1:4) o rendimento da reação foi de 5 %.

A presença de ácido em excesso pode alterar o pH do microambiente aquoso em torno da enzima causando a hidrólise do éster formado ou ocasionando a diminuição na atividade da enzima (Krishna *et al.*, 2001).

Uma série de trabalhos sugere que alguns ácidos de cadeia curta como o ácido acético e butírico podem se ligar ao resíduo de serina (Ser) no sítio catalítico da lipases promovendo a inibição de sua atividade, diminuindo o rendimento das reações (Langrand *et al.*, 1990; Sebrão *et.al*, 2007).

Em reações de esterificação mediadas por lipases, a primeira etapa da reação consiste na ligação preferencial da molécula do substrato ácido no centro ativo da

enzima. Esta transferência acila geralmente é afetada pela concentração de álcool livre disponível (Pires-Cabral *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 36, a máxima taxa de esterificação (85 %) foi observada a uma razão molar álcool:ácido de 1:1, provavelmente na situação em que a máxima transferência acila ocorreu. Para razões molares superiores a este valor foi observado um decréscimo acentuado nos percentuais de conversão.

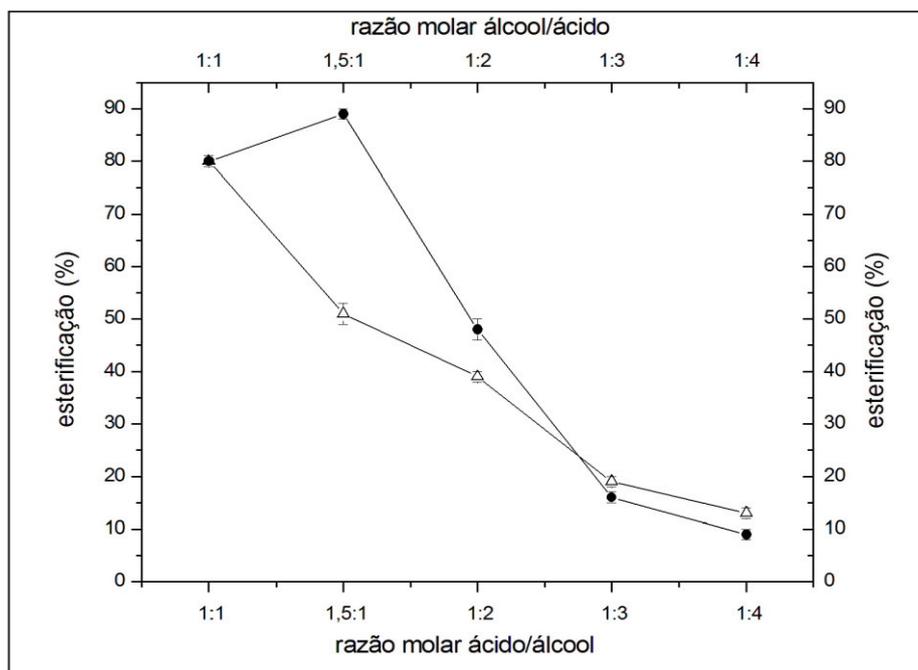
Em altas razões molares, o maior incremento na concentração de etanol pode promover a ligação das moléculas deste substrato com a lipase, durante a primeira etapa da reação, competindo com o ácido, tendo como consequência uma diminuição da quantidade de ácido butírico ligado à enzima. Nesta situação, um decréscimo nas taxas de reação irá ocorrer, uma vez que a reação estará limitada pela quantidade de ácido na vizinhança da enzima. Também é possível evidenciar que concentrações de etanol acima de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , onde a máxima conversão também foi observada (85 %), promoveram inibição da atividade enzimática, porém em menor extensão quando comparada ao efeito inibidor do ácido utilizado nos experimentos (destacado em azul no gráfico).

Além destes fatores, álcoois de baixo peso molecular, como o metanol ou etanol, podem ser acumulados no microambiente aquoso da enzima, atingindo uma concentração suficientemente elevada para induzir a desnaturação da proteína bloqueando a porção nucleofílica do seu sítio ativo (Lane *et. al.*, 1987; Zaidi *et. al.*, 2002). Outro possível mecanismo de inativação é que estes substratos, em função de suas altas polaridades, podem remover a camada de água necessária para a manutenção da integridade estrutural da enzima, distorcendo a sua estrutura tridimensional (Paiva *et. al.*, 2000).

Em uma segunda série de experimentos, o efeito da razão molar álcool/ácido foi avaliado também na síntese do butirato de metila.

Inicialmente, a concentração de ácido butírico foi fixada em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e a concentração de metanol foi adicionada no intervalo de concentrações de  $0,1-0,8 \text{ mol L}^{-1}$ . Em outro experimento, a concentração de metanol foi mantida constante em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e a concentração de ácido butírico variou no intervalo de  $0,1-0,8 \text{ mol L}^{-1}$ .

Os resultados para a otimização da razão molar álcool/ácido para o butirato de metila estão mostrados na Figura 44.



**Figura 44. Influência da razão molar álcool/ácido no rendimento da síntese do butirato de metila.** Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida= $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador(m): 100 mg;  $T = 25$  °C; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t): 8h.  
Legenda: concentração de ácido (Δ); concentração de álcool (●)

Os resultados apresentados na Figura 44 mostram que em uma concentração fixa de álcool, concentrações adicionais de ácido acima de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (80 % de conversão), promoveram uma redução bastante significativa nos rendimentos calculados. Para uma razão molar álcool/ácido 1:4, o rendimento de esterificação foi de 13 %. Os resultados comprovam como no caso anterior, a grande inibição da atividade enzimática ocasionada pelo substrato ácido.

Na outra série de experimentos, os resultados mostrados na figura 44 mostram que, em uma razão molar álcool/ácido de 1,5:1, o rendimento máximo para esta reação foi alcançado (89 %). Razões molares superiores a 1,5:1 promoveram uma diminuição bastante acentuada nos rendimentos de reação observados. Para uma razão molar álcool:ácido de 4:1, o rendimento da reação foi de 9 %.

As mesmas considerações explicitadas anteriormente podem ser utilizadas para explicar os resultados obtidos para o butirato de metila.

Entretanto, pode-se observar, pelos resultados apresentados nas Figuras 43 e 44, que o metanol promove uma maior inibição da atividade enzimática quando comparado ao etanol.

Em função dos resultados obtidos, para a síntese do butirato de etila a razão molar álcool/ácido 1:1 foi utilizada nos experimentos subsequentes.

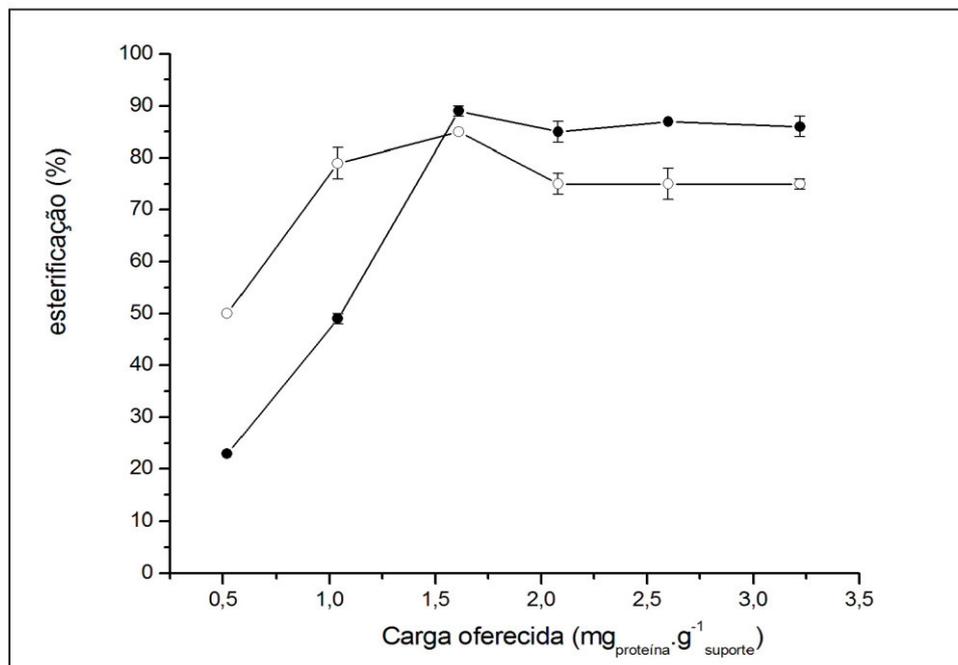
Para o butirato de metila, a razão molar álcool/ácido 1,5:1 foi selecionada para a continuidade dos experimentos de otimização das sínteses estudadas.

#### **4.3.5. Influência da quantidade de enzima no rendimento da esterificação**

Geralmente, as taxas de conversão em uma reação aumentam à medida que quantidades crescentes do biocatalisador são adicionadas ao meio de reação (Varma & Madras, 2008; Yadav & Devi, 2004). O aumento da quantidade de enzimas no meio reacional também pode promover uma diminuição acentuada nos tempos de reação, diminuindo os custos dos processos (Hills, 2003).

Portanto, para uma dada reação específica e para cada tipo de suporte empregado, o estabelecimento de uma quantidade ótima do biocatalisador necessita ser determinada experimentalmente (Ghamgui *et. al.*, 2006).

Diante do exposto, no intuito de se obter altas taxas de reação nas sínteses dos ésteres estudados em tempos curtos de reação, várias cargas enzimáticas variando no intervalo de 0,52 a 3,22  $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  (16-100  $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) foram oferecidas ao suporte. Em seguida, cada derivado obtido foi utilizado na síntese do butirato de metila e butirato de etila e os rendimentos de reação foram calculados após 8h. A Figura 45 apresenta os resultados obtidos para cada éster nestes ensaios.



**Figura 45. Influência da quantidade de enzima nos rendimentos das reações de síntese do butirato de metila (●) e butirato de etila (○). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20$  mL; massa de biocatalisador(m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila = 1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação= 150 rpm; Tempo de reação(t)= 8h.**

Os resultados mostrados na Figura 45 evidenciam que os rendimentos de síntese para cada éster aumentam quase linearmente à medida que quantidades crescentes de enzima no intervalo de 0,52 a 1,61  $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  ( $16 - 50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) são oferecidas ao suporte quitosana.

Os rendimentos máximos de reação para os dois ésteres foram observados quando a carga enzimática oferecida foi de 1,61  $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  ( $50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

A partir deste valor, cargas adicionais oferecidas ao suporte utilizado não promoveram mudanças significativas nos rendimentos obtidos que, após uma leve diminuição, permaneceram praticamente inalterados, provavelmente devido a restrições difusionais dos substratos ao sítio ativo das enzimas localizadas no interior do biocatalisador (Châabouni, 2006). Neste caso, os sítios ativos de moléculas adicionais da enzima não ficam expostos aos substratos permanecendo no interior das partículas dos biocatalisadores sem contribuir significativamente para a reação (Gandhi *et al.*, 1995).

Em função dos resultados obtidos, a carga enzimática utilizada nos experimentos subsequentes foi a de 1,61  $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  ( $50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

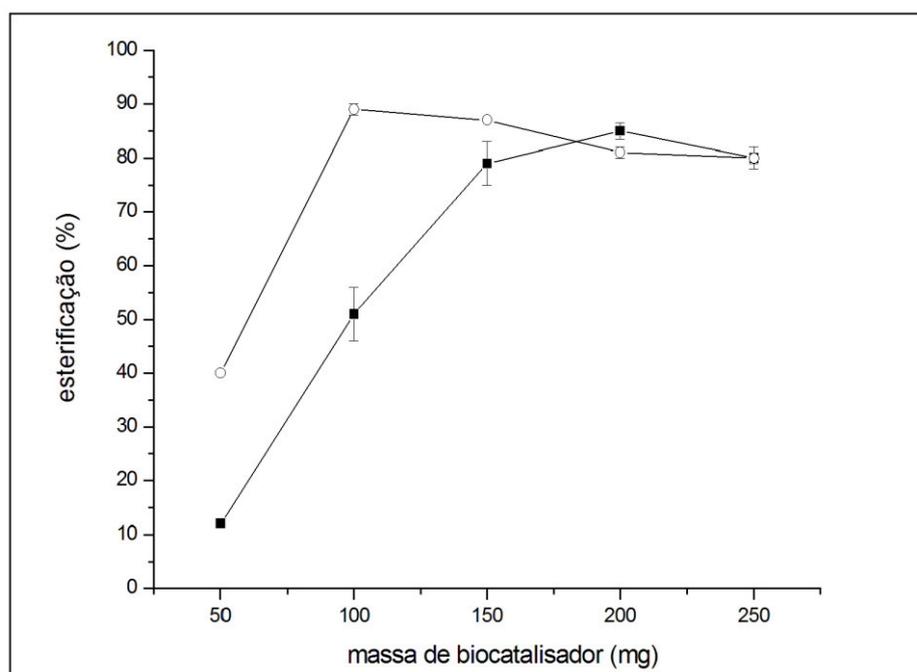
#### 4.3.6. Influência da massa de biocatalisador no rendimento de esterificação

Em uma reação catalisada por enzimas imobilizadas em um suporte, o aumento da quantidade de enzima poderá, dentro de um certo limite, afetar positivamente as taxas de reação (Mahapatra, 2009).

Neste estudo, a massa do biocatalisador adicionada ao sistema reacional em ambos os casos variou de 50-250 mg.

Os resultados destes experimentos apresentados na Figura 46 mostram que para os dois ésteres quantidades crescentes de massa do biocatalisador promoveram um aumento nas taxas de conversão, porém até certo limite.

Para o butirato de metila a taxa máxima de conversão (89 %) foi conseguida quando 100 mg do biocatalisador foi adicionado ao sistema reacional. Acima deste valor, uma pequena redução dos rendimentos foi observada sendo que os mesmos mantiveram-se constantes quando quantidades acima de 150 mg foram adicionadas no meio reacional.



**Figura 46.** Influência da massa de biocatalisador no rendimento das sínteses do butirato de metila (○) e do butirato de etila (■). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; carga oferecida =  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila = 1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação = 150 rpm; Tempo de reação (t) = 8h.

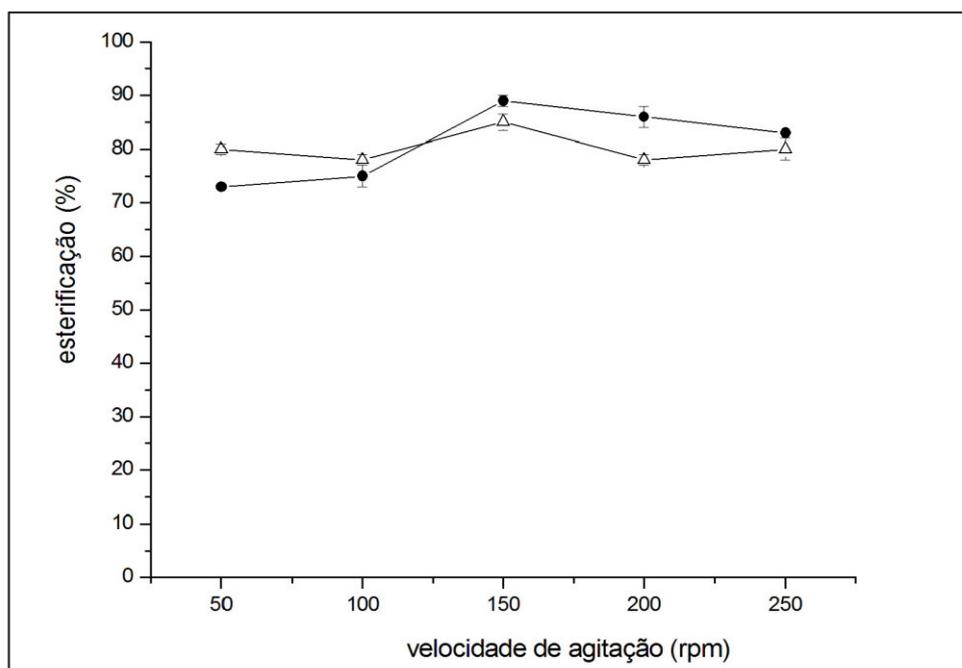
Para o butirato de etila, a máxima conversão (85 %) foi observada quando 200 mg do biocatalisador foram adicionadas na reação. Quantidades superiores a este valor produziram uma diminuição no rendimento desta reação.

Um grande aumento na quantidade de biocatalisador utilizado nas reações pode levar a uma diminuição na atividade de síntese, que pode ser ocasionada pela distribuição aleatória da enzima no suporte resultando em um menor contato entre a enzima e o substrato (Chengliang *et al.*, 2011).

A partir dos resultados obtidos nestes experimentos, a massa de biocatalisador utilizado nos experimentos seguintes foram 100 mg para o butirato de metila e 200 mg para o butirato de etila.

#### 4.3.7. Influência da velocidade de agitação no rendimento de esterificação

No intuito de observar possíveis limitações de transferência de massa externa, experimentos foram conduzidos em diferentes graus de velocidade de agitação que variaram de 50 a 250 rpm. Os resultados obtidos nestes experimentos estão mostrados na Figura 47.



**Figura 47. Influência da velocidade de agitação no rendimento das sínteses do butirato de metila (●) e do butirato de etila (Δ). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; carga oferecida =  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador (m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila = 1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação = 150 rpm; Tempo de reação (t) = 8h.**

Podemos observar na Figura 47 que a conversão dos substratos para os dois ésteres estudados aumentou progressivamente com o aumento da velocidade de agitação atingindo um valor máximo a 150 rpm, após o qual, as taxas de conversão não sofreram alterações acentuadas.

Com o aumento da velocidade de agitação a espessura da camada do filme ao redor das partículas do biocatalisador diminui tendo como consequência uma diminuição na resistência de transferência de massa.

Em função dos resultados obtidos, a velocidade de agitação utilizada nos demais experimentos foi 150 rpm.

#### **4.3.8. Influência da quantidade inicial de água no rendimento de esterificação**

A quantidade de água presente na superfície de algumas enzimas como as lipases contribui para a manutenção de sua integridade estrutural, limita a solubilidade de substratos hidrofóbicos na vizinhança da enzima e afeta o equilíbrio da reação sendo considerado um fator crítico para o seu desempenho em sistemas orgânicos (Klibanov, 2001)

As lipases exercem sua atividade catalítica com alta eficiência na presença de uma interface aquosa-orgânica e, desta forma, mesmo em meios constituídos basicamente por substratos dissolvidos em solventes hidrofóbicos, uma pequena quantidade de água é requerida para manter a conformação ativa da enzima e para facilitar a difusão dos reagentes (Krishna, 2002).

A água mantém a estrutura ativa das lipases inalterada, aumentando a mobilidade e a flexibilidade dos seus sítios ativos. Por outro lado, também participa de reações de desamidação, hidrólise de peptídeos e decomposição da cistina que levam à inativação irreversível da enzima (Lima & Angnes, 1999).

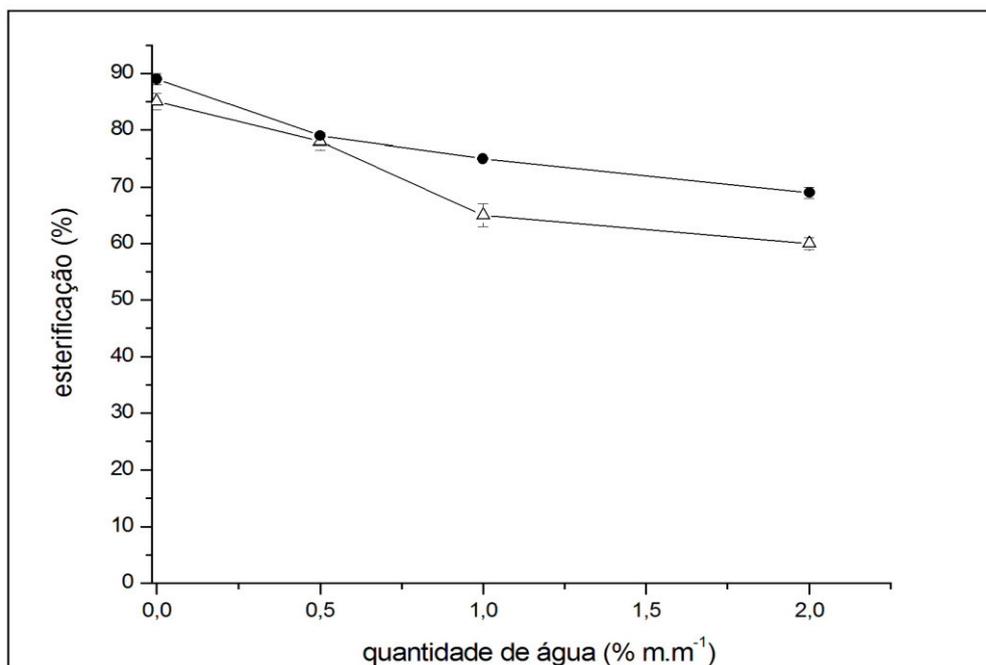
A maioria das lipases requer apenas uma pequena quantidade de água para manter a sua conformação ativa e promover reações de esterificação em sistemas orgânicos com alta eficiência (Dordick, 1989). Contudo, estes valores podem variar de acordo com as características das lipases utilizadas na reação e das propriedades do solvente utilizado, geralmente apresentando um valor ótimo ou crítico para cada enzima (Grunwald, 2009).

Quantidades excessivas de água presentes no meio reacional acima do valor crítico provocam podem também deslocar o equilíbrio das reações no sentido da hidrólise dos ésteres formados (Villeneuve, 2007).

O efeito da concentração inicial de água na atividade enzimática foi examinado adicionando água ao sistema reacional variando no intervalo de 0,5 a 2% em relação a

massa total dos reagentes sendo as taxas de conversão para os dois ésteres medidas após 8h de reação, mantendo-se as demais condições constantes.

A Figura 48 mostra os resultados obtidos nestes experimentos. Para ambos os ésteres, as taxas de conversão decresceram com o aumento da quantidade de água adicionada ao meio reacional. Os maiores rendimentos foram observados na ausência de água (89 % para o butirato de metila e 85 % para o butirato de etila).



**Figura 48. Influência da quantidade inicial de água no rendimento das sínteses do butirato de metila (●) e do butirato de etila (Δ). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20$  mL; carga oferecida =  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador(m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila = 1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação = 150 rpm; Tempo de reação(t) = 8h.**

Desta forma, pode-se concluir que a quantidade de água inicialmente adsorvida no suporte quitosana pode ser considerada suficiente para a enzima exibir sua máxima atividade na síntese destes dois ésteres em particular.

Quantidades adicionais de água podem ter aumentado acentuadamente o grau de hidratação do suporte implicando em um aumento da espessura da camada de filme em torno da enzima. Este fenômeno pode ter resultado em problemas de difusão dos substratos para o sítio ativo da enzima desfavorecendo as reações de esterificação.

Resultados similares foram reportados por Gamgui et. al. (2004) na síntese enzimática do oleato de butila.

Sendo assim, os demais experimentos de síntese destes dois ésteres foram efetuados na ausência de água.

#### 4.3.9. Influência da adição de agente dessecante no rendimento de esterificação

Um importante aspecto a ser considerado em reações de esterificação é que a água também é um produto do processo e o seu acúmulo no meio reacional, especialmente quando estas requerem tempos longos para atingir o equilíbrio termodinâmico, pode causar uma progressiva diminuição nos rendimentos das reações (Krishna *et al.*, 2001; Longo & Sanromán, 2006).

Sendo assim, no curso da reação, a água formada no processo, de acordo com alguns trabalhos, deve ser permanentemente removida para que o valor de sua atividade termodinâmica ( $a_w$ ) seja mantido constante e estes inconvenientes sejam pormenorizados (Yadav & Lathi, 2003).

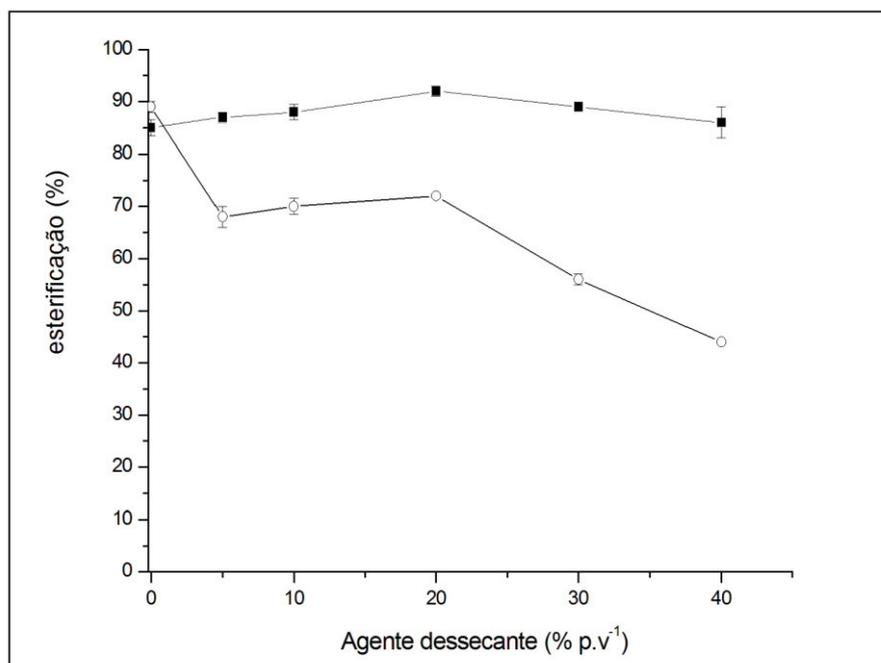
A adição de sais hidratados como o  $\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Wehtje *et al.*, 1997), a utilização de técnicas de pervaporação (Keehoon *et al.*, 2006), circulação da mistura reacional através de uma coluna preenchida com materiais adsorventes como celite e algumas zeólitas (Fontes *et al.*, 2002; Peres *et al.*, 2005), destilação azeotrópica (Gubicza *et al.*, 2000) ou mesmo a adição de pequenas quantidades de solventes polares como a acetona ou 2-metil-2-propanol (Colombié *et al.*, 1998) tem sido recursos empregados para o controle da atividade da água nestes processos.

Além dos métodos acima mencionados, técnicas de pervaporação (processo de separação em que um dos componentes de uma mistura líquida passa preferencialmente através de uma membrana polimérica por difusão diferenciada para o outro lado, sendo o permeado, obtido na fase vapor) também tem encontrado utilização na remoção de água em sistemas reacionais utilizados na síntese e separação de alguns ésteres (Isci *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2005).

Neste contexto, no intuito de observar os efeitos produzidos pela remoção de água no sistema reacional utilizado na síntese do butirato de metila e butirato de etila, Peneira Molecular 4A previamente ativada a  $300^\circ\text{C}$  por 24 h foi utilizada como agente dessecante sendo adicionada ao meio reacional no intervalo de 5 a 40 % (p.v<sup>-1</sup>). Os resultados destes experimentos estão mostrados na Figura 49.

Para o butirato de etila quantidades crescentes do agente dessecante aumentaram o rendimento da reação de síntese deste composto. O rendimento máximo (92 %) foi observado na presença de 20 % (p.v<sup>-1</sup>) do agente dessecante. Para quantidades acima deste valor, uma diminuição do rendimento desta reação foi observada.

Uma possível explicação para este fenômeno é que em quantidades maiores de agente dessecante talvez possa ocorrer à remoção da camada essencial de água que circunda a enzima, provocando a sua inativação.



**Figura 49. Influência da quantidade de agente dessecante no rendimento das sínteses do butirato de metila (O) e do butirato de etila (■). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; carga oferecida =  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador(m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila=1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação = 150 rpm; Tempo de reação(t)= 8h.**

Para o butirato de metila, a presença do agente dessecante na reação produziu um efeito contrário ao observado na síntese do butirato de etila. Quantidades crescentes de peneira molecular 4A promoveram reduções significativas nas taxas de conversão em éster. Para 40 % (p.v<sup>-1</sup>), o rendimento que na ausência deste dessecante foi de 89 %, foi reduzido para 46 %.

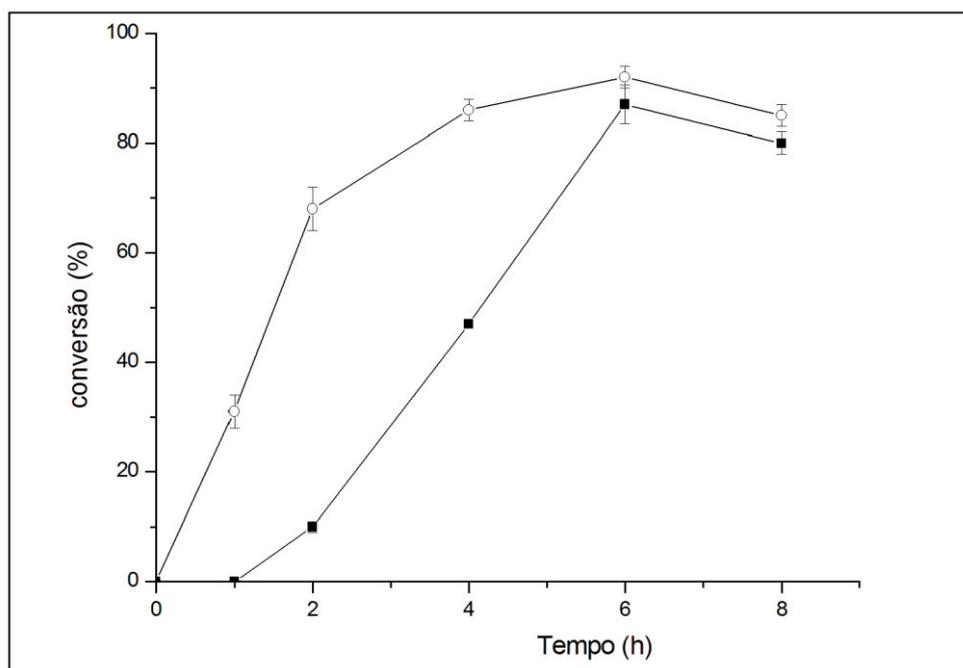
Desta forma, para o butirato de etila os experimentos foram conduzidos na presença de 20% (p.v<sup>-1</sup>) do agente dessecante e para o butirato de metila as reações de síntese foram efetuadas na ausência da peneira molecular 4A.

#### 4.3.10. Acompanhamento do tempo de reação na síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila

Geralmente, um processo biocatalítico para ser utilizado em larga escala deve aliar altas taxas de conversão em tempos relativamente curtos de reação, utilizando a menor quantidade de enzima possível (Martins *et al.*, 2011).

O tempo de reação, neste contexto, pode ser considerado um importante indicador da efetividade e desempenho econômico do processo.

Neste sentido, dentro dos parâmetros até aqui otimizados, um acompanhamento cinético das reações estudadas foi efetuado. As taxas de conversão foram determinadas em tempos de reação pré-estabelecidos e uma curva tempo *vs.* percentual de conversão foi obtida para cada reação. Os resultados destes acompanhamentos estão apresentados na Figura 50.



**Figura 50. Acompanhamento das sínteses dos ésteres butirato de metila (■) e do butirato de etila (○). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; carga oferecida =  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador (m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila = 1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação = 150 rpm; Agente dessecante : butirato de etila = 20% p.v<sup>-1</sup>, butirato de metila = 0%.**

O perfil cinético traçado para a síntese dos ésteres estudados apresentado na figura 50 mostra que para ambos os casos a máxima taxa de conversão foi obtida em 6h de reação. Para tempos superiores a 6h, as reações estudadas sofreram uma pequena diminuição em seus rendimentos muito provavelmente pela formação de água no meio reacional que desloca o equilíbrio no sentido oposto ao da formação dos produtos.

#### **4.3.11. Análise dos produtos das reações de esterificação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Para avaliar qualitativamente a geração dos ésteres estudados no meio reacional, foram efetuadas análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Inicialmente foram obtidos espectros IV de padrões puros de cada éster dissolvidos no solvente utilizado nas reações.

Ao término das reações, alíquotas do meio reacional foram retiradas e, em seguida, espectros IV foram obtidos sem tratamento prévio das amostras.

Os espectros obtidos para os dois ésteres também foram comparados com espectros IV disponíveis na literatura.

De acordo com o procedimento experimental descrito, as Figuras 51 a 54 mostram os resultados obtidos nestes experimentos.

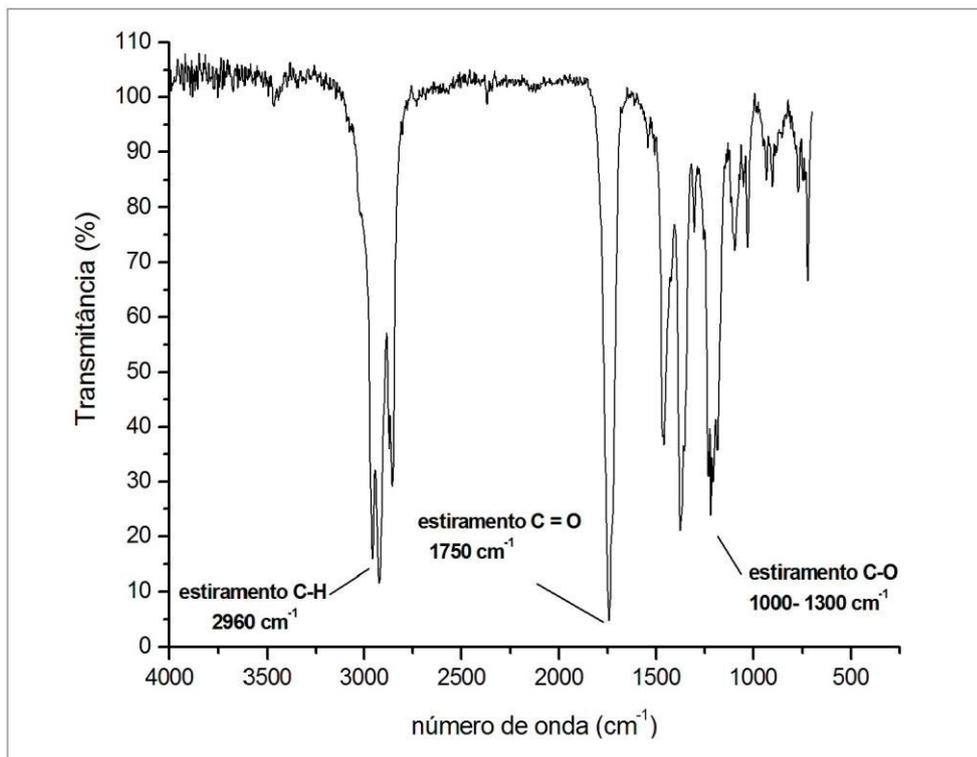


Figura 51 . Espectro na região do infravermelho do padrão butirato de etila em n-heptano.

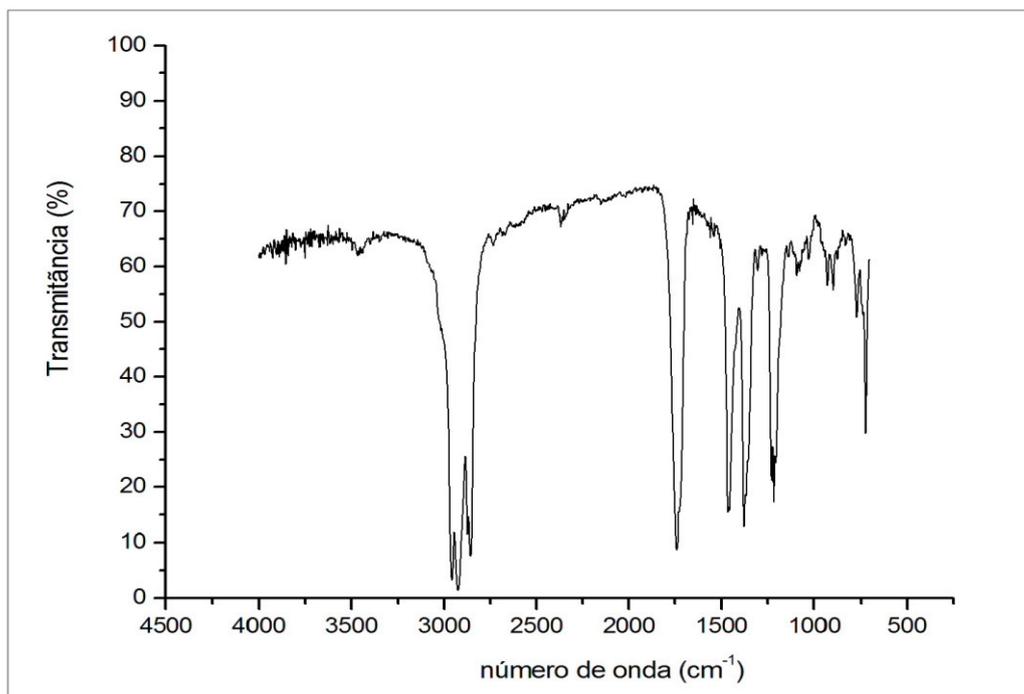


Figura 52 . Espectro na região do infravermelho da mistura reacional (síntese do butirato de etila) após 6h de reação.

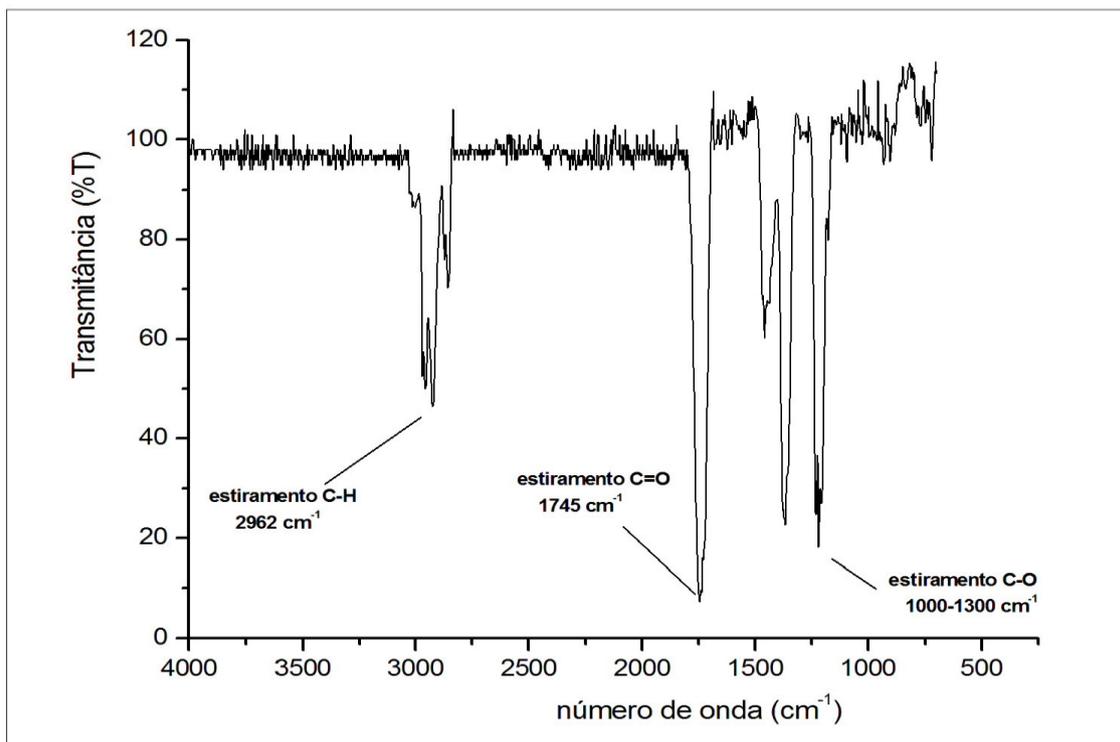


Figura 53 . Espectro na região do infravermelho do padrão butirato de metila em n-heptano.

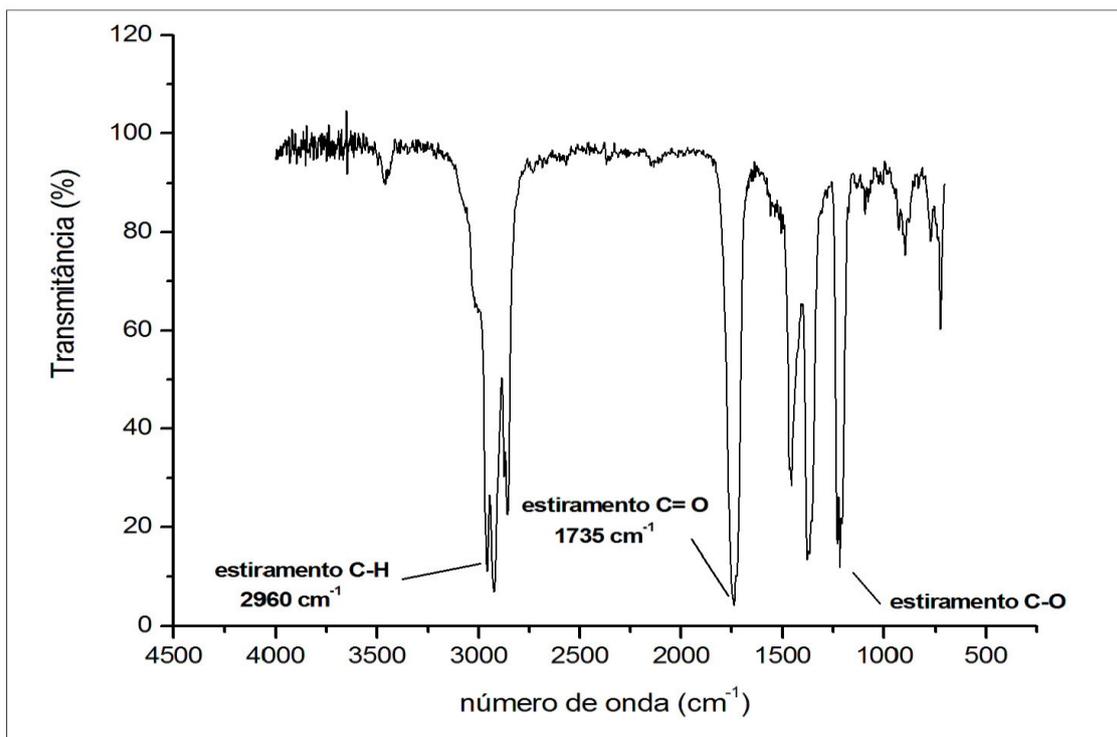


Figura 54 . Espectro na região do infravermelho da mistura reacional (síntese do butirato de metila) após 6h de reação.

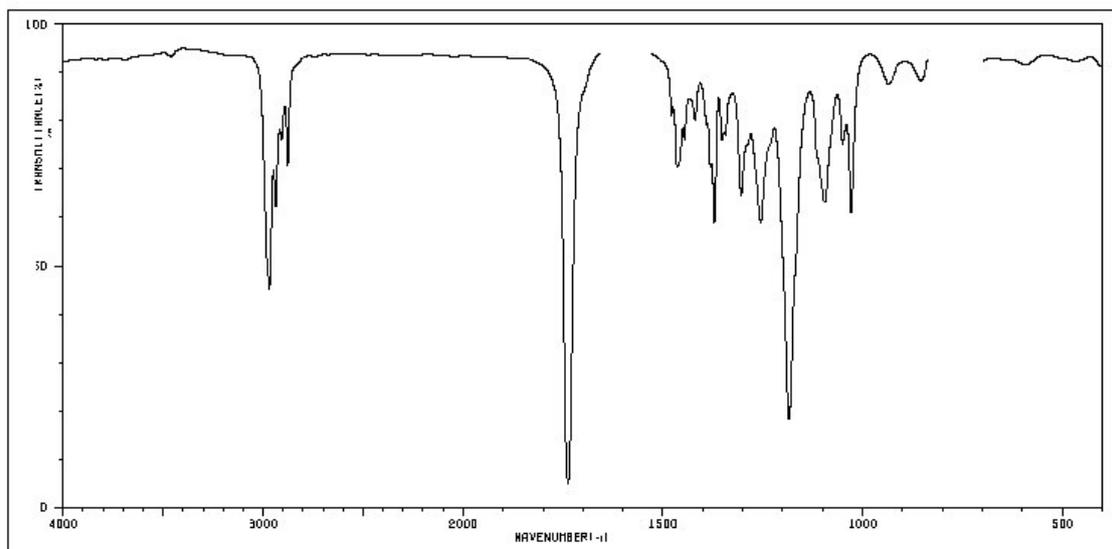


Figura 55. Espectro na região do infravermelho do butirato de etila em  $\text{CCl}_4$   
(Fonte: [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi), acessado em 20/11/12).

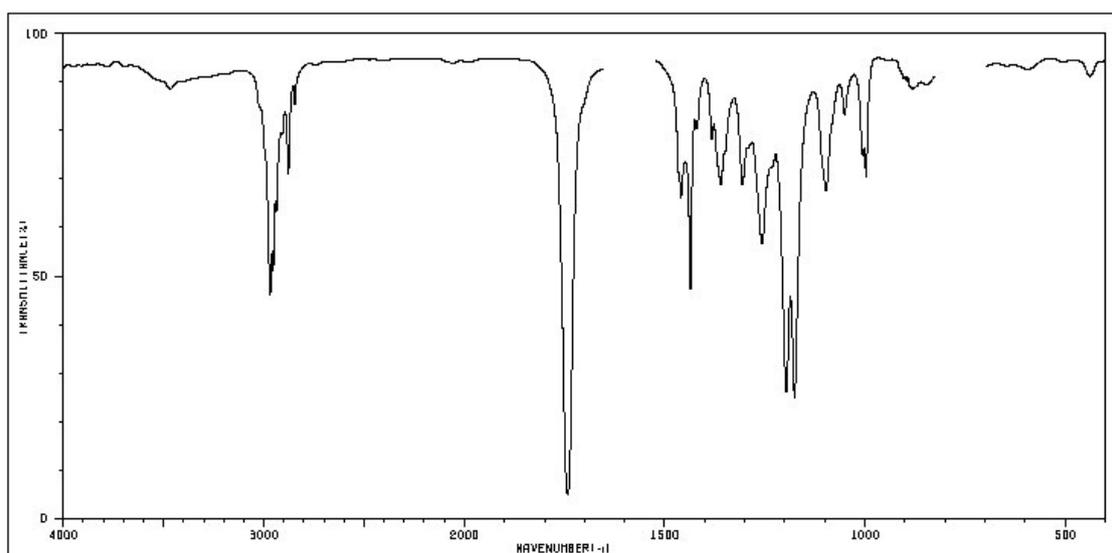


Figura 56. Espectro na região do infravermelho do butirato de metila em  $\text{CCl}_4$ .  
(Fonte: [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi), acessado em 20/11/12).

Pela análise dos espectros IV obtidos para os padrões dos ésteres butirato de etila e butirato de metila em n-heptano nas Figuras 51 e 53 observa-se, em ambos os casos, uma banda na região em torno de  $3000\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramentos de grupos C-H (alquila), uma banda de absorção intensa na região entre  $1735\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$  do grupo carbonila de ésteres alifáticos e duas ou mais bandas situadas na faixa de  $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento C-O.

As mesmas bandas características observadas nos espectros IV obtidos para os padrões puros também foram observadas nos espectros na região do infravermelho obtidos para as misturas reacionais após 6 horas de reação (Figuras 52 e 54).

Além disto, fazendo-se uma comparação entre os espectros obtidos experimentalmente e os espectros obtidos na literatura (Figuras 55 e 56), podemos observar estas bandas características para os ésteres estudados, o que garante a confirmação das sínteses efetuadas.

#### 4.3.12. Determinação dos parâmetros otimizados para a síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila

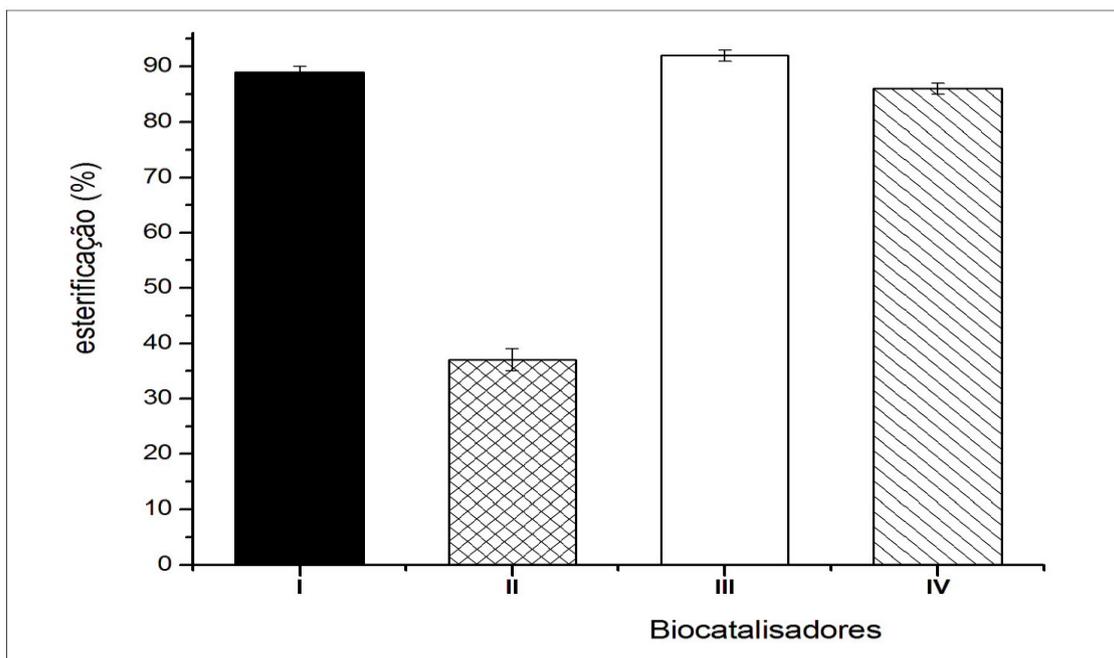
A partir dos resultados obtidos em todos os experimentos efetuados, os parâmetros otimizados para a síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila estão colocados na Tabela 9.

**Tabela 9. Parâmetros otimizados para a síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila.**

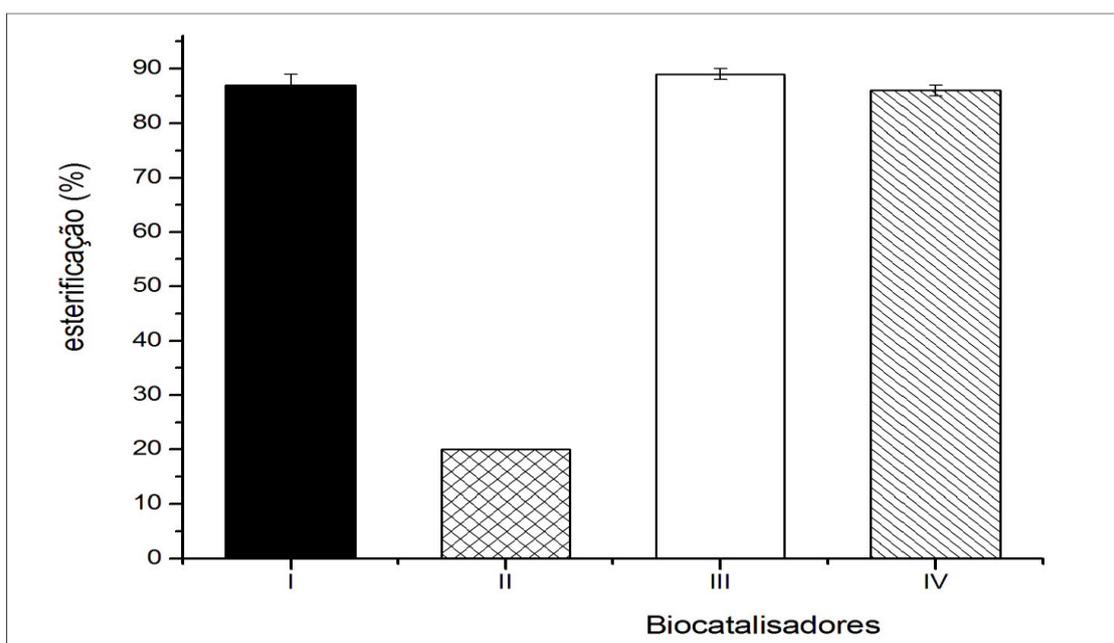
Parâmetros da reação	Ésteres	
	Butirato de etila	Butirato de metila
Solvente	n-heptano	n-heptano
Temperatura, T (°C)	25	25
Razão molar [álcool]/[ácido]	1:1	1,5:1
Quantidade de enzima ( $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ )	1,61	1,61
Massa de biocatalisador (mg)	200	100
Velocidade de agitação (rpm)	150	150
Quantidade de água (% m.m <sup>-1</sup> )	0,0	0,0
Agente dessecante (% p.v <sup>-1</sup> )	20	0,0
Tempo de reação, t (h)	6	6

#### 4.3.13. Estudo comparativo dos rendimentos da reação obtidos nas sínteses dos ésteres butirato de metila e butirato de etila em condições otimizadas

Dentro das condições de obtenção otimizadas para os dois ésteres estudados no presente trabalho, um estudo comparativo foi efetuado utilizando a enzima comercial Lipozyme®, a enzima solúvel e o derivado produzido na ausência do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS). Os resultados deste estudo estão apresentados nas Figuras 57 e 58.



**Figura 57. Síntese do butirato de etila. Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}=20$  mL; carga oferecida=  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador (m): 200 mg ; Conc. dos substratos ( $\text{mol L}^{-1}$ ): 0,2; Razão molar [álcool]/[ácido]: 1:1 ; Agitação= 150 rpm ; Agente dessecante : 20% p.v<sup>-1</sup> ; Tempo de reação (t) = 6h . Biocatalisadores: (I) enzima solúvel ; (II) derivado produzido na ausência do surfactante SDS nas condições otimizadas de imobilização; (III) derivado obtido na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup> nas condições otimizadas de imobilização; (IV) Enzima comercial Lipozyme®.**



**Figura 58. Síntese do butirato de metila. Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}}= 20$  mL; carga oferecida=  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  ; massa de biocatalisador (m) = 100 mg ; Razão molar [álcool]/[ácido] = 1,5:1 ; Agitação = 150 rpm ; Tempo de reação (t) = 6h. Biocatalisadores: (I) enzima solúvel (II) derivado produzido na ausência do surfactante SDS nas condições otimizadas de imobilização; (III) derivado obtido na presença de SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup> nas condições otimizadas de imobilização; (IV) Enzima comercial Lipozyme®.**

O biocatalisador preparado neste trabalho nas condições otimizadas de imobilização (derivado III) discutidas anteriormente foi muito mais efetivo na produção dos ésteres estudados quando comparado ao derivado I (enzima solúvel) e a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> (derivado IV).

Para o butirato de etila (Figura 57), o rendimento da esterificação obtido com o derivado III ( $92 \pm 1 \%$ ) foi 2,3 vezes maior do que o derivado II ( $37 \pm 2 \%$ ) e maior do que a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> ( $86 \pm 1\%$ ) e a enzima solúvel ( $89 \pm 1 \%$ ).

Os resultados obtidos com o biocatalisador produzido neste trabalho para a síntese do butirato de etila concordam com alguns trabalhos reportados na literatura (Chengliang *et al.*, 2011; Thakar & Madamwar, 2005).

Em relação ao butirato de metila (Figura 58), a taxa de conversão do derivado III ( $89 \pm 1 \%$ ) foi 4,5 vezes superior a taxa de conversão do éster utilizando o derivado obtido quando a imobilização foi efetuada na ausência do surfactante SDS (derivado II) que apresentou um percentual de conversão de 20 %.

Na preparação deste éster, o biocatalisador obtido em condições otimizadas também proporcionou taxas de reação ligeiramente superiores às obtidas quando a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> (derivado IV) e a enzima solúvel (derivado I) foram utilizadas nas mesmas condições reacionais, que apresentaram rendimentos de esterificação de ( $86 \pm 1 \%$ ) e ( $87 \pm 2 \%$ ), respectivamente.

Os resultados obtidos com o biocatalisador produzido neste trabalho para a síntese do butirato de metila também concordam com alguns trabalhos reportados na literatura (Abbas & Comeau, 2003).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o biocatalisador produzido em condições otimizadas mostrou alta eficiência catalítica na síntese dos ésteres estudados comparável a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> amplamente utilizada na síntese destes compostos.

#### **4.3.14. Estabilidade operacional do biocatalisador**

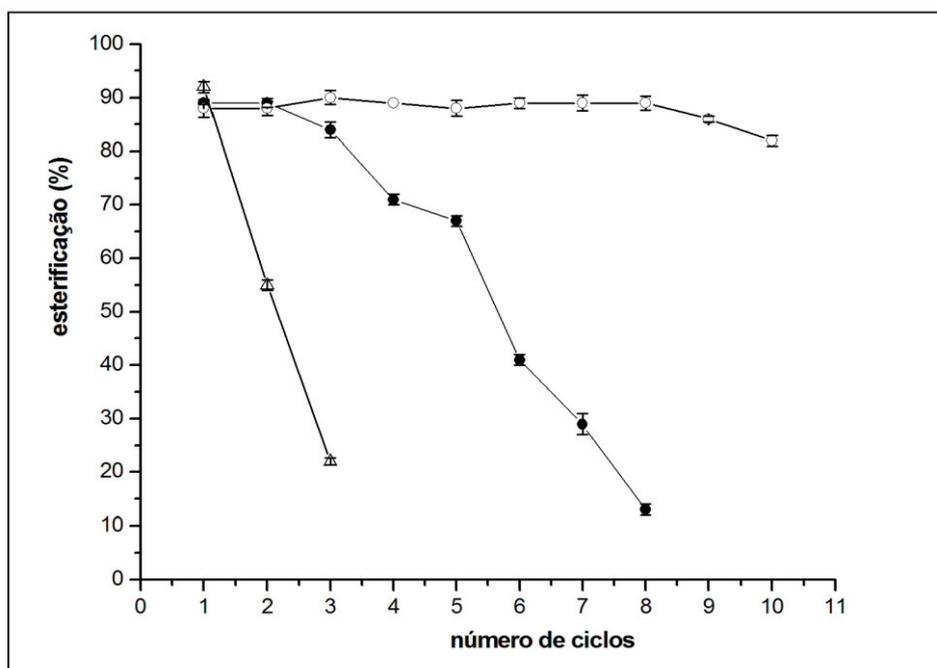
Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que para a síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila, o biocatalisador produzido apresentou grande eficiência catalítica fornecendo altos rendimentos de reação mesmo quando comparado à enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup>.

Entretanto, além de sua performance em termos de atividade catalítica, para que um biocatalisador seja considerado apropriado para aplicações industriais, substituindo com sucesso os métodos tradicionais de obtenção de compostos de interesse, outros fatores críticos como custos de obtenção e desempenho em termos estabilidade operacional (reutilização por vários ciclos consecutivos sem perda de atividade catalítica) deverão ser avaliados pois contribuem significativamente para a avaliação do custo total do processo (Tufvesson *et al.*, 2011).

Neste sentido, um estudo de estabilidade operacional para cada éster foi efetuado nas condições otimizadas de reação utilizando o biocatalisador selecionado neste trabalho.

Paralelamente, um estudo comparativo dos rendimentos de esterificação obtidos com a utilização do biocatalisador selecionado nestes experimentos nas condições otimizadas e a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> foi efetuado.

Nestes experimentos, duas cargas foram oferecidas ao biocatalisador: 1,61 e 3,22  $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ . Os resultados da estabilidade operacional para a síntese do butirato de etila estão apresentados na Figura 59.



**Figura 59. Resultados para estabilidade operacional do butirato de etila.**

**Condições:** Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; massa de biocatalisador (m): 200 mg ; Conc. dos substratos ( $\text{mol L}^{-1}$ ): 0,2 ; Razão molar [álcool]/[ácido]: 1:1 ; Agitação= 150 rpm ; Agente dessecante (PM 4A): 20% p.v<sup>-1</sup> ; Tempo de reação(t)= 6h. **Legenda:** Lipozyme<sup>®</sup> (○); biocatalisador I (1,61  $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ) (△); biocatalisador II (3,22  $\text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ) (●).

Os resultados apresentados na Figura 59 mostram que uma diminuição linear dos rendimentos de esterificação quando a carga oferecida foi de  $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  ( $50 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ). Após 3 ciclos consecutivos, o rendimento de esterificação inicialmente de 92 % diminuiu acentuadamente para 22 %.

No intuito de contornar este problema, novos experimentos foram efetuados aumentando-se a carga oferecida ao biocatalisador para  $3,22 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  ( $100 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ).

Para uma carga oferecida de  $3,22 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ , podemos observar uma ligeira melhora no desempenho do biocatalisador.

Para 3 ciclos de reação consecutivos os rendimentos de esterificação calculados foram de 89, 89 e 84 % respectivamente. No quarto e quinto ciclos de reação os rendimentos obtidos foram de 71 e 67% respectivamente.

A partir do sexto ciclo de reação foi evidenciada uma queda acentuada na atividade catalítica do derivado, sendo que, ao final do oitavo ciclo de reação o biocatalisador perdeu 85 % de sua atividade catalítica inicial.

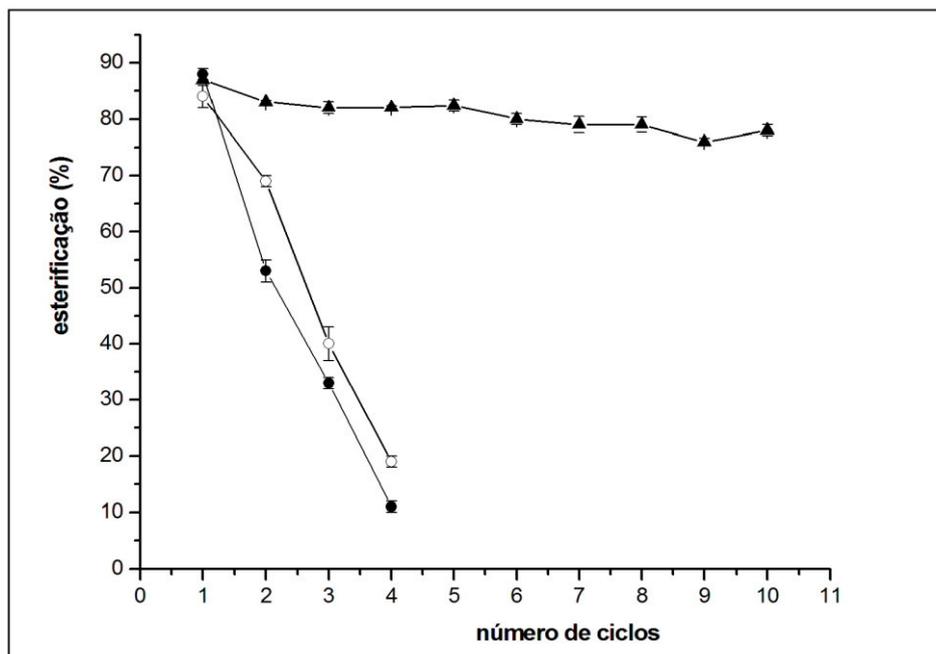
Os decréscimos dos rendimentos de esterificação observados em cada caso podem ser consequência de um efeito combinado de desativação/dessorção da lipase e a perda de biocatalisador devido a agitação do meio reacional durante a reação e as sucessivas etapas de manipulação do derivado (remoção do meio reacional/filtração/secagem/adição de uma nova mistura de substratos) após cada ciclo de reação (Foresti & Ferreira, 2007).

Para a maior carga oferecida ao suporte, a massa média inicialmente adicionada foi de  $0,2080 \pm 0,002 \text{ g}$ . Ao final do oitavo ciclo de reação a massa média pesada foi de  $0,046733 \text{ g}$ , o que significa uma perda de massa em torno de 78 % em relação a quantidade inicialmente adicionada no primeiro ciclo de reação.

Esta considerável perda de massa do biocatalisador ao longo dos ciclos consecutivos de reação pode, em parte, explicar a diminuição das taxas de conversão observadas para cada ciclo de reação.

Alguns trabalhos indicam também, que, quando reações de esterificação são efetuadas com concentrações equimolares de álcool e de ácido, a água liberada durante a reação pode se acumular na superfície da enzima, resultando em uma perda acelerada de sua atividade catalítica (Krishna *et al.*, 2001).

O estudo de estabilidade operacional para a síntese do butirato de metila está apresentado na Figura 60.



**Figura 60. Resultados para estabilidade operacional do butirato de metila.**

**Condições:** Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; massa de biocatalisador (m): 100 mg ; Razão molar [álcool]/[ácido]: 1,5:1 ; Agitação= 150 rpm ; Tempo de reação(t)= 6h. **Legenda:** Lipozyme® (▲); biocatalisador I ( $1,61 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ) (●); biocatalisador II ( $3,22 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ) (◻).

Os resultados apresentados na Figura 60 mostram que, independente da carga enzimática oferecida ao suporte quitosana, uma diminuição significativa nos rendimentos de esterificação podem ser evidenciados.

Entretanto, para uma carga oferecida de  $3,22 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ , o decréscimo nas taxas de conversão foram ligeiramente inferiores.

Da mesma forma que no caso anterior, uma grande perda de massa foi observada ao longo dos ciclos de reação quando uma carga de 3,22 mg de proteína foi oferecida ao suporte. A massa média inicialmente adicionada foi de 0,1069 g. Após o quarto ciclo de reação a massa residual média pesada foi de 0,0359 g (33 % da massa inicialmente adicionada).

Desta forma, as mesmas considerações feitas para explicar a diminuição dos rendimentos de esterificação calculados na síntese do butirato de etila, também podem justificar os resultados obtidos neste estudo para a o butirato de metila.

Além destes fatores, a acumulação de água formada na reação em torno da enzima pode contribuir para a desestabilização de sua estrutura ativa (Dave & Madamwar, 2008).

Em contraste, a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> mostrou uma grande estabilidade operacional quando comparada aos biocatalisadores utilizados neste trabalho, mostrando uma discreta diminuição de sua atividade de esterificação ao longo de 10 ciclos de reação consecutivos para ambos os ésteres.

Lipase de *Rhizopus oligosporus* imobilizada em sílica gel 60 previamente aminada com EDA (etilenodiamina) e reticulada com glutaraldeído 2,5% (v.v<sup>-1</sup>) foi utilizada na síntese dos ésteres acetato de n-butila e acetato de n-propila. O número máximo de reutilizações deste biocatalisador foi de 3 ciclos (carga oferecida ao suporte de 20 U g<sup>-1</sup>) com taxas de conversão de 54,6% para o acetato de n-butila e de 56,5% para o acetato de n-propila após 28h de reação (Mahapatra *et al.*, 2009).

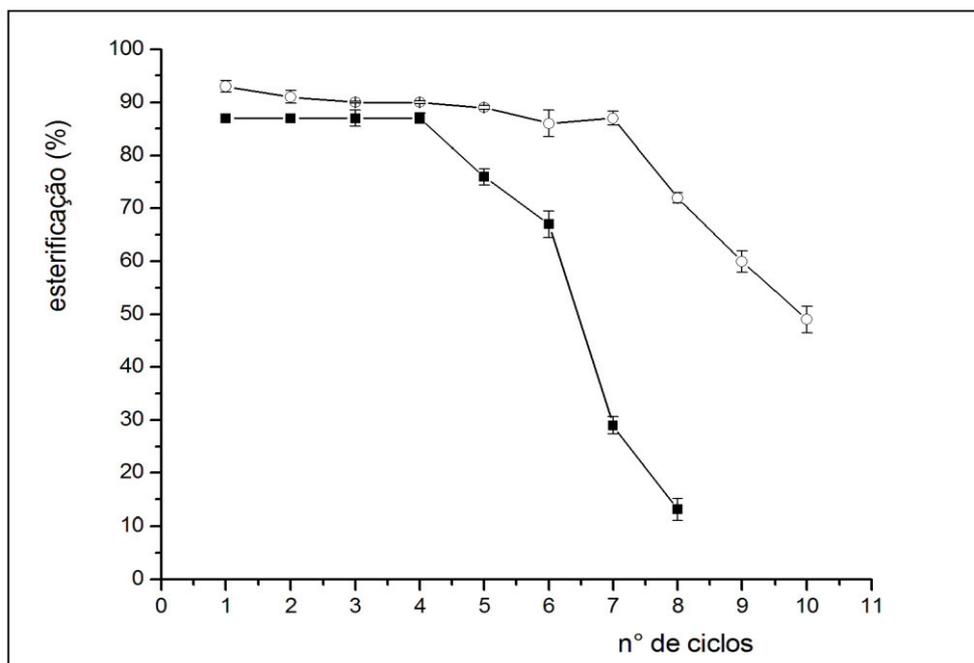
Neste contexto, lipase de *Candida rugosa* (CRL) previamente adsorvida em algodão tratado com polietilenoimina (PEI) e em seguida reticulado com glutaraldeído (1% m.v<sup>-1</sup>) a pH 7 por 1h foi utilizada na síntese de butirato de etila em ciclohexano a 25°C (91,2% de conversão em 24 h de reação).

O biocatalisador obtido nas condições mencionadas foi reutilizado por 12 ciclos consecutivos de reação sem perda considerável de sua atividade catalítica. Entretanto, este grande número de reutilizações foi conseguido somente quando uma carga de 0,6 g de enzima foi oferecida a 1,5 g de suporte (Chengliang *et al.*, 2011).

Diante do exposto e dependendo da capacidade de carga do suporte, a utilização de altas cargas enzimáticas pode ser uma maneira viável de contornar as limitações observadas para os biocatalisadores produzidos neste trabalho, visto que altas cargas de proteínas tendem a favorecer a estabilidade operacional dos biocatalisadores (Adriano, 2005; Porto *et al.*, 2002).

Neste sentido, novos experimentos foram efetuados aumentando-se a carga oferecida ao biocatalisador.

Nestes novos ensaios, a quantidade de proteína oferecida foi de 27 mg proteína.g<sup>-1</sup> suporte e as demais condições foram mantidas constantes. Os resultados destes novos ciclos para os dois ésteres estudados estão apresentados na Figura 61.



**Figura 61. Resultados para estabilidade operacional do butirato de etila (○) e do butirato de metila (■). Condições: Solvente: n-heptano;  $V_{\text{reação}} = 20 \text{ mL}$ ; carga oferecida =  $27 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$ ; massa de biocatalisador(m): 100 mg (butirato de metila) e 200 mg (butirato de etila); Razão molar [álcool]/[ácido]: butirato de metila = 1,5:1 e butirato de etila = 1:1; Agitação = 150 rpm; Agente dessecante: butirato de etila = 20% p.v<sup>-1</sup>, butirato de metila=0%.**

Os resultados apresentados na Figura 61 evidenciam que a utilização de cargas altas de proteínas oferecidas ao suporte quitosana promoveu efeitos positivos na estabilidade operacional dos biocatalisadores utilizados.

Para o butirato de metila, os rendimentos de esterificação foram de 87 % durante 4 ciclos consecutivos. A partir do quinto um decréscimo no percentual de conversão foi observado (76 %), porém este valor ainda é equivalente aos processos de esterificação que utilizam a via química.

Após o sexto ciclo (rendimento de 61 %), as reações experimentaram um declínio acentuado nos percentuais de esterificação, muito provavelmente devido a inativação da enzima pelos substratos utilizados na reação, especialmente o metanol.

Além desta inativação pelos substratos, uma perda de massa acentuada ao longo dos ciclos de reação também foi verificada.

Já para o butirato de etila, pode-se observar que durante 7 ciclos consecutivos de reação as taxas de conversão em éster não sofreram alterações significativas. No primeiro ciclo o rendimento da reação calculado foi de 93 % e após o sétimo ciclo, o percentual de conversão foi de 87 %.

Em termos de percentual de conversão pode-se observar que os resultados obtidos nestes 7 ciclos foram superiores aos resultados obtidos quando a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> foi utilizada.

No oitavo ciclo, o rendimento observado de 72 % ainda é um valor próximo dos rendimentos obtidos em processos convencionais.

No nono e décimo ciclo de reação, a diminuição nos rendimentos de esterificação foram um pouco mais acentuadas (60 e 49 %, respectivamente), provavelmente devido a inativação da enzima pelo substrato alcoólico.

Para este caso, também foi evidenciada uma grande perda de massa do biocatalisador utilizado durante os vários ciclos consecutivos de reação, o que também pode ter contribuído sobremaneira para a queda nos rendimentos obtidos.

Analisando os resultados obtidos para os dois ésteres podemos também concluir que o metanol exerce um efeito inibitório na enzima utilizada bem maior do que o etanol.

Em suma, o efeito de inibição parcialmente contornado quando uma quantidade maior de proteína foi imobilizada no suporte, pode ser minimizado em maior grau aumentando-se ainda mais a carga oferecida ao suporte e dentro deste contexto, novos experimentos deverão ser efetuados para a síntese destes dois ésteres.

## *Capítulo 5-CONCLUSÕES*

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, lipases de *Rhizomucor miehei* (RmL) foram imobilizadas no suporte quitosana 2,5% m.v<sup>-1</sup> utilizando dois protocolos de imobilização na presença dos surfactantes Triton X-100, dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) com vistas a se obter biocatalisadores que permitissem a síntese de dois ésteres de interesse comercial, butirato de metila e butirato de etila, com elevada eficiência catalítica e alta estabilidade operacional.

Os resultados obtidos neste projeto de pesquisa mostraram que:

- A presença de diferentes tensoativos adicionados em vários níveis no meio de reação, promoveu diferentes efeitos sobre a atividade hidrolítica da RmL solúvel vs. pNPB após exposição;
- para os surfactantes Triton X-100 e SDS, as máximas atividades hidrolíticas foram observadas quando as concentrações destes surfactantes foram adicionadas em suas respectivas concentrações micelares críticas (0,0015 e 0,23 % m.v<sup>-1</sup>);
- o brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), um tensoativo catiônico exerceu um efeito negativo nas atividades hidrolíticas medidas, sendo evidenciada uma completa inibição da atividade enzimática para algumas concentrações adicionadas ao meio reacional;
- dentre as estratégias de imobilização estudadas, a adsorção prévia de enzimas no suporte quitosana seguida de reticulação com glutaraldeído produziu biocatalisadores com maior atividade hidrolítica (vs. pNPB) quando comparada a imobilização da lipase na presença dos surfactantes em suportes previamente ativados com glutaraldeído;
- a estratégia de adsorção prévia das lipases no gel de quitosana a 4 °C, por 1h a 220 rpm na presença do surfactante aniônico SDS 0,23 % m.v<sup>-1</sup> seguida de reticulação com glutaraldeído 0,6 %v.v<sup>-1</sup> por 1h a 25 °C foi a que propiciou os melhores resultados em termos de rendimento de imobilização (96 %) e atividade recuperada do biocatalisador (69 %);

➤ O derivado obtido ( $t_{1/2} = 42,54$  min) nas condições anteriormente mencionadas foi 65 vezes mais estável do que a enzima solúvel ( $t_{1/2} = 0,64$  min) e 13 vezes mais estável do que a enzima comercial Lipozyme® ( $t_{1/2} = 3,15$  min) a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , apresentando também elevada estabilidade térmica a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , retendo 89 % de sua atividade inicial após 96h de exposição a esta temperatura;

➤ para o biocatalisador selecionado, efeitos de transferência de massa externa foram negligenciáveis a partir da velocidade de agitação de 600 rpm;

➤ a partir da carga oferecida de  $1,04\text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$  ( $32\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) não houve mudanças significativas nas taxas de hidrólise do substrato, indicando que a partir desta carga o suporte apresentou restrições difusionais internas o que foi constatado a partir dos dados de efetividade calculados;

➤ Na síntese do butirato de metila, o rendimento máximo de esterificação (89%) em 6h de reação foi obtido quando a reação foi conduzida em n-heptano, razão molar álcool/ácido 1,5:1, carga oferecida de  $1,61\text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$  ( $50\text{ U} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ), massa de biocatalisador 100mg e velocidade de agitação de 150 rpm; nas mesmas condições reacionais, a enzima comercial Lipozyme®, a enzima solúvel e o biocatalisador produzido na ausência do surfactante apresentaram taxas de conversão de  $(86 \pm 1\%)$ ,  $(87 \pm 2\%)$  e 20 % respectivamente;

➤ para o butirato de etila, o rendimento máximo de esterificação (92%) em 6h de reação foi obtido quando a reação foi conduzida em n-heptano, razão molar álcool/ácido 1:1, concentração dos substratos  $0,2\text{ mol L}^{-1}$ , carga oferecida de  $1,61\text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$  ( $50\text{ U} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ), massa de biocatalisador 200 mg, velocidade de agitação de 150 rpm na presença de 20% (p.v<sup>-1</sup>) do agente dessecante peneira molecular 4A; o rendimento da esterificação obtido com o derivado produzido em condições otimizadas foi ligeiramente superior aos rendimentos obtidos com a enzima solúvel ( $89 \pm 1\%$ ) e a enzima comercial Lipozyme® ( $86 \pm 1\%$ ) e foi 2,3 vezes maior do que o derivado produzido na ausência do surfactante II ( $37 \pm 2\%$ );

- para o butirato de etila, os melhores resultados em termos de estabilidade operacional, foram obtidos quando a carga oferecida ao suporte foi de  $3,22 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$  ( $100 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ). Nesta condição, após 5 ciclos de reação consecutivos, o rendimento de esterificação que inicialmente foi de 89 % caiu para 67 %;
- Entretanto, para este caso, a utilização de uma alta carga enzimática  $27 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ , aumentou significativamente a estabilidade operacional do biocatalisador utilizado que manteve altos rendimentos de esterificação comparáveis a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> após sete ciclos de reação consecutivos;
- para o butirato de metila, baixas cargas enzimáticas oferecidas ao suporte quitosana neste trabalho, promoveram uma diminuição significativa nos rendimentos de esterificação evidenciados a partir do segundo ciclo de reação;
- Como no caso anterior, a utilização de uma maior carga de proteínas ( $27 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ ) promoveu um ligeiro incremento na estabilidade operacional do biocatalisador utilizado que manteve altos percentuais de conversão em éster durante 4 ciclos de reação consecutivos, porém bem inferior a estabilidade operacional evidenciada na síntese do butirato de etila;
- para os dois casos, a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup> apresentou uma alta estabilidade operacional quando comparada aos biocatalisadores produzidos neste trabalho mostrando apenas um ligeiro decréscimo em sua atividade ao longo de 10 ciclos consecutivos de reação.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram claramente que a utilização de baixas concentrações de surfactantes como o SDS pode ser considerada uma simples e eficiente maneira de se obter biocatalisadores com alta eficiência catalítica.

Além disso, o suporte quitosana, um biopolímero de origem natural, pode ser empregado com grande sucesso na obtenção de biocatalisadores com alta atividade

catalítica e baixo custo de obtenção quando comparada aos biocatalisadores comercializados atualmente.

Apesar dos resultados promissores obtidos neste trabalho, estudos posteriores deverão ser efetuados visando à obtenção de biocatalisadores que aliem as altas taxas de esterificação evidenciadas com uma maior resistência mecânica e estabilidade operacional requerida para que os mesmos possam ser utilizados em escala ampliada.

## *Capítulo 6-SUGESTÕES*

## 6. Sugestões

Levando-se em consideração os resultados apresentados neste trabalho, alguns estudos são sugeridos:

(i) efetuar novos estudos de estabilidade operacional utilizando cargas maiores de enzima oferecidas ao suporte visando aumentar o número de reutilizações dos biocatalisadores obtidos na síntese dos ésteres estudados neste trabalho;

(ii) utilizar outras classes de surfactantes nos procedimentos de imobilização visando diminuir ainda mais os custos de obtenção em relação aos biocatalisadores preparados no presente trabalho;

(iii) efetuar novos estudos de imobilização utilizando, quando possível, a estratégia de imobilização covalente multipontual na presença de surfactantes;

(iv) desenvolver novos biocatalisadores a base de suportes híbridos formados pela quitosana e outros polímeros naturais ou sintéticos visando a obtenção de biocatalisadores com elevada estabilidade operacional e resistência mecânica;

(v) desenvolver novos processos utilizando reatores contínuos na síntese dos ésteres estudados.

# *REFERÊNCIAS*

## REFERÊNCIAS

1. ABBAS, H, HIOL, A., DEYRIS, V., COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit.. **Enzyme Microb. Technol.**, v.31, n.7, p.968-975,2002.
2. ABBAS, H., COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme Microb. Technol.** ,v. 32, p.589-595,2003.
3. ABIAN, O., GRAZU, V. V., HERMOSO, J., GONZALEZ, R., GARCIA, J.L., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*:site-directed mutagenesis of the protein surface to increase multipoint covalent attachment. **Applied Environ. Microbiol.**, v.70, p. 1249-1251, 2004.
4. ABRIMIC, M., LESCIC, I., KORIKA, T., VITALE, L., SAENGER,W., PIGAC, J. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme Microb. Technol.** ,v. 25, p.522-529,1999.
5. ADAMS, M.W., KELLY, R.M. Finding and using hypertermophilic enzymes. **TRENDS in Biotechnology**, v.16, p. 329-332, 1998.
6. 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, p.529-538, 2005.
7. ADRIANO, W.S., MENDONÇA, D.B, RODRIGUES, D.S, MAMMARELLA, E.J, GIORDANO, R.L.C. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotypsin. **Biomacromolecules**,v.9, p.2170-2179, 2008.
8. AIRES-BARROS, M.R. Biocatálise em Solventes Orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 72, p.2-13, 2002.
9. AIST:RIO-DB Spectral Database for Organic Compounds,SDBS. Disponível em : < [http://www.riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://www.riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) >. Acesso em: 20 nov. 2012.
10. ÅKERMAN, C.E., HANGSTRÖM, A.E.V., MOLLAAHMAD, M.A., KARLSSON, S., HATTI-KAUL, R. Biolubricant synthesis using immobilised lipase: Process optimisation of trimethylolpropane oleate production. **Process Biochemistry**, v.46, p. 2225–2231, 2011.
11. ALCÁNTARA, A.R, de FUENTES, I.E., SINISTERRA, J .V. *Rhizomucor miehei* lipase as the catalyst in the resolution of chiral compounds: an overview. **Chem. Phys. Lipids**, v.93, p.169-184, 1998.
12. AL-DURI, B., YONG, Y.P. Lipase immobilization: equilibrium study of lipases immobilized on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p.207-215, 2000.

13. ALMEIDA, R.V. **Clonagem, expressão, caracterização e modelagem estrutural de uma esterase termoestável de *Pyrococcus furiosus***. 2005. 109 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.
14. ALVAREZ-MACARIE, E., BARATTI, J. Short chain flavour Ester synthesis by a new estearase from *Bacillus licheniformi*. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 10, p. 377– 383, 2000.
15. ALOULOU, A., RODRIGUEZ, J.A., PUCCINELLI, D., MOUZ, N., LECLAIRE, J., LEBLOND, Y., CARRIER, F. Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p.228-237, 2007.
16. ALSARRA, A. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, v.23, p.3637-44, 2002.
17. ALTUN, G.D., CETINUS, S.A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v.100, p. 964-971, 2007.
18. ARROYO, M. Inmovilizacion de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v.39, n.2, p.23-29, 1998.
19. BANO, M.C, GONZALEZ-NAVARRO, H., ABAD, C. Long-chain fatty acyl-CoA esters induce lipase activation in the absence of a water-lipid interface. **Biochem Biophys A**, v.1632, p. 55-61, 2003.
20. BARCZA, M.V. Esterificação. Disponível em : < <http://www.faenquil.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2012.
21. BARON, A. M., INEZ, M., SARQUIS, M., BAILGORI, M., MITCHELL, D. A., KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of *n*-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments., **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 34, n. 1-6, p. 25-32, 2005.
22. BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISEN, P., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., HUGUET, J., GUISÁN, J.M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnol. and Bioengineering**, v.58, p. 486-493, 1998.
23. BATTISTEL, E., CALAPRICE, C., GUALDI, E., REBESCO, E., USAI, E.M. Co-production of butyrate methyl ester and triacetyl glycerol from tributyrin and methyl acetate. **Applied Catalysis A: General.**, v. 394, p. 149-157, 2011.
24. BAUDOT, A.; SOUCHON, I.; MARIN, M. Total permeate pressure influence on the selectivity of the pervaporation of aroma compounds. **J. Memb. Sc.**, v. 158, n. 1-2, p. 167-185, 1999.
25. BÉLAFI-BAKÓ, K., KABIRI BADR, A., NEMESTÓTHY, N., EHRENSTEIN, U., GUBICZA, L. Kinetics of Ethyl Acetate Formation by Lipase in Organic Solvent and Solvent-free System. **Chem. Pap.**, v.57, n.4, p. 278-281, 2003.

26. BEN-SALAH, R., GHAMGHUI, H., MILED, N., MEJDOUB, H., GARGOURI, Y. Production of Butyl Acetate Ester by Lipase from Novel Strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n.4, p.368-372, 2007.
27. BERGER, J., REIST, M., MAYER, J.M., FELT, O., PEPPAS, N.A., GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogel for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.
28. BETANCOR, L., LÓPEZ-GALLEGO, F., HIDALGO, A., ALONSO-MORALES, N., DELLAMORA, G., MATEO, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p.877-882, 2006.
29. BICAS, J.L., SILVA, J.C., DIONÍSIO, A.P., PASTORE, G.M. Biotechnological Production of Bioflavors and Functional Sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.7-18, 2010.
30. BLANCO, R.M., TERREROS, P., MUNOZ, N., SERRA, E. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support., **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.47, n. 1-2, p.13-20, 2007.
31. BODE, M.L., van RANWIJK, F., SHELDON, R.A. Crude amino-acylase from *Aspergillus sp.* is a mixture of hydrolases. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 84, p. 710-713, 2003.
32. BOMMARIUS, A.S., RIEBEL, B.R. Biocatalysis: fundamentals and applications, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
33. BOMMARIUS, A.S., POLIZZI, K.M. Novel biocatalysts: Recent developments. **Chemical Engineering Science**. 61, p.1004 – 1016, 2006.
34. BORNSCHEUER, U.T, BESSLER, C., SRINIVAS, R., HARI-KRISHNA, S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **TRENDS in Biotechnology**, v.20, n.10, p.433-437, 2002.
35. BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiol. Review**, v. 733, p.1-9, 2002.
36. BORNSCHEUER, U. T., BUCHHOLZ, K. Highlights in biocatalysis – Historical landmarks and current trends. **Eng. Life Sci.**, v.5, p. 309-323, 2005.
37. BOUAID, A., APARÍCIO, J., MARTINEZ, M. Synthesis of a Green biosolvent: Isopropyl esters A Statistical Approach. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, p. 533-538, 2007.
38. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

39. BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S., DODSON, E., DODSON, G.G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J. P., CHRISTIANSEN, L., HUGJEJENSEN, B., NORSEKOV, L., THIM, L., MENGUE, U., A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v.343, p.767-770, 1990.
40. BRADY, D., JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnol. Letters**, v.31, p. 1639-1650, 2009.
41. BRADY, D., STEENKAMP, L., REDDY, S., SKEIN, E., CHAPLIN, J. Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 34, p.283-291, 2004.
42. BROCKMAN, H. L., BORGSTROM, B. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Lipases. (Eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.
43. BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S., DODSON, G.G., LAWSON, D. M., TURKENBURG, J. P., BJORKKLING, F., HUGJEJENSEN, B., PATKAR, S. A., THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v.351, p.491-494, 1991.
44. BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z.S., DODSON, E.J., DODSON, G.G., TURKENBURG, J. P. Structure and Molecular-Model Refinement of *Rhizomucor- miehei* triacylglyceride lipase – A Case-study of the Simulated Annealing in Partial Annealing in Partial Model Refinement. **Acta Crystallogr.**, v.48, p.307-319, 1992.
45. BURKET, J.F.M., MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, p. 77-84, 2004.
46. BUSTILLO, A.J., HERNÁNDEZ-GALAN, R., COLLADO, I.G. Biocatalysis Applied to the Synthesis of Agrochemicals. **Current Organic Chemistry**, v.10, p. 2037-2054, 2006
47. CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R., GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. 1. Ed. Lisboa: Lidel- Edições Técnicas Ltda, 2003.
48. CAO, L. Immobilized enzymes: science or art?. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.9, p.217-226, 2005.
49. CARVALHO, C. M. L., CABRAL, J. M. S Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1063-1085, 2000.
50. CASTRO-OCHOA, L.D., RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C., VALERIO-ALFARO, G., ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme Microb. Technol.**, v.37, p. 648–654, 2005.

51. CASTRO-OCHOA, L.D, RODRIGUEZ-GÓMEZ, C., VALERIO-ALFARO, G., ROS ,R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme Microb. Technol.**, v.37, p. 648-654, 2005.
52. CASTRO, H. F., MENDES, A. A., SANTOS, J. C, AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**,v.27, n.1, p.146-156, 2004.
53. CASTRO, H.F., OLIVEIRA, P.C., SOARES, C.M.F. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.237-241,1997.
54. CENI, G., LERIN, L.A, de CONTO, J.F, BRANCHER, C.V, da SILVA, P.C , TONIAZZO, G., TREICHEL, H., de OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V, OSTREICHERO, E.G, ANTUNES, O.A.C. Optimization of 1-glyceryl benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 46, p.107-112, 2010.
55. CETINUS, S.A., OZTOP, H.N. Immobilization of Catalase on Chitosan Film. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 26, p. 497-501, 2000.
56. CHÂABOUNI, M.K., GHAMGUI, H., BEZZINE, S., REKIK,A., GARGOURI, Y. Production of flavor esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent free system. **J. Process Biochem.** , v. 41, p.1692-1698, 2006.
57. CHAE, S. Y. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. **Journal of Controlled Release**, v.102, p.383-394, 2005.
58. CHAO, A.C., SHYU, S.S., LYN, Y.C., MI, F.L. Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan to confer the property of a cationic dye adsorbent. **Bioresource Technology**, v.91, p. 157-162, 2004.
59. CHENGLIANG, S., JIN, C., LEI, H., XIANGCHENG, C., LEI, H., XIANGCHENG, Z., ZHIANG, ZHINAN, X. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.72, p.139-144, 2011.
60. CHEN, C. C., TSAI, S. W., VILLENEUVE, P. “Enantioselective hydrolysis of (R, S)-naproxen 2, 2, 2-trifluoroethyl ester in water-saturated solvents via lipases from *Carica pentagona* Heilborn and *Carica papaya*”, **J. Mol. Catal.** ,v. 34, p.51-57, 2005.
61. CHIOU, S. –H, WU, W –T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials** 2004; v.25, 197-204, 2004.
62. COLLINS, S.E , LASSALLE, V., FERREIRA, M.L.FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor miehei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML.**Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.72, p. 220-228, 2011.

63. COLOMBIÉ, S., RUSSEL, J.T, CONDORET, J.-S, MARTY, A. Water Activity Control: A Way to Improve the Efficiency of Continuous Lipase Esterification. **Biotechnol. and Bioengineering**, v.60, n.3, p.362-368, 1998.
64. COWAN, D.A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization **Enzyme Microb. Technol.**, v.49, p. 326– 346, 2011.
65. CRESPO, J. D. S., QUEIROZ, N., NASCIMENTO, M. D. G., SOLDI, V. The use of lipases immobilized on poly (ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 401-409, 2005.
66. CYGLER, M., SCHRAG, J.D. Structure as Basis for Understanding Interfacial Properties of Lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, pp. 3-27, 1997.
67. DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, 2005. 211p. (Tese, Doutorado em Engenharia Química, Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos).
68. DALLA-VECHIA, R., NASCIMENTO, M.G., SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623:630, 2004.
69. DAMNJANOVIC, J.J., ZUZA, M.G., SAVANOVIC, J.K., BEZBRADICA, D.I., MIJIN, D.Z., BOSKOVIC-VRAGOLOVIC, N. KNEZEVIC-JUGOVIC, Z.D. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.75, p. 50– 59, 2012.
70. DAVE, R., MADAMWAR, D. *Candida rugosa* lipase immobilized in Triton X-100 microemulsion based organogels (MBGs) for ester synthesis. **Process Biochemistry**, v.43, p. 70-75, 2008.
71. DEMYTTENAERE, J. C. R.; VAN BELLEGHEM, K.; DEKIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-Limonene by Fungi and the Use of Solid Phase Microextraction for Screening. **Phytochemistry**, v. 57, n. 2, p. 199-208, 2001.
72. DENG, H.T, LIN, Y. , WANG, J.J, LIU, Z.Y , MIAO, M.A, ZHENG, F. Comparative Study on the Immobilization of Lipase on Chitosan Gels Modified by Different Hydrophobic Groups. **Surface Review and Letters**, v.16, p.323–327, 2009.
73. DEREWENDA, Z.S., DEREWENDA, U. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1,9 Å resolution. **J. Mol Biol.**, v.227, p.818-839, 1992.
74. DON, T.M. *et al.* Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. **Carbohydrate Polymers**, v.63, p.331-339, 2006.
75. DORDICK, J.S. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, p.566-571, 1989.

76. DORDICK, J.S., LEE, M. –Y. Enzyme activation for nonaqueous media. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.376–384, 2002.
77. DOSSAT, F., COMBES, D., MARTY, A. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 117-124, 2002.
78. DOSSAT, V., COMBES, D., MARTY, A. Efficiente lípase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent free-system. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p.117-124, 2002.
79. DUBAL, S.A., TILKARI, Y.P., MOMIN, S.A., BORKAR, I.V. Biotechnological Routes in Flavor Industries. **Advanced Biotech.**, March , p-20-29, 2008.
80. FAI, A.E.C., STAMFORD, T.C.M., STANFORD, T.L.M. Potencial Biotecnológico de Quitosana em Sistemas de Conservação de Alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.9, n.5, p.435-451, 2008.
81. FANGKANGWANWOWG, J., YOKSAN, R., CHIRACHANCHAI, S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. **Polymer**, v. 47, p.6438-6445, 2006.
82. FEHLING, E., KLEIN, E., WEBER, N., DEMES, C., VOSMANN, K. Chemo-enzymatic preparation of copolymeric polythioesters containing branched-chain thioether groups. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 74, p. 357-365, 2007.
83. FERNADES, M.L.M., KRIEGER, N., BARON, A.M., ZAMORA, P.P., RAMOS, L.P., MITCHELL, D.A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 30, p. 43– 49, 2004.
84. FERNÁNDEZ-LORENTE, R., PALOMO, J.M., CABRERA, Z., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97, p.242-250, 2007.
85. FERNANDEZ-LORENTE, G., CABRERA, Z., GODOY, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PALOMO, J.M., GUISÁN, J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v.43, p.1061–1067, 2008.
86. FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ROSSEL, C.M., RODRIGUEZ, V., GUISÁN, J.M. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme Microb. Technol.**, v.17, p.517–23, 1995.
87. FERNANDEZ-LAFUENTE, R., BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase from *Candida Antarctica*. **Process Biochem.**, v.47, p. 1220-1227, 2012.
88. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v.62 , p. 197-212, 2010.

89. FERNANDEZ-LORENTE, G., CABRERA, Z., GODOY, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PALOMO, J.M., GUISÁN, J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v.43, p.1061–1067, 2008.
90. FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., MATEO, C., MUNILLA, R., ORTIZ, C., CABRERA, Z., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance. **Biomacromolecules**, v.7, p.2610-2615, 2006.
91. FILICE, M., MARCIELLO, M., BETANCOR, L., CARRASCOSA, A.V., GUISÁN, J.M., FERNANDEZ-LORENTE, G. Hydrolysis of Fish Oil by Hyperactivated *Rhizomucor miehei* Lipase Immobilized by Multipoint Anion Exchange. **Biotechnol Progress**, v.27, p. 961-968, 2011.
92. FOLMER, B., HOLMBERG, K., SVENSSON, M. Interaction of *Rhizomucor miehei* Lipase with an Amphoteric Surfactant at Different pH Values. **Langmuir**, v.13, p.5864-5869, 1997.
93. FONTES, N., PARTRIDGE, J., HALLING, P.J., BARREIROS, S. Zeolite molecular sieves have dramatic acid–base effects on enzymes in nonaqueous media. **Biotechnol. Bioeng.**, v.77, p. 296–305, 2002.
94. FORESTI, M.L., FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme Microb. Technol.**, v.40, p.769–777, 2007.
95. GARCIA-GALÁN, C., BERENQUER-MURCIA, A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R.C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Adv. Synth. Catal.**, v.353, p. 2885-2904, 2011.
96. GAO, S.L, WANG, Y.J, WANG, T., LUO, G.S, DAI, Y.Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. **Bioresource Technology**, v.100, p.996-999, 2009.
97. GHAMGUI, H., KARRA-CHAÂBOUNI, M., BEZZINE, S., MILED, N., GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme Microb. Technol.**, v.38, p.788-794, 2006.
98. GHAMGUI, H., KARRA-CHAÂBOUNI, M., GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between nhexane and solvent-free system. **Enzyme Microb. Technol.**, v.35, p. 355-36, 2004.
99. GHANDI, N. Applications of Lipase. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v.74, p. 621-634, 1997.
100. GHANDI, N., SAWANT, S.B, JOSHI, J.B. Studies on the Lipozyme catalized synthesis of butyl laurate. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 46, p.1-12, 1995.

101. GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v.63, p.1721-1754, 2007.
102. GODFREY, T.; WEST, S .The application of enzymes in industry.In: Godfrey T, Reichelt J (eds) Industrial enzymology, 2nd edn.The Nature Press, New York, p. 512, 1996.
103. GOG, A., ROMAN, M., TOS, M., PAIZS, C., IRIMIE, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and Perspectives. **Renewable Energy**, v.39, p.10-16, 2012.
104. GONSALVES, A.A., ARAÚJO, C.R.M., SOARES, N.A., GOULART, M.O.F., ABREU, F.C. Diferentes Estratégias para a reticulação da Quitosana. **Química Nova**, v. 34, n.7, p.1215-1223, 2011.
105. GOTOR-FERNANDEZ, V., BRIEVA, R., GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.40, p.111-120, 2006.
106. GOTOH, T., MATSUSHIMA,K., KIKUCHI, K.Y. Preparation of alginate-chitosan hybrid gel beads and adsorption of divalent metal ions. **Chemosphere**, v.55, p. 135-140, 2004.
107. GRUNWALD, P. **Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications**. 1. Ed. Londres: World Scientific Pub Co Inc, 2009., 1015 p.
108. GUBICZA, L., L.KABIRI-BADR, A., KEOVES, E., BELAFI-BAKO, K. Large-scale enzymatic production of natural flavor esters in organic solvents with continuous water removal. **Journal of Biotechnology**, v.84, p. 193–196, 2000.
109. GUISÁN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microb. Technol.**, v.10, p.375-382, 1988.
110. GUPTA, M.N.. Thermostabilization of proteins. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.14, p. 1-11, 1991.
111. GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.64, p. 763-781, 2004.
112. GUPTA, K.C., JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.43-54, 2006.
113. GUVENÇ, A., KAPUKU, N., MEHMETOGLU, U. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v.38,p. 379-386, 2002.
114. HABULIN, M., SABEDER, S., ZELJKO, K. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. **J. of Supercritical Fluids**, v.45, p.338–345, 2008.

115. HAKI, G.D., RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v.89, p. 17-34, 2003.
116. HASAN, F., SHAH, A.A, HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v.39, p.235-251, 2006.
117. HEDFORS, C. **Lipase chemoselectivity – kinetics and applications**. Licentiate Thesis. School of Biotechnology-Royal Institute of Technology. Estocolmo 2009.
118. HELISTÖ, P., KORPELA, T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 23, n. 1, p. 113-117, 1998.
119. HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 105, p. 601-607, 2003.
120. HOUDE, A., KADEMI, A., LEBLANCE, D., Lipases and their industrial applications – an overview. **Appl. Biochem. Biotech**, v. 118, p.155-170, 2004.
121. IDRIS, A., BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Adv.**, v. 30, p. 550-563, 2012.
122. ILLANES, Andres. Enzyme Biocatalysis Principles and Applications. Springer Science, 2008.
123. ISCI, A.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Recovery of strawberry aroma compounds by pervaporation. **J. Food. Eng.**, v. 75, p. 36-42, 2006.
124. JAEGER, K.E., REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **TRENDS in Biotechnology**, v.16, p.396-403, 1998.
125. JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B., REETZ, M. Bacterial Biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications on lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.
126. JAEGER, K.E., EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 390-397, 2002.
127. JAYAKUMAR, N., NWE, N., TOKURA, S., TAMURA, H.R. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 175-181, 2007.
128. JUANG, R.-S., WUB, F.-C., TSENG, R.-L. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. **Advances in Environmental Research**, v.6, p. 171-177, 2002.
129. KARTAL, F., JANSSEN, M.H.A., HOLLMANN, F., SHELDON, R.A., KILINC, A. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **J Mol Catal B: Enzymatic**, v. 71, p.85–89, 2011.

130. KASIMOVA, M.R, VELAZQUEZ-CAMPOY, A., NIELSEN, H.M. On the Temperature Dependence of Complex Formation between Chitosan and Proteins. **Biomacromolecules**, v.12, p.2534–2543, 2011.
131. KAUL, P., STOLZ, A., BANERJEE, U.C. Cross-linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis. **Adv. Synth. Catal.**, v.349, p. 2167-2176, 2007.
132. KEEHOON, W., JUNG-KI, H., KWANG-JE, K., SANG-JIN, M. Lipase catalyzed enantioselective esterification of racemic ibuprofen coupled with pervaporation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 264-269, 2006.
133. KISS, M.A., SEFANOVITS-BÁNYAI, E., TÓTH, A., BOROSS, L. Extractive Synthesis of Ethyl-Oleate Using Alginate Gel Co-Entrapped Yeast Cells and Lipase Enzyme. **Eng. Life Sci.**, v. 4, n.5, p. 460-464, 2004.
134. KIRAN, K.R., DIVAKAR, S. Preparation of o-palmitoyl alkyl lactates through lipase catalysis. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.18, p.121–124, 2002.
135. KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v.409, p. 241-246, 2001.
136. KNEZEVIC, Z., BOBIC, S., MILUTINOVIC, A., OBRADOVIC, B., MOJOVIC, L., BUGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 315-318. 2002.
137. KNEZEVIC, Z., MILOSAVIC, N., BEZBRADICA, D., JAKOVLJEVIC, Z., PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochem. Eng. Journal**, v.30, p. 269-278, 2006.
138. KOURIST, R., BORNSCHEUER, U.T. Biocatalytic synthesis of optically active tertiary alcohols. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 91, p. 505-517, 2011.
139. KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, v.35, p. 126-139, 2004.
140. KRIEGER, N., BHATNAGAR, T., BARATTI, J.C., BARON, A., LIMA, V., MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v.42, n.4, p.279-286, 2004.
141. KRISHNA, S.H., DIVAKAR, S., PRAPULLA, S.G., KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v.87, p.193-201, 2001.
142. KRISHNA, S.H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**, v. 20, p.239–267, 2002.
143. KRISHNA, S.H., MANOHAR, B., DIVAKAR, S., KARANTH, N.G. Lipase-Catalyzed Synthesis of Isoamyl Butyrate: Optimization by Response Surface Methodology. **J. American Oil Chem. Soc.**, v. 76, n. 12, p. 1483-1488, 1999.

144. KUMAR, G., BRISTOW, J.F, SMITH, P.J. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. **Polymer**, v.41, n.6, p.2157-2168, 2000.
145. KUMAR, R., MODAK, J., MADRAS, G. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, n.3, p.199-202, 2005.
146. KUMAR, M.N.R.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
147. LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K., VERGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.** , v. 30, p.81-87, 1987.
148. LABORET, F., PERRAUD, R. Lipase-catalyzed production of short-chain acids terpenyl esters of interest to the food industry. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.82,n.3,p. 185-198, 1999.
149. LALONDE, J., MARGOLIN, A. Immobilization of enzymes. In: Drauz, K., Waldmann H. (Eds). *Enzyme catalysis in organic chemistry*, 2.Ed. , Wiley-VCH, Weinheim, p. 163-184, 2002.
150. LANGRAND, G., TRIANTAPHYLIDES, C., BARATTI, J. Lipase catalyzed formation of flavor esters. **Biotechnol. Lett.** , v.10, p.549-554, 1988.
151. LANGRAND, G., RONDOT, N., TRIANTAPHYLIDES, C., BARATTI, J. Short chain flavor esters synthesis by microbial lipases. **Biotechnol. Lett.**, v.12, 581-586, 1990.
152. LARANJEIRA, M.C.M., FÁVERE, V.T. Quitosana: Biopolímero Funcional com potencial Industrial Biomédico. **Química Nova**, v.32, n.3, p.672-678, 2009.
153. LESSUISSE, E., SCHANCK, K., COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.216, n.1, p.155-160, 1993.
154. LI, N., BAI, R. A novel amine-shielded surface crosslinking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p.6692-6700, 2005.
155. LIMA, A.W.O., ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e Aplicações em Química Analítica. **Química Nova**, v.22, n.2, p.229-245, 1999.
156. LIMA, V.M.G., KRIEGER, N., MITCHELL, D.A., FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004.
157. LIU, W., CHEN, B., WANG, F., TAN, T., DENG, L. Lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters and properties characterization. **Process Biochemistry**, v. 46, p.1993–2000, 2011.

158. LIU, K.-J., LIU, K.-M., CHANG, H.-M. Biocatalytic synthesis of palmitoyl vanillylamide in supercritical carbon dioxide through amidation of vanillylamine hydrochloride and palmitic anhydride by lipase. **Food Chemistry**, v.102, n.4, p.1020–1026, 2007.
159. LIU, Y., LOTERO, E., GOODWIN, J.G. A comparison of the esterification of acetic acid with methanol using heterogeneous versus homogeneous acid catalysis. **Journal of Catalysis**, v.242, n.2, p. 278-286, 2006.
160. LIU, Y., LOTERO, E., GOODWIN, J.G. Effect of water on sulfuric acid catalyzed esterification. **J. Mol. Catal. A: Chemical**, v.245, n. (1-2), p. 132-140, 2006.
161. LONGO, M.A., SANROMÁN, M.A. Production of Food Aroma Compounds, **Food Technol. Biotechnol.**, v.44, n.3, p. 335–353, 2006.
162. LÓPEZ-SERRANO, P., CAO, L., van RANTWIJK, F., SHELDON, R.A. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. **Biotechnol Lett.**, v.24, p.1379-1383, 2002.
163. LÓPEZ, N., PERNAS, M.A., PASTRANA, L.M., SANCHEZ, A., VALERO, F., RUA, M. L. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 65, 2004.
164. LÓPEZ-GALLEGO, F., MONTES, T., FUENTES, M., ALONSO, N., GRAZU, V., BETANCOR, L., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved Stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnol**, v.116, p. 1-10, 2005.
165. LORTIE, R. Enzyme Catalyzed Esterification. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 1. p. 1-15, 1997.
166. LU, J., NIE, K., XIE, F., WANG, F., TAN, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida sp* 99-125. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1367–1370, 2007.
167. MAHAPATRA, P., KUMARI, A., GARLAPATI, V.J., BANERJEE, R., NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **J Mol Catal B: Enzymatic**, v.60, p.230–239, 2009.
168. MAJUMDER, A.B., MONDAL, K., SINGH, T.P., GUPTA, M.N. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. **Biocatal. Biotransformation**, v.26, p. 235-242, 2008.
169. MARTINIELLE, M., HOLMQUIST, M., HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v 1258, p. 272-276, 1995.

170. MARTINS, A.B., GRAEBIN, N.G., LORENZONI, A.S.G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., AYUB, M.A.Z., RODRIGUES, R.C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, p.2311–2316, 2011.
171. MATEO, C., PALOMO, J.M, FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISÁN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.**, v.40, p.1451-1463, 2007.
172. MEDEIROS, C.R. **Otimização da síntese de ésteres usados na indústria de sabores e aromas**. 2008. 38p. Monografia de Estágio Supervisionado. Departamento de Química -Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC.
173. MENDES, A.A., RODRIGUES, D.S., ADRIANO, W.S., MAMMARELLA, E.J., de CASTRO, H.F., GIORDANO, R.L.C. Covalent Attachment of *Aspergillus oryzae* Lipase on Chemically Bound Hybrid Matrices. 10 th International Conference on Chitin and Chitosan, Montpellier-FR, Livro de Abstracts, v.1, p-95-96, 2006.
174. MENDES, A.A., GIORDANO, R.C., GIORDANO, R.L.C., de CASTRO, H.F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-reyn affinity: Application of the biocatalyst in biodiesel synthesis. **J Mol Catal B: Enzymatic**, v. 68, p. 109-115, 2011.
175. MICHAUX, F., ZOUMPANIOTI, M., PAPAMENTZELOPOULO, M., STÉBÉ, M.J., BLIN, J.L., XENAKIS, A. Immobilization and activity of *Rhizomucor miehei* lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants. **Process Biochemistry**, v.45, p.39-46, 2010.
176. MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M.J., WALDRON, K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v.37, n.5, p.790-802, 2004.
177. MILETIC, N., VUKOVI, Z., NASTASOVI, A., LOSS, K. Macroporous poly glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins-Versatile immobilization supports for biocatalysts. **J Mol Catal B: Enzymatic**, v.56, p.196–201, 2009.
178. MOGENSEN, J.E., SEHGAL, P., OETZEN, D.E. Activation, Inhibition, and Destabilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Detergents. **Biochemistry**, v.44, p. 1719-1730, 2005.
179. MONSÁN, P. Optimization of Glutaraldehyde Activation of a Support for Enzyme Immobilization. **J. Mol. Catal.**, v.3, p. 371-384, 1977/1978.
180. MONTEIRO JR., O.A.C., AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **Internation Journal of Biological Macromolecules**, v.26, p.119-128, 1999.

181. NAOE, K., AWATSU, S., YAMADA, Y., KAWAGOE, M., NAGAYAMA, K., IMAI, M. Solvent condition in triolein hydrolysis by *Rhizopus delemar* lipase using an AOT reverse micellar system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, p. 49-55, 2004.
182. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em : < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em: 02 dez. 2012.
183. NIETO, I., ROCCHIETTI, S., UBIALI, D., SPERANZA, G., MORELLI, C.F., FUENTES, I.E., ALCANTARA, A.R., TERRENI, M. Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract—enzymatic resolution of (R,S)-2-tetralol. **Enzyme Microb. Technol.**, v.37, p.514–520, 2005.
184. NINI, L., SARDA, L., LOUIS-CLAUDE, C., BOITARD, E., JEAN-PAUL, D.D., CHAHINIAN, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1534, p. 34-44, 2001.
185. NORIN, M., HAEFFNER, F., ACHOUR, A., NORIN, T., HULT, K. Computer modelling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* and *Candida rugosa*. **Protein Sci.**, v.3, p.1493-1503, 1994.
186. NUNES, G.F.M., PAULA, A.V., CASTRO, H.F., SANTOS, J.C. Modificação bioquímica da gordura do leite. **Química Nova**, v.33, n.2, p.431-437, 2010.
187. OGINO, H., NAKAGAWA, S., SHINIA, K., MUTO, T., FUJIMURA, N., YASUDA, M., ISHIKAWA, H. Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, n.5, p.451-457, 2000.
188. OLEK, K., CHRISTENSEN, W. Lipases from *Candida Antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research & Development**, v. 6, p.446-451, 2002.
189. ORREGO, C.E, VALENCIA, J.S., ZAPATA, C. *Candida rugosa* Lipase Supported on High Crystallinity Chitosan as Biocatalyst for the Synthesis of 1-Butyl Oleate. **Catal. Lett.**, v.129, p.312-322, 2009.
190. OTERO, C., BALLESTEROS, A., GUISÁN, J.M. Immobilization/Stabilization of Lipase from *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.19, p.163-175, 1988.
191. OZYILMAZ, G., ESRA, G. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.64, p. 140-145, 2010.
192. OZYILMAZ, G. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.56, p. 231-236, 2009.
193. OZYILMAZ, G., GEZER, E. Production of aroma esters by immobilised *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 64, p. 140–145, 2010.

194. PAHOJA, V.M., SETHAR, M.A. A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms. **Pakistan Journal of Applied Science**, v. 2, n.4, p. 474-484, 2002.
195. PAIVA, A.L., BALCÃO, V.M., MALCATA, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v.27, p.187-204, 2000.
196. PALOMO, J.M, SEGURA, R.I, FERNÁNDEZ-LORENTE, G., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst. **Enzyme Microb. Technol.**, v.40, p.704-707, 2007.
197. PALOMO, J.M., FUENTES, M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO,C., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality. **Biomacromolecules**, v.4, p.1-6, 2003.
198. PALOMO,J.M.,MUNOZ, G., FERNANDEZ-LORENTE, G.,MATEO, C.,FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISAN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. . **J. Mol. Catal. B:Enzymatic.**, v. 19, p. 279-286, 2002.
199. PAQUES, F. W., MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, p. 93-99, 2006.
200. PATIL, K.J., MANOJKUMAR, Z.C., RAGHUNATH, T.M.Lipases biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 8, p.971-982, 2011.
201. PAULA, A.V, MOREIRA, A.B.R., BRAGA, L.P., de CASTRO, H.F., BRUNO, L.M. Comparação do desempenho da lipases de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de Polissiloxano-Polivinilacool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v.31, p. 35-40, 2008.
202. PCHELINTSEV, N.A., YOUSHKO, M.I., SVEDAS, V.K. Quantitative characteristic of the catalytic properties and microstructure of cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase. **J. Mol. Catal. B:Enzymatic**, v.56, p.202-207, 2003.
203. PEDROCHE, J., del MAR YUST, M., MATEO,C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GIRON-CALLE, J., ALAIZ, M. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme Microb. Technol.**, v.40, p.1160-1166, 2007.
204. PEREIRA, C. C.; RUFINO, J. R. M.; HABERT, A. C.; NOBREGA, R.; CABRAL, L. M. C.; BORGES, C. P. Aroma compounds recovery of tropical fruit juice by pervaporation: membrane material selection and process evaluation. **J. Food. Eng.**, v. 66, p. 77-87, 2005.

205. PERES, C., HARPER, N., da SILVA, M.D.R.G., BARREIROS, S. Effect of zeolites on lipase catalized esterification on nonaqueous media. **Enzyme Microb. Technol.**, v.37, p.145–149, 2005.
206. PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.
207. PETERSEN, M.T.N., FOJAN, P., PETERSEN, S.B. How do Lipases and Esterases Work. **Journal of Biotechnol.** 2001; 85:115-147.
208. PFEFFER, J., RICHTER, S., NIEVELER, J., HANSEN, C.-E., BEL RHLID, R., SCHMID, R. D., RUSNAK, M. High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the metylo-trophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.72, n.5, p.931-938, 2006.
209. PIRES-CABRAL, P., da FONSECA, M.M.R., FERREIRA-DIAS, S. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. **Biochem. Eng. Journal**, v. 43, p.327-332, 2009.
210. PIERRE, A.C. The sol-gel encapsulation of enzymes. **Biocatal. Biotransformation**, v.22, p. 145-170, 2004.
211. PLEISS, J., FISCHER, M., SCHMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty binding site. **Chem. Phys Lipids**, v.93, p. 67-80, 1998.
212. PLEISS, J., FISCHER, M., PEIKER, M. Lipase Engineering Database Understanding and Exploiting Sequence-Structure-Function Relationships. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.10, p. 491-508, 2000.
213. PORTO, T.F., SILVA, M.L.C.P., SILVA, G.L.J.P., CASTRO, H.F. Atividade catalítica e estabilidade operacional da lipase microbiana imobilizada em fosfato de zircônio. In: XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química-Anais do XIV COBEQ, Natal-RN, 2002.
214. POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.
215. PRAPULLA, S.G., CHOWDARY, G.V. Kinetic study on lipase-catalyzed esterification in organic solvents. **Indian Journal of Chemistry** 2005; 44B-2322-2327.
216. PRASHANTH, K. V. H, THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.117-131, 2007.
217. RADZI, S. M., MUSTAFA, W.A.F., OTHMAN, S.S., NOOR, H.M. Green Synthesis of Butyl Acetate, A Pineapple Flavour via Lipase-Catalyzed Reaction. **World Academy of Science Engineering and Technology**, v. 59, p. 677-680, 2011.

218. RAGHAVENDRA, T., SAYANIA, D., MADAMWAR, D. Synthesis of the “green apple ester” ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in mbgs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.63, p.31-38, 2010.
219. RAJENDRAN, A ., PALANISAMY, A., THANGAVELU, V. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52 n.1, p. 207-219, Jan/Feb 2009.
220. RAN, N., ZHAO, L., CHEN, Z., THAO, J. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. **Green Chem.**, v.10, p. 361–372, 2008.
221. RASOR, J.P., VOSS, E. Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. **Applied Catalysis A: General**, v.221, p. 145–158, 2001.
222. RIBEIRO, B.D., CASTRO, A.M., COELHO, M.A.Z., FREIRE, D.M.G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Res** 2011; doi:10.4061/2011/615803 (article ID 615803, 16 pp.).
223. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Prog. Polym. Sci.**, v.31, p. 603–632, 2006.
224. RODAS, A. C. D. **Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos**. 2004. 194f. Tese (Doutorado em Ciências, Tecnologia Nuclear-Aplicações) - Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares-IPEN, São Paulo, 2004.
225. RODRIGUEZ-NOGALES, J.M., ROURA, E., CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipases: a statistical approach. **Process Biochemistry**, v.40, p.63-68, 2005.
226. RODRIGUES, D.S., MENDES, A.A., ADRIANO, W.S., GONÇALVES, L.R.B. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.**, v.51,p. 100-109, 2008.
227. RODRIGUES, D.S., CAVALCANTE, G.P., SILVA, G.F., FERREIRA, A.L.O., GONÇALVES, L.R.B. Effect of additives on esterification activity of immobilized *Candida antarctica* lipase. **World J Microbiol Biotechnol** , v.24, p.833-839, 2008.
228. RODRIGUES, A.R., CABRAL, J.M.S., TAIPA, M.A. Immobilization of *Chromobacterium viscosum* lipase on Eudragit S-100: coupling, characterization and kinetic application in organic and biphasic media. **Enzyme Microb. Technol.**, v.31, p.133-141, 2002.
229. RODRIGUES, R.C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an Industrial Biocatalyst in Chemical Process. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.64, p. 1-22, 2010.
230. RODRIGUES, D. S., CAVALCANTE, G. P., FERREIRA, A. L. O., GONÇALVES, L. R. B. Gonçalves. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase

Type B by Adsorption on Activated Carbon. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, v.22 ,n.1,p. 125-133,2008.

231. RODRIGUES, R.C, BERENQUER-MURCIA, A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic performance of Enzymes. *Adv. Synth. Catal.* , v.353, p. 2216-2238, 2011.
232. ROMDHANE, I.-B., RHOMDANE, Z.B., GARGOURI, A., BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, v.68, p.230–239, 2011.
233. ROMERO, M.D., CALVO, L., ALBA, C., DANEESHFAR, A. kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. *J. Biotechnology*., v.127, p.269-277, 2007.
234. ROMERO, M.D., CALVO, L., ALBA, M., HABULIN, M., PRIMOŽIČ , M., KNEZ, Ž. Enzymatic synthesis of isoamil acetate with immobilized *Candida Antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. *Supercritical Fluids*, v.33, p. 77-84, 2005.
235. ROY, J.J., ABRAHAM, T.E. Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chem. Rev.*, v. 104, p.3705-3721, 2004.
236. RUIZ, C., JAVIER PASTOR, F.I., DIAZ, P. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 Lip A, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. *Let. Applied Microbiol.* , v.37, p.354–359, 2003.
237. ŠABEDER, S., HABULIN, M., ŽELJKO, K. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering*, v.77, n.4, p. 880-886, 2006.
238. SADANA, A., HENLEY, J.P. Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes. *Ann. N Y Acad. Sci.* , v. 501, p.73–79, 1987.
239. SALIS, A., PINNA, M., MONDUZZI, M., SOLINAS,V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* ,v.54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.
240. SÁNCHEZ-OTERO, M.G., VALERIO-ALFARO, G., GARCÍA-GALINDO, H.S., OLIART-ROS, R.S. Immobilization in the presence of Triton X-100: modifications in activity and thermostability of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase. *J Ind Microbiol Biotechnol* , v.35, p.1687-1693, 2008.
241. SANTOS, J.C., de CASTRO, H.F. Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p.1007–101, 2006.
242. SANTOS, J. E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 112f. (Tese, Doutorado em Química Analítica).
243. SARDA, L., DESNUELE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 58, p. 513-521, 1958.

244. SAXENA R.K.; SHEORAN A.; GIRI B.; DAVIDSON W.S. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Meth.**, v. 52, p.18, 2003.
245. SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. Lipases and  $\alpha/\beta$  hidrolases fold. **Methods Enzymol.**, v.284 (A), p. 87-107, 1997.
246. SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*, **Nature**, v. 351, p. 761-764, 1991.
247. SCHMID, R.D.; VERGUER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angew Chem Int Ed**, v.37, p. 1608-1633, 1998.
248. SEBRÃO, D. ; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. G.; MOREIRA, M. A Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1182-1187, 2007.
249. SECUNDO, F., MIEHÉ-BRENDLÉ, J., CHERALU, C., FERRANDI, E.E., DUMITRIU, E.. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p.350-361, 2008.
250. SECUNDO, F., RIVA, S., CARREA, G. Effects of Medium and of Reaction Conditions on the Enantioselectivity of Lipases in Organic Solvents and Possible Rationales. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 3, p. 267-280, 1992.
251. SERRA, S., FUGANTI, C., BRENNAN E. Biocatalytic Preparation of natural flavours and fragrances. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 4, 2005.
252. SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. **Biotechnol. Advances.**, v. 19, p.627-662, 2001.
253. SHARMA, D., SHARMA, B., SHUKLA, A.K. Biotechnological approach of microbial lipase: A review. **Biotechnology**, v.10, p. 23-40, 2011.
254. SHAW, J.-F., CHANG, S.-W., LIAO, H.-F. , SHIEH, C.-J. Lipase-catalysed biosynthesis of hexyl butyrate by direct esterification: optimization by response surface methodology. **J. Sci. Food Agric.**, v.83, n.14, p.1525–1530, 2003.
255. SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., van LANGEN, I.M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): a novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatal. Biotransformation**, v. 23, p. 141-147, 2005.
256. SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advance Synthesis & Catalysis**.v. 349, p.1289 – 1307, 2007a.
257. SHIEH, C.-J., LIAO, H.-F. , LEE, C.-C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresour. Technol.** 2003; v.88, p.103–106, 2003.
258. SHIEH, C.-J., LOU, Y.H. Five- factor response surface optimization of the enzymatic synthesis of citronellyl butyrate by lipase IM77 from *Mucor miehei*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 77, n.5, p. 521-525, 2000.

259. SHIEH, C.-J., AKOH, C.C., YEE, L.N. Optimized Enzymatic Synthesis of Geranyl Butyrate with Lipase AY from *Candida rugosa*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 51, p. 371-374, 1996.
260. SHU, Z.Y, YANG, J.K, YAN, Y.J . Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chinese Journal of Biotechnology** , v.23, n. 1, p. 96-100, 2007.
261. SILVA, Jaqueline Maria Ramos. **Epoxidação químico-enzimática do citronelol e  $\beta$ -cariofileno**. 2012. Dissertação ( Mestrado em Química Orgânica)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
262. SILVA, J.A., MACEDO, G.P., RODRIGUES, D.S., GIORDANO, R.L.C., GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v.60, p.16– 24, 2012.
263. SINGH, S., BANERJEE, U.C. Enantioselective hydrolysis of methoxyphenyl glycidic acid methyl ester [ $\pm$  -MPGM] by a thermostable and alkalostable lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J Mol Catal B: Enzymatic**, v.36, p. 30-35, 2005.
264. SKAGERLIND, P., JANSSON, M., BERGENSTAHL, B., HULT, K. Binding of *Rhizomucor miehei* lipase to emulsion interfaces and its interference with surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** ,v.4, p.129- 135,1995.
265. SRIANTA, I., NUGERAHANI, I., KUSUMAWATI, N. Production of polyunsaturated fatty acids with *Rhizomucor miehei* by submerged fermentation. **As. J. Food Ag-Ind**, v.3, n.2, p. 293-300, 2010.
266. STRAATHOF, A.J.J., PANKE, S., SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.548-556, 2002.
267. SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1543, p. 223-238, 2000.
268. TAPIA, C., ESCOBAR, Z., COSTA, E., SAPAG-HAGAR, j., VALENZUELA, F., BASUALTO, C., GAI, M.N., YAZDANI-PEDRAM, M. Comparative studie on polyelectrolyte complexes and mixtures of alginate-chitosan-carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p. 65-75,2004.
269. TARDIOLI, P.V. **Hidrólise controlada de proteínas de Soro de Queijo Usando Carboxipeptidase A e Alcalase® Imobilizadas Multipontualmente em Agarose**. 2003.173f. Tese (Doutorado em Engenharia Química).Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos,São Carlos, 2003.
270. TAUCHI, T.; SADUMA, H.; OHNO, T.; MASE, N.; YODA, H.; TAKABE, K.; Lipase catalyzed kinetic resolution of tetronic acid derivatives bearing a chiral quaternary carbon: total synthesis of (S)-(R)-vertinolide”, **Tetrahedron: Asymmetry**, v.17,p. 2195–2198, 2006

271. THAKAR, A., MADAMWAR, D. Enhanced ethyl butyrate production by surfactant coated lipase immobilized on silica. **Process Biochemistry**, v.40, p.3263-3266, 2005.
272. THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the lid hydrophobic pattern in Pancreatic Lipase Activity. **J. Biol. Chem.**, v. 280, 40074-40083, 2005.
273. TOMIC, S.; RAMEK, M. Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 38, n. 3-6, p. 139-14, 2006.
274. TORRES-SALAS, P., MONTE-MARTINEZ, A., CUTIÑO-AVILA, B., RODRIGUEZ-COLINAS, B., ALCALDE, M., BALLESTEROS, A.O., PLOU, F.J. Immobilized Biocatalysts: Novel Approaches and Tools for Binding Enzymes to Supports. **Adv. Mater.**, v. 23, p. 5275-5282, 2011.
275. TORRES, M.C.L., SOARES, N.F.F., MAIA, J. PARÂMETROS CINÉTICOS DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE E SUA ATIVAÇÃO POR EXTRATOS DE VEGETAIS. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, n.2, p. 243-248, abr.-jun. 2004.
276. TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S., PIETRO, R. C. L. C. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. Leggis Suma, Cap. 4, p-35-38, 2004.
277. TUFVESSON, P., TÖRNVALL, U., CARVALHO, J., KARLSSON, A. J., HATTI-KAUL, R. Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals. **J Mol Catal B: Enzymatic**, v.68, p. 200-205, 2011.
278. UHLIG, H. Industrial Enzymes and their Applications, John Wiley & Sons, Inc.; Toronto, Canada, 1998.
279. VARMA, A.J., DESHPANDE, S., KENEDDY, J.F. Metal complexation by chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v.55, p.77-93, 2004.
280. VARMA, A.J., MADRAS, G. Kinetics of synthesis of butyl butyrate by esterification and transesterification in supercritical carbon dioxide. **J Chem. Technol. Biotechnol.**, v.83, n.8, p. 1135-1144, 2008.
281. VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **TRENDS in Biotechnology** , v.15, p. 32-38, 1997.
282. VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 515-536, 2007.
283. VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J.M., GRAILLE, J., HASS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**. v.9, p.113-148, 2000.
284. VITOLO, M. **Imobilização de Enzimas**. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. and SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo. Ed: Edgard Blucher, 2001a.

285. VULFSON, E.N. Industrial applications of lipases. In: Wooley P. Peterson S.B. Ed. Lipases-their structure, biochemistry and applications. Cambridge: Cambridge University Press; p. 271-288, 1994.
286. WILSON, L., PALOMO, J.M., FERNANDEZ-LORENTE, G., ILLANES, A., GUISÁN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes sp.* via strong adsorption on hydrophobic supports. **Enzyme Microb. Technol.**, v.38, p.975-980, 2006.
287. WEBER, N., BERGANDER, K., FEHLING, E., KLEIN, E., VOSMANN, K., MUKHERJEE, K.D. Copolymeric polythioesters by lipase-catalyzed thioesterification and transtioesterification of  $\alpha$ ,  $\omega$ -alkanedithiols. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.70, p.290-297, 2006.
288. WEHTJE, E., KAUR, J., ADLERCREUTZ, P., CHAND, S., MATTIASSON, B. Water activity control in enzymic esterification processes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 21, n.7, p.502-510, 1997.
289. WINKLER, F.K., D'ARCY, A., HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.
290. WUBBOLTS, M.G., BUCKE, C., BIELEKI, S. How to get the biocatalyst. In: Applied Biocatalysis. Ed Straathof, A.J.J, Adlercreutz. P. Academic Publishers Amsterdam, p. 153-211, Haword, Netherlands, 2000.
291. YADAV, G.D., TRIVEDI, A.H.. Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 32, p.783-79, 2003.
292. YADAV, G.D., LATHI, P.S. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilized lipases. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p.245-252, 2003.
293. YADAV, G.D., SAJGURE, A.D. Synergism of microwave irradiation and enzyme catalysis in synthesis of isoniazid. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 82, n.11, p. 964-970, 2007.
294. YADAV, G.D., DEVI, K.M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chem. Eng. Sci.**, v. 59, p. 373-383, 2004.
295. YAHIA, A.R.M., ANDERSON, W.A., MOO-YOUN, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme Microb. Technol.**, v.23, p.438-450, 1998.
296. YAHIA, A.R.M., ANDERSON, W.A., MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme Microb. Technol.**, v.23, p.438-450, 1998.
297. YAN, Y., BORNSCHEUER, U.T., CAO, L., SCHMID, R.D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, p. 725-728, 1999.

298. YI, H., WU, L.-Q., BENTLEY, W.E., GHODSSI, R., RUBLOFF, G.W., CULVER, J.N., PAYNE, G.F. Biofabrication with Chitosan. **Biomacromolecules**, v.6, n.6, p.2882-2894, 2005.
299. YONG, Y.P., AL-DURI, B. Kinetic studies of immobilized lipase esterification of oleic acid and octanol. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 65, p. 239-248, 1996.
300. YU, C-Y, YIN, B.-C, ZHANG, W., CHENG, S.-X., ZHANG, X.-Z, ZHUO, R.-X. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug released property. **Colloid and Surfaces B: Biointerfaces**, v.68, p.245-249, 2009.
301. ZAIDI, A., GAINER, J.L., CARTA, G., MRANI, A., KADIRI, T., BELARBY, Y. Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipases in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. **Journal of Biotechnol.**, v.93, p. 209-216, 2002.
302. ZHAO, X.G., WEI, D.Z., SONG, A. A facile enzymatic process for the preparation of ibuprofen ester prodrug in organic media. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.36, n. 1-6, p. 47-53, 2005.

**ANEXO(S)**

**ANEXO A - Artigo submetido à PROCESS BIOCHEMISTRY**

**Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on chitosan. Effect of the presence of surfactants and immobilization conditions on catalysts' properties**

Ulisses M. F. de Oliveira<sup>1</sup>, Leonardo J.B. Lima de Matos<sup>1</sup>, Maria Cristiane M. DE Souza<sup>1</sup>, José C. S. Santos<sup>1</sup>, Luciana R. B. Gonçalves<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará. Campus do Pici, Bloco 709. CEP 60455-760 – Fortaleza-CE. [lrg@ufc.br](mailto:lrg@ufc.br).

**\*Corresponding author:** Luciana Rocha Barros Gonçalves

Departamento de Engenharia Química

Universidade Federal do Ceará

Campus do Pici, Bloco 709, Fortaleza, CE

Zip code: 60455-760

phone +55 85 4008-9611; fax: +55 85 4008-9610;

e-mail: [lrg@ufc.br](mailto:lrg@ufc.br)

alternative email : [lrgufc@gmail.com](mailto:lrgufc@gmail.com)

## Abstract

Lipase from *Rhizomucor miehei* (RML) was immobilized onto chitosan support in the presence of some surfactants added at low levels using two different strategies. First, lipases were immobilized in the presence of surfactants on chitosan supports previously activated with glutaraldehyde. Then, chitosan was crosslinked with glutaraldehyde after prior enzyme adsorption. The effects of surfactant concentrations on the activities of soluble and immobilized RML were evaluated. Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) promoted a great inhibition of enzyme activity while the non-ionic surfactant Triton X-100 caused a slight increase in the catalytic activity of soluble enzyme and the derivatives produced in both methods of immobilization. The best results were achieved for the second immobilization strategy at 4 °C, 1 h, 220 rpm in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.23%. The derivatives obtained under these conditions showed high catalytic activity and good thermal stability at 60° and 37°C. The best derivative was evaluated in the synthesis of two flavor esters (methyl butyrate and butyl butyrate) and esterification yields were similar to those obtained when the commercial enzyme Lipozyme® was used in the same reaction conditions.

**Keywords:** RML hyperactivation; surfactants; immobilization; chitosan; ester synthesis

## **1. Introduction**

Lipases (glycerol ester hydrolases E.C. 3.1.1.3) are biocatalysts with excellent properties that can be useful in many biotechnological applications: high activity under mild conditions of temperature and pH, relatively low cost of production, do not require cofactors, high enantio- regio-selectivity and high substrate specificity. The versatility of these enzymes leads to various applications in food and flavour making, pharmaceutical and cosmetic industries, among others [1-4]

Despite the advantages of these biocatalysts, problems arise when these enzymes are utilized in its soluble form. They are unstable on moderately high temperatures and solvents and hard to be recovered from the reaction medium [5]. Therefore, immobilization is often requested for most of the industrial applications involving these enzymes. Immobilization of lipases on an insoluble support can overcome the mentioned limitations, avoiding product contamination, diminishing thermal deactivation of the enzyme and allowing easy biocatalyst recovery, reuse and continuous operation, minimizing downstream process costs as well as environmental impact. Lipases have been immobilized using several types of carriers and by numerous methods like physical adsorption, covalent attachment to a solid matrix, entrapment or encapsulation in an insoluble carrier. Various inorganic and organic supports have been used for the immobilization of lipases. However, the high cost of some materials like silica-based carriers, acrylic resins, synthetic polymers and exchange resins, as well as the techniques commonly used on immobilization of these enzymes, significantly increases the costs of biocatalysts. Among several supports employed for the immobilization of lipases, chitosan has shown suitable properties for this purpose[6-8]

Chitosan is a low-cost linear  $\beta$ -1, 4-linked polysaccharide that is obtained by the partial deacetylation of chitin. Chitin is an abundant raw material found in cell walls of some fungi and especially in the shells of some shellfish (mainly shrimp, lobster, krill and crabs), wastes of the seafood industry [9]. Chitosan has found wide application in the immobilization of enzymes to present very attractive properties such as hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability, nontoxicity, physiological inertness also possessing high affinity for proteins [10-11].

Due to its amine groups, chitosan is a cationic polyelectrolyte ( $pK_a = 6.5$ ) being insoluble in neutral aqueous solutions, but it is soluble in acidic solutions below pH 6.5.

This biopolymer has hydroxyl and reactive amine groups in its structure amenable to modification with bifunctional reagents such as glycidol and glutaraldehyde [12].

Chitosan amine groups can directly react with glutaraldehyde to generate aldehyde groups, which in turn binds to the enzyme due to formation of an imine bond (Schiff's bases) with the amine groups of side chains of amino acids of the enzyme, such as  $\epsilon$ -lysine or  $\alpha$ -amine terminal groups [13]. Immobilization of lipases onto glutaraldehyde-pretreated chitosan has been described in literature by some authors [14-15]

*R. miehei* lipases in an homogeneous aqueous solutions exhibit two different conformations in equilibrium: a closed form (inactive) where the catalytic site of the enzyme is secluded from the reaction medium by means of a helicoidal polypeptide chain (flat or lid) and the second form (open form) active, where this lid is fully displaced in the presence of hydrophobic surfaces exposing the catalytic site of the enzyme to the reaction medium [16-19].

Thus, a suitable method to obtain biocatalysts with high catalytical activity should try to immobilize these enzymes in a given support in their most active form (open form) [20].

In this sense, some strategies such as the immobilization of lipases on porous

hydrophobic supports or in the presence of additives like surfactants have been proposed [21-23]. Several studies have shown that the presence of some surfactants stabilize the open form of lipases which can be fixed to a support via chemical or physical immobilization leading to the formation of hyperactivated biocatalysts [24]. In order to obtain biocatalysts with high catalytic efficiency *R. miehei* lipases were immobilized on chitosan support in the presence of some surfactants added at low concentrations. Two immobilization strategies were adopted. In the first, lipases were immobilized in the presence of surfactants on chitosan supports previously activated with glutaraldehyde. In the second protocol, chitosan was crosslinked with glutaraldehyde after prior adsorption of the enzymes. This study evaluated the influence of surfactants added at various concentrations levels on the enzymatic activity of soluble and immobilized enzymes. Although some studies on the use of surfactants for the stabilization of lipases have been reported, to our knowledge this is the first report on the use of surfactants to improve catalytical properties of immobilized *R. miehei* lipase.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Powdered chitosan, 85.2% deacetylation degree, was purchased from Polymar Ind Ltda (Ceará, Brazil). Soluble *R. miehei* lipase ( $128 \pm 3$  U/mL), Lipozyme<sup>®</sup> (immobilized lipase from *Mucor miehei*,  $> 30$  U.g<sup>-1</sup> against tristearin at pH 8.0 and 70 °C), p-nitrophenyl butyrate (pNPB) and Glutaraldehyde 25% (v/v) were acquired from Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). All other reagents and solvents used were of analytical grade.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Support preparation and activation: Preparation of chitosan beads

Powdered chitosan was dissolved in an acetic acid 5%v.v<sup>-1</sup> solution. The obtained solution of 2.5% (m.v<sup>-1</sup>) was dropped into a gently stirred NaOH 100mM solution at room temperature (ratio chitosan/NaOH = 1:10). After 24h, chitosan gel was washed exhaustively with distilled water until neutrality and then dried by vacuum filtration.

#### 2.2.2. Activation using glutaraldehyde

Chitosan gel was activated in sodium phosphate buffer solution 100 mM pH 7.0 containing 0,6% (v.v<sup>-1</sup>) glutaraldehyde (ratio  $V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$  1:10) for 60min at 25°C under slow stirring. After activation, chitosan support was washed thoroughly with distilled water to remove excess from the activating agent and then dried under vacuum.

### 2.2.3. Immobilization strategies

In this work, two immobilization strategies were performed, named: Immobilization strategy I and Immobilization strategy II.

Immobilization strategy I: In the first step chitosan gel was activated with glutaraldehyde according to the methodology described above. After that, activated support and the enzymes were incubated in the presence of surfactants under slow stirring for 5h at 25°C. Afterwards, the immobilized enzyme was washed several times with distilled water to remove excess of surfactant and glutaraldehyde and stored at 4°C.

Immobilization strategy II: *R. miehei* lipases (RML) were firstly adsorbed at the support in the presence of surfactants in phosphate buffer 100mM pH 7.0 under low agitation for 5h at 25°C. Then, chitosan was cross-linked with glutaraldehyde under the same conditions described for strategy I. The support containing the enzyme was washed with distilled water and stored at 4°C.

In all strategies, in order to evaluate enzyme deactivation during immobilization (control assay), a solution of RML was placed in a reactor under the same conditions of immobilization, but in the absence of support.

### 2.2.4. Assay of Hydrolytic Activity: Hydrolysis of pNPB

The hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate (pNPB) was used to follow the soluble and immobilized enzyme hydrolytic activities. Assays were performed by measuring the increase in the absorbance at 400 nm produced by the release of p-nitrophenol in the hydrolysis of 0.5 mM pNPB in 25 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C, according to the methodology described in the literature, with some modifications [25].

One unit of pNPB activity was defined as the amount of enzyme that is necessary to hydrolyze 1  $\mu$ mol of pNPB per minute (IU) under the conditions described.

#### 2.2.5. Assay of thermal stabilities of soluble and immobilized RML

Soluble and immobilized enzyme were incubated in a sodium phosphate buffer 25 mM and pH 7.0 at 37 °C or 60 °C. Periodically, samples were withdrawn and their residual hydrolytic activities were assayed. The single-step non first-order model, proposed by Sadana and Henley [26] was fitted to the experimental data. This model considers that a single step inactivation leads to a final state that exhibits a residual activity, which is very stable. The activity-time expression is expressed in equation 1:

$$A_R = (1 - \alpha) \times e^{-k_d t} + \alpha \quad (1)$$

where  $A_R$  is the residual activity (dimensionless), the ratio between the specific activity of the final state,  $A_{tf}$ , and one of the initial state,  $A_{t_0}$ ; and  $k_d$  is the first-order deactivation rate constant ( $\text{time}^{-1}$ ). With the exponential nonlinear decay model and its parameters, it was possible to determine the inactivation constant ( $k_d$ ) and the half-lives ( $t_{1/2}$ ) of the immobilized and soluble enzyme. Stabilization factor ( $S_F$ ) was given as the ratio between the half-life of the immobilized enzyme and the half-life ( $t_{1/2}$ ) of the soluble enzyme at the same conditions.

#### 2.2.6. Enzymatic synthesis of methyl and butyl butyrate

The esterification reactions were carried out in 125 mL glass stoppered flasks. The reaction mixture consisted of 20 mL of n-heptane and equimolar concentrations (0,1M) of butyric acid and related alcohols. To initiate the reaction, 150mg of the biocatalyst was added to the freshly prepared reaction medium and kept on orbital shaker (Tecnal TE-420, Piracicaba, Brazil) at 37 °C and 160 rpm. Before and after 24h reaction

aliquots of the reaction mixture were withdrawn and titrated against standard potassium hydroxide using phenolphthalein as an indicator to determine the residual acid concentration [27]. Ethanol was used as quenching agent [28]. The percentage of esterification was calculated from the acid consumed in the reaction mixture according to equation 2:

$$\text{Esterification}(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

where  $C_0$  is the true concentration of acid measured before the start of reaction and  $C$  is the residual acid concentration after 24 h reaction time. Control experiments were also conducted without lipase under similar reaction conditions.

#### 2.2.7. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The scanning electron microscopy analyses were performed in a TESCAN electron microscope SEM (Model VEGA / Xmu, Brno, Czech Republic) using accelerating voltage of 30kV. The samples were sputter-coated with gold prior to analysis.

### 2.3 Immobilization Parameters

The immobilization parameters: immobilization yield (IY), theoretical activity ( $At_t$ ) of immobilized lipase and recovery activity ( $At_r$ ) were calculated according to Silva *et. al.* (2012).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effect of surfactants on the activity of soluble RML

Several works [25,29] have shown that lipase activity can be further improved in the presence of surfactants and this effect has been attributed to breakdown of lipase aggregates (dimers) and/or the shift on the open-closed equilibrium of the individual enzyme molecules towards the open form more active. RML in homogenous aqueous

medium tends to form bimolecular aggregates (dimers) with reduced activity that may be broken by action of some surfactants [30,31]. Therefore, the effect of increasing concentrations of different surfactants on the activity of soluble RML was evaluated and results are shown in figure 1. The presence of different surfactants, added at various levels to the reaction medium, promoted different effects on the hydrolytic activity of soluble RML.

### **FIGURE 1.**

As can be seen in Figure 1, soluble RML exhibited a moderate increase in its activity (1.5-fold) in the presence of Triton X-100, using 0.015% of surfactant, the critical micellar concentration of this surfactant [32]. At concentrations above this level, the biocatalyst activity decreased markedly.

Soluble RML showed a nearly linear behavior in its hydrolytic activity after consecutive increments of SDS added reaching a maximum when the concentration of surfactant was 0.23%, around its critical micellar concentration (CMC), Figure 1. At this concentration the activity of soluble RML was approximately three times higher than the activity of soluble enzyme in the absence of surfactant. Above CMC, the enzyme activity declined but it was still higher when compared with enzyme activity in the absence of surfactant. The same behavior was observed on activity of soluble *Thermomyces lanuginosus* lipase against pNPB in the presence of that surfactant [25].

The different effects caused by the addition of surfactants on the activity of soluble lipases can be attributed to two factors. First, the detergents can act breaking the lipase-lipase aggregates rendering individual enzyme molecules that can be stabilized in their most active conformation (open form) with improved activities. Otherwise, the

detergents added at high concentrations behave as a competitive inhibitor due to formation of an enzyme-detergent complex, increasing the  $K_m$  value [25,33].

The presence of Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) in the reaction medium exerted a negative effect on the hydrolytic activity of the soluble RML. After a slight increase in enzyme activity when the surfactant was added at a low concentration (0.00015%), increasing amounts of surfactant resulted in a decrease in the hydrolytic activity of soluble enzyme. At concentrations above 0.1%, the surfactant led to complete inhibition of enzyme. Positive charged surfactants tends to form complexes with RML over a broad pH range, even below its isoelectrical point due to a combination of electrostatic or hydrophobic interactions or the presence of carboxylic groups in the enzyme with very low pKa values located adjacent to hydrophobic amino acid residues leading to activity reduction or enzyme inactivation [34-35].

Taking into account these preliminary results, the immobilizations were performed only in the presence of the surfactants Triton X-100 and SDS.

## **3.2. Effect of the presence of Surfactants on the Activity of the Immobilized enzyme**

### *3.2.1. Effect of Triton X-100*

In these experiments, Triton X-100 was added in the same range of concentrations used in earlier experiments to soluble RML. The results of the two immobilization strategies adopted in this study are displayed at Figure 2. In both strategies, the immobilization yields (IY) were quite similar varying in the interval of 80-99%. However in terms of relative activity the two immobilization strategies exhibited very significant differences.

## **FIGURE 2.**

The results displayed at figure 2 shows that the first immobilization strategy did not yield the desirable effects on the catalytic activities of the immobilized enzyme. A small increase in the activity of the immobilized enzyme was evidenced only when the surfactant concentration in the immobilization medium was 0.015%. Above this concentration value, the activities of the immobilized enzyme were strongly reduced to values lower than those obtained when the immobilization was carried out in the absence of surfactant.

In contrast, Figure 2 indicates that crosslinking with glutaraldehyde of lipases previously adsorbed on chitosan support in the presence of Triton X-100 seems to be the best choice to obtain derivatives with good catalytical properties.

Chitosan is a support which has hydrophilic characteristics while RML have a large number of non-polar amino acid in its structure. The RML adsorption onto chitosan support may be attributed to a combination of two interaction mechanism: (i) ionic, through charged amino acids (eg. Asp A. and Glu A.) of the protein with  $\text{NH}_3^+$  groups of chitosan on pH values near to its pKa where the fraction  $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$  approaches to 0,5 and (ii) through hydrophobic interactions ( e.g. van der Waals interactions) and hydrogen bonding involving  $\text{NH}_2/\text{OH}$  groups of the support [ 5,36].

Surfactant concentration greater than 0.00015% and up to 0.015% resulted in immobilized enzyme derivatives with improved catalytic activities as compared to the derivatives obtained when the first immobilization strategy was employed. As well as in the first strategy, maximum activity was observed when the concentration of surfactant added was 0.015%. Above this level, the derivative activity was appreciably diminished but to a lesser extent in comparison with activities of those derivatives produced in the first strategy or when the immobilizations were performed in the absence of surfactant.

On the immobilization of lipases from *Candida rugosa* (CRL) and isoforms A and B from *Candida antarctica* (CAL-A and CAL-b) at monoaminoethyl-N-aminoethyl (MANAE)-agarose beads Fernández-Lorente *et. al* 2006. showed that the treatment with 0,5% (v/v) glutaraldehyde at pH 7.0 of the previously adsorbed enzyme in the presence of 1% Triton X-100 permitted a significant increase in the enzyme derivatives toward some substrates. In contrast, when the detergent was added after the glutaraldehyde crosslinking no significant effect was observed after removal of the detergent. In our study, the best derivative was achieved when the washing of the detergent occurred after the reaction with glutaraldehyde ensuring that the surfactant was present during the crosslinking procedure.

In another work [37], the same author showed that Triton X-100 exerted the same positive effect on the immobilization of *Pseudomonas fluorescens* (PFL) lipase onto glyoxyl-agarose 6BCL at pH 10 and commercial CNBr-activated Sepharose 4BCL support at pH 7.0. In the first support maximum hyperactivation was reached at 0,1%(above cmc) Triton X-100 measured against p-nitrophenyl-palmitate (pNPP) while in the second one the maximal activity was achieved at 0,01% of the detergent. The authors have also demonstrated that in both cases lipases adsorbed at different supports in the presence of some surfactants may undergo alterations in its enantioselectivity with respect to different substrates.

At 0,1% triton X-100 *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase was immobilized at 25°C at pH 6.0 on porous polypropylene (Accurel EP-100) and an increase in lipolytic activity by a 4-5 fold factor was observed with respect to the lipolytic activity measured against p-nitrophenyl-laurate (pNFL) of the obtained enzyme derivatives in the absence of the surfactant [ 38 ].

Thus, the degree of hyperactivation of lipases is markedly influenced by the used enzyme, the characteristics and the concentration of the surfactant added to the medium of immobilization, the properties of the support, the immobilization conditions as well as the substrate used in the reactions.

These considerations may in part explain the slight differences between the above mentioned results as compared to our experiments.

### *3.2.2. Effect of SDS*

Figure 3 shows that unlike what was observed to immobilizations carried out in the presence of Triton X-100, the presence of SDS in the concentration range of 0.00015 to 0.23%, regardless of the immobilization strategy, was always accompanied of an almost linear increase in the activities of the immobilized enzyme derivatives. In both strategies, the maximum activity was achieved when the SDS concentration reached its CMC, around 0.23%. At this concentration, the activities of the derivatives were increased by a 2.9-fold factor and by a 3.4-fold, respectively, for the first and the second immobilization strategy. The results were very similar to the results obtained with soluble RML. Above the CMC value, the derivatives activities declined but yet these activities were higher than the activities measured for derivatives produced in the absence of surfactant.

In a recent work [ 24 ], RML was immobilized onto support with different characteristics using three immobilization protocols in the presence of anionic detergent sucrose laurate. When the enzyme was physically adsorbed on Q-Sepharose support, a strong anionic exchanger at pH 7.0 and 25 °C after prior purification and hyperactivation with 0,5% sucrose laurate, the enzyme immobilized derivatives preserved more than 90% of its hyperactivation eafter removal of the detergent. On CNBr-actived Sepharose (one-point immobilization), the hyperactivation was

completely removed after removal of the detergent. In multipoint covalent attachment at pH 10 on activated glyoxyl-Sepharose the enzyme lost 50% of its hyperactivation during immobilization and after removal of the detergent the entire value was lost. The best results obtained with the anionic exchanger was attributed to a possible change in the region with the highest density of negative charge involved in the adsorption when the closed form of the lipase is transformed into hyperactivated open form. Besides, the presence of the detergent induces a complex change in the enzyme's active center promoting too a structural rearrangement in the other regions of the enzyme.

These considerations can be to explain the results achieved in the actual work. Chitosan support at pH 7.0 is a policationic electrolyte acting as an ion exchanger like Q-Sepharose. Thus, the presence of the anionic surfactant SDS in the immobilization medium may cause the same structural change in the enzyme molecule leading to a stabilization of RML open form even after removal of the detergent. The data presented at Fig. 1 and Fig. 3 shows that no differences was observed on the relative activities of the soluble enzyme and the derivatives obtained when the second immobilization strategy was used. The results reported so far showed that SDS was more effective to obtain derivatives with higher catalytic activities as compared to the same derivatives achieved when Triton X-100 was used to RML immobilization on chitosan support. Therefore, further assays were performed in the presence of this surfactant at a concentration level of 0.23% by using the second immobilization strategy.

In order to check possible inhibition effects of long-term incubation of soluble RML on the presence of SDS, which was added to the immobilization medium in its critical micellar concentration, the hyperactivation kinetics of soluble RML was accompanied for five hours in the same conditions adopted by the two immobilizations methods in

the preliminary studies of RML immobilization on chitosan support. The results are shown on Figure 4.

#### **FIGURE 4.**

The results presented in Figure 4 shows that RML undergo a marked inhibition of their activities after prolonged exposure to SDS at the concentration added. After an intensive initial activation, the soluble enzyme activities started to decrease after few minutes of exposure at this surfactant concentration. However, Figure 4 also reveals that after an incubation time of fifty minutes, even with greatly diminished activity, the soluble enzyme exhibited a high activity as compared to soluble enzyme incubated in the absence of surfactant.

Taking into account the results of this assay and in order to minimize the effects of extended exposure of the enzymes to SDS under the conditions previously established new experiments were performed varying the immobilization conditions. Some factors such as temperature and agitation speed were studied. The immobilization time in all experiments was 1h and the support activation conditions were the same as used in previous experiments. Table 1 shows the effects of these parameters in the properties of the obtained biocatalysts.

#### **Table 1.**

The immobilization yields did not vary significantly. However, table 1 shows that the immobilized enzyme activities were markedly influenced by the immobilization conditions. Enzyme immobilization carried out for 1h in mild temperature and at high

agitation speed yielded biocatalysts with increased catalytic activities. By using the second immobilization method in the presence of 0.23% of SDS, the best immobilized enzyme derivatives were achieved when the immobilization temperature was kept at 4°C and the agitation speed was 220 rpm. Thus, these optimized conditions were used for further studies.

### **3.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Chitosan support may undergo considerable changes in its morphology after treatment with glutaraldehyde. The morphological changes on chitosan surface before and after crosslinking with glutaraldehyde was examined. Figure 5 shows four scanning electron microphotographs of (a) chitosan powder (CHIT), (b) CHIT/GLU 0.6% (v/v), (c) CHIT/GLU 5%(v/v), and (d) CHIT/GLU 0,6%(v/v) after the immobilization of RML.

#### **FIGURE 5.**

It can be observed that there's an accentuated difference between the chitosan powder (Fig. 5A) and the chitosan after treatment with glutaraldehyde. After activation, the chitosan surface becomes flatter providing a large contact area for enzyme immobilization (Fig 5B and Fig. 5C). The rounded structures (Fig. 5D) may be due to protein aggregates after RML immobilization [14-15].

These structural changes on chitosan may explain the high yields of RML immobilization on this support.

### 3.4. Thermal stability of the immobilized enzyme

The derivatives produced from strategy II in optimized conditions were subjected to thermal stability assay at 60 °C. The obtained results were compared with the thermal stability of the soluble RML and of a commercial derivative (Lipozyme®) at the same temperature. For each thermal stability assay, the half-life ( $t_{1/2}$ ) and the stabilization factor ( $S_F$ ) were determined.

In these assays, the effect of the concentration of the crosslinking agent on the activities and thermal stabilities of the immobilized enzyme was also evaluated. Some studies have pointed out that different concentrations of glutaraldehyde used on support activation can lead to significant alterations on the biocatalysts properties [12,39]. The results for these experiments are presented in Table 2 and Figure 6.

#### Table 2.

The results presented on Table 2 show that the immobilization yields in all experiments were quite similar. However, increased glutaraldehyde concentrations on the support activation yielded biocatalysts with low recovery activity as compared with those obtained when the used glutaraldehyde concentration on support activation was 0.6% and 1.5 % (v/v). The lower immobilized enzyme activities of CHIT-GLU 2.5 % and CHIT-GLU 5 % may be due to some distortion in enzyme tertiary structure caused by strong interaction between enzyme and the support used [40].

Furthermore, the high reactivity of this reactant also may have led to excessive crosslinking in the support leading to a decrease in the pore diameter, hindering the entrance of enzyme within the pores of the support [8,39].

The immobilized enzyme derivative that showed a higher stabilization factor ( $S_F$ ) was CHIT-GLU 0.6% (v/v), being approximately 76 times more stable than the soluble enzyme. The derivative CHIT-GLU 1.5% (v/v) was 60 times more stable than the soluble enzyme.

Recently, *Candida Antarctica* lipase was immobilized by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies [12]

At 60 °C the best derivative (Chitosan-Alginate hybrid crosslinking with 2% glutaraldehyde) showed a stabilization factor of 33 as compared with various obtained derivatives.

#### **FIGURE 6.**

The thermal stability of best derivative was also evaluated at 37°C. The results are shown in Figure 7.

#### **FIGURE 7.**

The results presented in Figure 7 show that the biocatalyst produced in optimum conditions during this study was very stable under mild temperature. After 120-h incubation time at 37 ° C, the derivative retained 89% of its initial activity indicating that the biocatalyst can be used for the synthesis of compounds that require long reaction times at this temperature without significant loss of its biocatalytical activity.

### **3.5. Influence of external and internal mass transfer limitations on the hydrolysis of pNPB**

To observe the effect of external mass transfer limitations, experiments were carried out by varying the agitation speeds from 200 to 800 rpm maintaining all other conditions constant. The offered enzyme load in these experiments was an  $8\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$  to ensure that the hydrolysis reaction under study occurred without internal diffusion effects.

Figure 8 shows the results of this set of experiments.

#### **FIGURE 8.**

As can be observed in Figure 8 the activity derivative increased progressively reaching a maximum at 600 rpm exhibiting slight decrease above this value, indicating that the external resistance transfer can be neglected at agitation speeds higher than the aforementioned value. The gradual increase in the agitation speed reduces the film thickness around the biocatalyst particles leading to a decrease on the effects of external mass transfer resistance [41].

In this study, further experiments were carried out in order to evaluate the adsorption capacity of chitosan gel and the hydrolytical activity of the derivatives obtained after addition of increasing amounts of the enzyme. RML were added in the range of 8-100  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{support}}$  ( $0,3\text{-}3,2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{support}}$ ). The results for these experiments are displayed in Figure 9.

#### **FIGURE 9.**

As can be seen in Figure 8, the hydrolytic activity of the immobilized enzyme increased as more lipase was loaded onto the support. However, in amounts above  $32 \text{ units}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{support}}$  (  $1,04 \text{ mg / g}$  of support), the activity per gram of support is not significantly altered, becoming nearly constant, since it is has more protein immobilized, but with the same activity.

When the results are stated in terms of efficiency (activity/loading), higher activities were obtained only when lower amounts of enzyme were added. The results suggest that for loadings over  $32 \text{ units}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{support}}$ , multilayer adsorption may occur, leading to blocking or hindering the diffusion of substrates to the active site of immobilized enzymes in the lower layers. This behavior has been reported by several authors in adsorption studies of *C. rugosa* and *C. antarctica* lipase on silica aerogel modified with methyl groups [42] and silica modified with octyl groups [43].

### **3.6. Synthesis of methyl and butyl butyrate**

The biocatalyst selected was used in the synthesis of some esters of commercial interest. The reaction yields obtained in the experimental conditions described previously were compared with the results observed for reactions carried out with the commercial enzyme Lipozyme ®. The results are shown in Figure 10.

#### **FIGURE 10.**

The results displayed in Figure 9 shows that the biocatalyst was very efficient in the synthesis of the esters investigated featuring reaction yields comparable to the yields obtained when the commercial enzyme was used in the same experimental conditions.

In the synthesis of methyl butyrate, when the selected derivative was used a maximum yield of 73% ( $73 \pm 4$ ) was observed while the commercial enzyme Lipozyme® showed a conversion yield of 77% ( $77 \pm 2$ ) after 24 h.

The reaction yield of butyl butyrate synthesis using Lipozyme® was 75% ( $75 \pm 2$ ) whereas the derivative showed an esterification yield of 62% ( $62 \pm 3$ ). It is worth mentioning that the reaction conditions for obtaining these esters were not optimized. Further studies will be carried out to establish the optimum conditions for the synthesis of these compounds.

This results is in agreement with other reports from the literature using lipases from different sources [44-45 ].

#### **4. Conclusions**

The results presented in this study clearly demonstrated that the use of low concentrations of some surfactants can be considered as a simple and efficient way to achieve biocatalysts with high catalytic activity. The maximum increase in RML activity not only on the soluble enzyme but also on the immobilized enzyme derivatives obtained was observed when the surfactants Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate (SDS) were added near their micellar critical concentrations (cmc). However, as observed for CTAB in our experiments, the surfactants may also exert some negative effects on the enzymatic activity behaving as an inhibitor or deactivating the enzyme even when added at low levels. Thus, it can be concluded that the surfactants favor the shifting of the closed-open form of RML towards the open forms, although it depends on the particular type of enzyme, the characteristics of support used in immobilization and the properties of the surfactant. Last but not least, the use of selected biocatalyst in the synthesis of some esters of commercial interest was also evaluated. In non-

optimized conditions, the esterification yields for the two esters used as models were similar to those obtained when the commercial enzyme Lipozyme® was used in the same reaction conditions indicating that the latter may be replaced by low cost biocatalysts with high efficiency. Thus, the results reported in this study show that the immobilization of RML lipase onto chitosan support in the presence of surfactants like SDS seems to be a good choice to getting biocatalysts with improved activity and which can be used with success to obtain products of great industrial interest.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Brazilian research-funding agencies FUNCAP, CNPq and CAPES.

### **References**

1. Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006), 235-251.
2. Gotor-Fernandez, V., Brieva, R., Gotor, V., Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* (2006) 111-120.
3. Gog, A , Roman, M., Tos, M., Paizs ,C., Irimie , F. D., Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and Perspectives, *Renewable Energy* 39 (2012) 10-16.

4. Aleu, J., Bustillo, A. J., Hernández-Galán, R., Collado, I. G., Biocatalysis Applied to the Synthesis of Agrochemicals, *Current Organic Chemistry* 10 (2006) 2037-2054.
5. Collins, S.E., Lassalle, V., Ferreira, M.L., FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor miehei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72 (2011) 220-228.
6. Orrego, C.E.; Valencia, J.S.; Zapata, C., *Candida rugosa* Lipase Supported on High Crystallinity Chitosan as Biocatalyst for the Synthesis of 1-Butyl Oleate, *Catal. Lett.* 129 (2009), 312-322.
7. Deng, H.-T., Lin, Y., Wang, J.-J., Liu, Z.-Y., Miao, M.A., Zheng, F., Comparative Study on the Immobilization of Lipase on Chitosan Gels Modified by Different Hydrophobic Groups, *Surface Review and Letters* 16 (2) (2009) 323–327.
8. Rodrigues, D. S., Mendes, A. A., Adriano, W. S., Gonçalves, L. R. B., Giordano, R. L. C., Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51 (3-4) (2008), 100-109.
9. 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* 22 (4) (2005) 529-38.
10. Krajewska, B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology* 35 (2004), 126–139.

11. Kasimova, M. R., Velazquez-Campoy, A., Nielsen, H.M., On the Temperature Dependence of Complex Formation between Chitosan and Proteins, *Biomacromolecules* 12 (2011) 2534–2543.
12. Silva J.A., Macedo, G.P., Rodrigues, D.S., Giordano, R.L.C., Gonçalves, L.R.B., Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies, *Biochemical Engineering Journal* 60 (2012) 16– 24.
13. Palomo, J.M., Segura, R.I., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports : A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007), 704-707.
14. Foresti, M.L., Ferreira, M.L., Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007) 769–777.
15. Romdhane, I.B.-B., Romdhane, Z.B., Gargouri, A., Belghith, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68 (2011) 230–239
16. Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., Menge, U., A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343 (1990) 767-770.
17. Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S. A., Thim, L., A model for

interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex, Nature 351 (1991) 491-494.

18. Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Turkenburg, J.P., Structure and Molecular-Model Refinement of *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase – A Case-study of the Simulated Annealing in Partial Annealing in Partial Model Refinement, Acta Crystallogr., Sect. B 48 (1992) 307-319

19. Derewenda, Z.S., Derewenda, U., The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1,9 Å resolution. J. Mol. Biol. 227 (1992) 818-839

20. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and Microbial Technology 40 (6) (2007), 1451-1463

21. Fernandez-Lorente G., Cabrera Z., Godoy, C., Fernandez-Lafuente, R. Palomo, J.M. Guisan, J.M., Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties, Process Biochem. 43 (2008), 1061–1067

22. López-Serrano, P. Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. Biotechnol. Lett. 24 (2002), 1379-1383

23. Nieto, I., Rocchietti, S., Ubiali, D., Speranza, G., Morelli, C.F., Fuentes, I.E., Alcantara, A.R., Terreni, M., Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract—enzymatic resolution of (R,S)-2-tetralol, Enzyme Microbial Technology 37(2005), 514–520.

24. Filice, M., Marciello, M., Betancor, L., Carrascosa, A.V., Guisán, J.M., Fernandez-Lorente, G., Hydrolysis of Fish Oil by Hyperactivated *Rhizomucor miehei* Lipase Immobilized by Multipoint Anion Exchange, *Biotechnol. Prog.* 27(4) (2011) 961-968
25. Mogensen, J.E., Sehgal, P., Otzen, D.E., Activation, Inhibition, and Destabilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Detergents, *Biochemistry* 44 (2005) 1719-1730.
26. Sadana, A., Henley, J.P. Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes, *Ann.N. Y. Acad. Sci.* 501 (1987) 73-79
27. Aragão, V.C., Porto, M. R.A., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J., Burkert, J.F.M, Response Surface Methodology Approach for the Synthesis of Ethyl Butyrate, *Food Technol. Biotechnol.*, 49 (1) (2011) 103-110
28. Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C., Daneeshfar, A., A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 269-277
29. Fernández-Lorente,G., Palomo, J.M., Mateo,C., Roberto Munilla, Ortiz,C., Cabrera, Z., Guisán, J.M. Fernández-Lafuente,R., Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance, *Biomacromolecules* 7 (2006) 2610-2615

30. Palomo, J.M., Fuentes, M., Fernández-Lorente,G., Mateo, C., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Funcionality, *Biomacromolecules* 4 (1) (2003) 1-6
31. Rodrigues, R.C; Fernandez-Lafuente, R., Lipase from *Rhizomucor miehei* as an Industrial Biocatalyst in Chemical Process,64 (1-2) (2010) 1-22
32. Helistö,P., Korpela,T., Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method, *Enzyme an Microbial Technology* (23)(1) (1998), 113-117
33. Fernández-Lorente,G., Palomo, J.M., Mateo,C., Roberto Munilla, Ortiz,C., Cabrera, Z., Guisán, J.M. Fernández-Lafuente,R., Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance, *Biomacromolecules* 7 (2006) 2610-2615.
34. Folmer, B., Holmberg, K., Svensson, M., Interaction of *Rhizomucor miehei* Lipase with an Amphoteric Surfactant at Different pH Values, *Langmuir* 13 (1997) 5864-5869
35. Skagerlind, P., Jansson, M. , Bergenståhl, B. , Hult ,K., Binding of *Rhizomucor miehei* lipase to emulsion interfaces and its interference with surfactants, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 4 (1995), 129- 135.

36. Ferreira, M. L., Gschaider, M.E., Theoretical and Experimental Study of  $Pb^{2+}$  and  $Hg^{2+}$  Adsorption on Biopolymers, 1. Theoretical Study, *Macromol. Biosci.* 1 (2001) 233-248.
37. Fernández-Lorente, R., Palomo, J.M., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M., Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium, *Biotechnology and Bioengineering*.97(2006) 242-250.
38. Sánchez-Otero, M.G., Valerio-Alfaro, G., García-Galindo, H.S., Oliart-Ros, R.S., Immobilization in the presence of Triton X-100: modifications in activity and thermostability of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 35 (2008) 1687-1693
39. Adriano, WS, Mendonça, DB, Rodrigues, DS, Mammarella, E.J., Giordano, RLC, Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin, *Biomacromolecules* 9 (2008) 2170-2179.
40. Ribeiro, B.D., Castro, A.M., Coelho, M.A.Z., Freire, D.M.G., Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production, *Enzyme Res.* (2011), doi:10.4061/2011/615803 (article ID 615803, 16 pp.)
41. Mahapatra, P., Kumari, A., garlapati, VJ, Banerjee, R., Nag, A., Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 60 (2009) 230–239

42. Gao, S. L., Wang, Y. J., Wang, T., Luo, G. S., Dai, Y. Y., Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. *Bioresource Technology* 100 (2) (2009), 996-999.
43. Blanco, R. M., Terreros, P., Munoz, N., Serra, E. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 47,(1-2) (2007) 13-20
44. Abbas, H, Comeau, L., Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp*, *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) 589–595
45. Paula, AV, Moreira, ABR, Braga, LP., de Castro, HF, Bruno, LM, Comparação do desempenho da lipases de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-Polivinilálcool empregando diferentes metodologias, *Química Nova*, 31 (1) (2008) 35-40

## Figure legends

Figure 1. Effect of surfactants on the activity of soluble RML against pNPB. Relative activity considers 100% the lipase activity in absence of surfactant. X-axis plotted in log scale. Squares, SDS; triangle, Triton X-100; circles, CTAB.

Figure 2. Effect of Triton X-100 on the activity against pNPB of Chitosan (CHIT) immobilized RML preparations. Experiments were performed as describe in Material and Methods. Relative activity considers 100% the lipase activity in absence of surfactant. X-axis plotted in log scale. square, strategy I; circle, strategy II.

Figure 3. Effect of SDS on the activity against pNPB of Chitosan (CHIT) immobilized RML preparations. Experiments were performed as describe in Material and Methods. Relative activity considers 100% the lipase activity in absence of surfactant. X-axis plotted in log scale. Triangle, strategy I; square, strategy II.

Figure 4. Time courses of the hyperactivation of soluble RML incubated in the presence of 0,23% SDS. Experiments were carried out as described in Materials and Methods section. The activity of the enzyme incubated in the absence of surfactant was assigned as 100%.

Figure 5. Scanning electron micrographs of the chitosan (CHIT) (a) chitosan powder (90 x) , (b) after crosslinking with glutaraldehyde (GLU) 0,6%(v/v) (1000 x) and (c) after crosslinking with glutaraldehyde (GLU) 5%(v/v) (1000x) and (d) after RML immobilization on chitosan crosslinking with glutaraldehyde 0,6% (v/v) (1000 x).

Figure 6. Thermal inactivation profile of soluble RML and chitosan-glutaraldehyde derivatives. Immobilization at pH 7.0, 4°C, 1 h., offered enzyme load of  $16 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ . Soluble enzyme and derivatives were incubated in a sodium phosphate buffer 25 mM, pH 7.0 at 60 °C : (○) soluble RML; (◆) CHI-GLU 0.6%; (●)CHI-GLU 1,5%; (△)CHI-GLU 2,5%; (▲)CHI-GLU 5%.

Figure 7. Time courses of the thermal inactivation of RML immobilized onto chitosan support in the presence of SDS 0,23%. Derivative was incubated at 37°C in a sodium phosphate buffer 25 mM, pH 7.0. Offered enzyme load:  $16 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Figure 8. Influence of the agitation speed on hydrolytic activity of *R. miehei* lipases (RML) immobilized on chitosan in the presence of SDS 0,23%. Offered enzyme load:  $8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Figure 9. Effect of lipase loading on hydrolytic activity (▲) and efficiency (○) for *R. miehei* lipases (RML) immobilized on chitosan in the presence of SDS 0,23%. Efficiency was the ratio between of the catalytic activity ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) and lipase loading ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Figure 10. Results for methyl butyrate and butyl butyrate synthesis using commercial enzyme Lipozyme® (light gray) and derivative produced (white).

Conditions: reaction time: 24h ; biocatalysts mass: 150mg; temperature: 37°C; agitation speed: 160 rpm; solvent: n-heptane; enzyme loaded:  $50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ; molar ratio (alcohol:acid): 1:1.

**Table 1:** Influence of the immobilization conditions on the activity of RML derivatives. Chitosan supports were activated with 0,6% (v/v) with glutaraldehyde for 1 h at 25°C; enzyme loaded: 16U enzyme.g<sup>-1</sup> of gel. Immobilization parameters: immobilization yield (I<sub>Y</sub>), recovered activity (A<sub>t<sub>rec.</sub></sub>), derivative activity (A<sub>t<sub>d.</sub></sub>), agitation speed (S<sub>ag.</sub>), immobilization temperature (T), immobilization time (t<sub>imob.</sub>).

% SDS	T <sub>imob</sub> (°C)	t <sub>imob.</sub> (h)	S <sub>ag.</sub> (rpm)	IY (%)	A <sub>t<sub>d.</sub></sub> (U <sub>pNPB</sub> ·g <sub>gel</sub> <sup>-1</sup> )	A <sub>t<sub>r.</sub></sub> (%)
0	4	1	220	100	4 ± 1	25 ± 2
0.23	4	1	220	96 ± 1	11	69 ± 1
0	25	5	50	94 ± 2	3	17 ± 2
0.23	25	5	50	99 ± 4	8 ± 1	50 ± 1
0	25	1	50	91 ± 1	4.0	27 ± 1
0.23	25	1	50	96 ± 1	9 ± 1	56 ± 2
0.23	25	1	220	96 ± 2	7	45 ± 1

**Table 2.** Thermal inactivation of soluble RML and chitosan-glutaraldehyde derivatives. Immobilization at pH 7, 4°C, for 1 h, offered enzyme load of 16 U· g<sub>gel</sub><sup>-1</sup>). Soluble enzyme and derivatives were incubated at 60 °C and pH 7.0. Parameters: immobilization yield (I<sub>Y</sub>), recovered activity (A<sub>t<sub>rec.</sub></sub>), derivative activity (A<sub>t<sub>d.</sub></sub>), half-life (t<sub>1/2</sub>) and stabilization factor (S<sub>F</sub>) at 60°C.

Biocatalyst	IY(%)	A <sub>t<sub>d.</sub></sub> (U <sub>pNPB</sub> ·g <sub>gel</sub> <sup>-1</sup> )	A <sub>t<sub>rec.</sub></sub> (%)	t <sub>1/2</sub> (min)	Stabilization fator (S <sub>F</sub> )
Soluble RML	-	-	-	0.7	
Lipozyme®	-	-	-		
CHIT-GLU 0.6 %	96±1	11	69 ± 1	53 ± 12	76 ± 16
CHIT-GLU 1.5 %	93 ± 1	7.5	50 ± 1	42 ± 7	60 ± 18
CHIT-GLU 2.5 %	97 ± 1	7.2	47 ± 1	17 ± 3	24 ± 5
CHIT-GLU 5 %	97 ± 1	7.5	48 ± 2	26	37

\*\*Figures with a separate page for each one.

### Figures

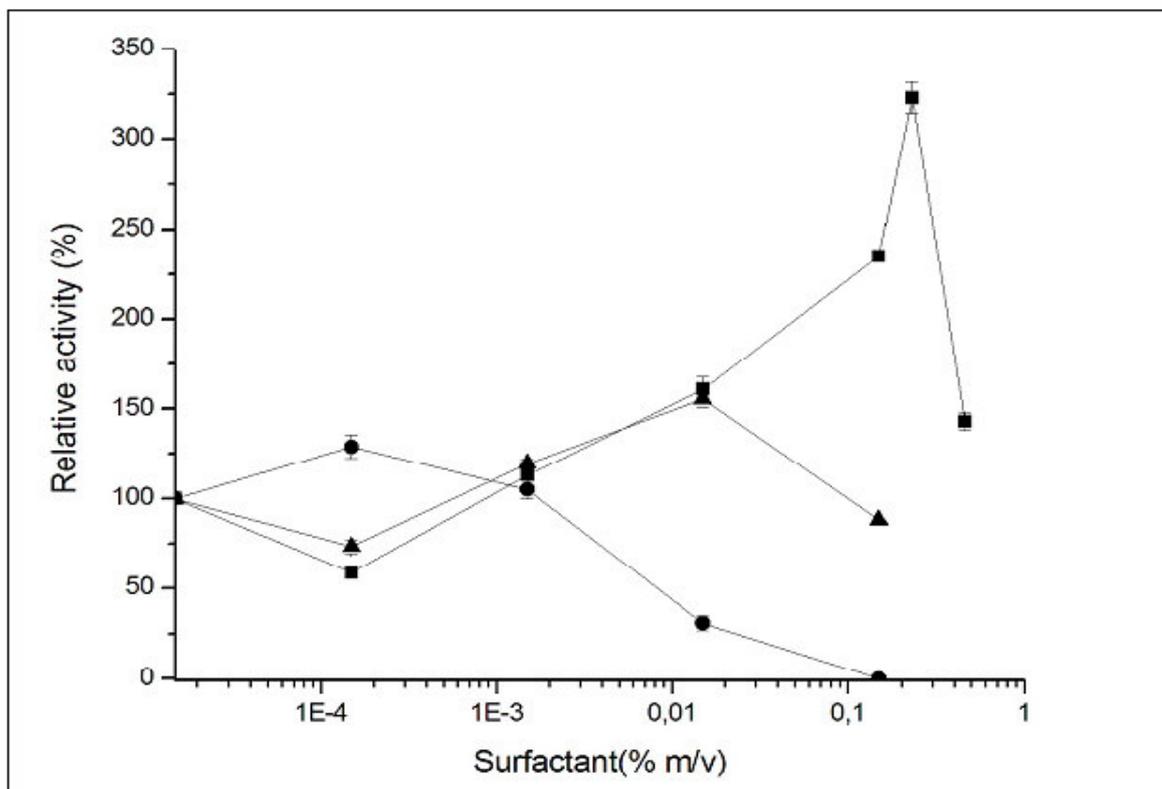


Figure 1.

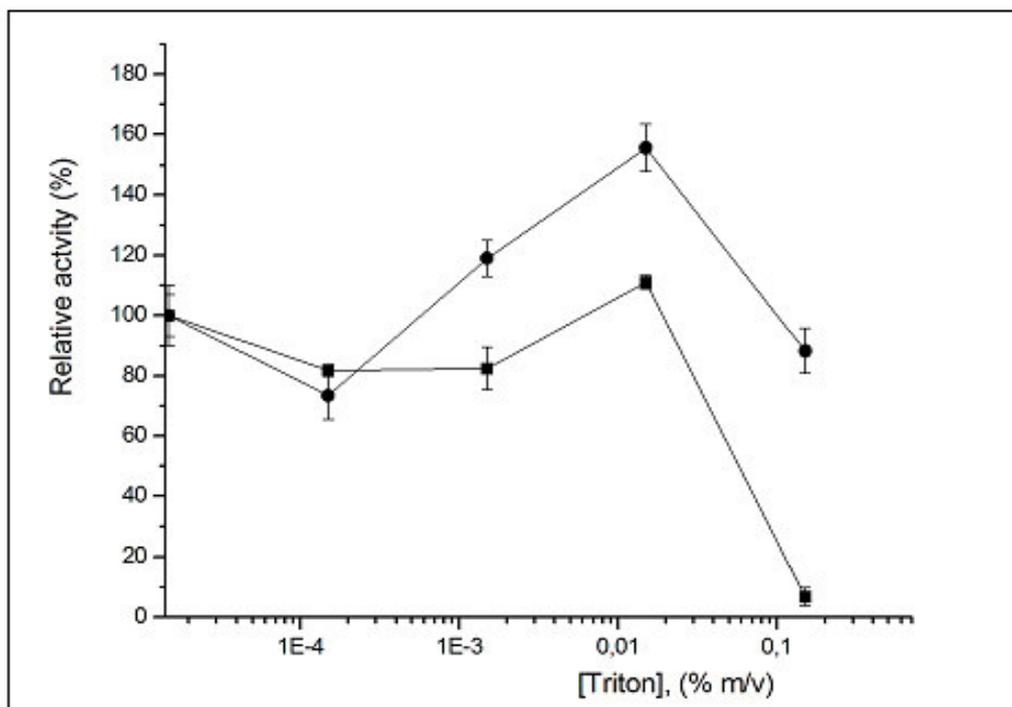


Figure 2.

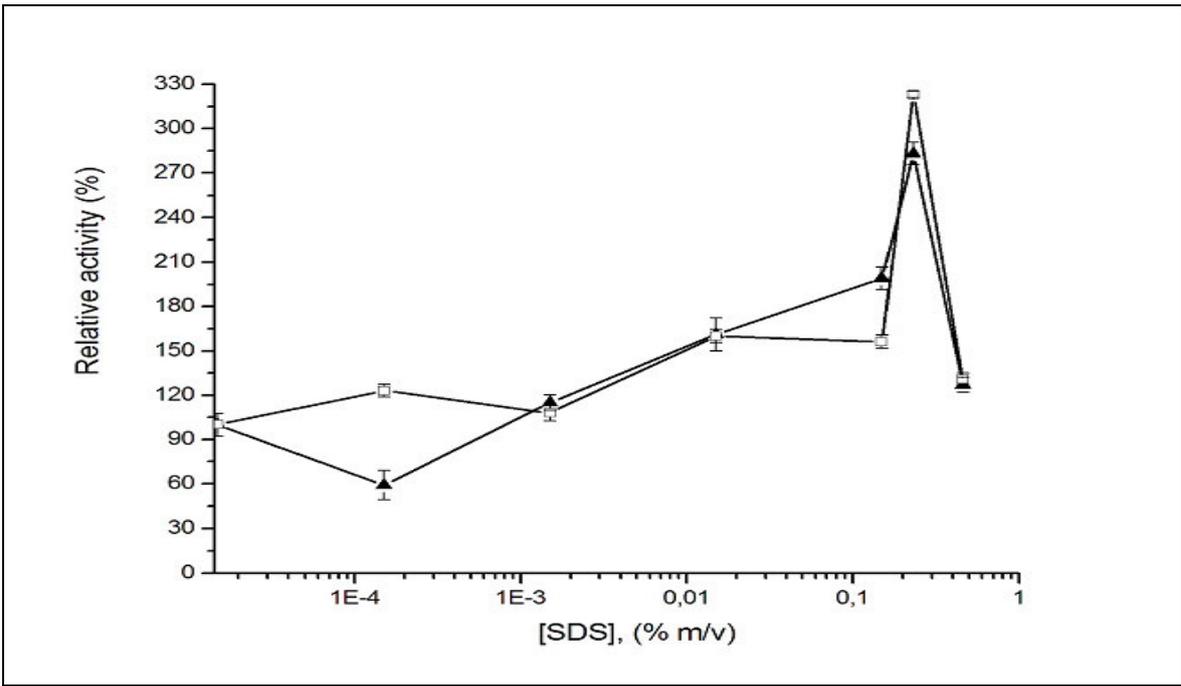


Figure 3.

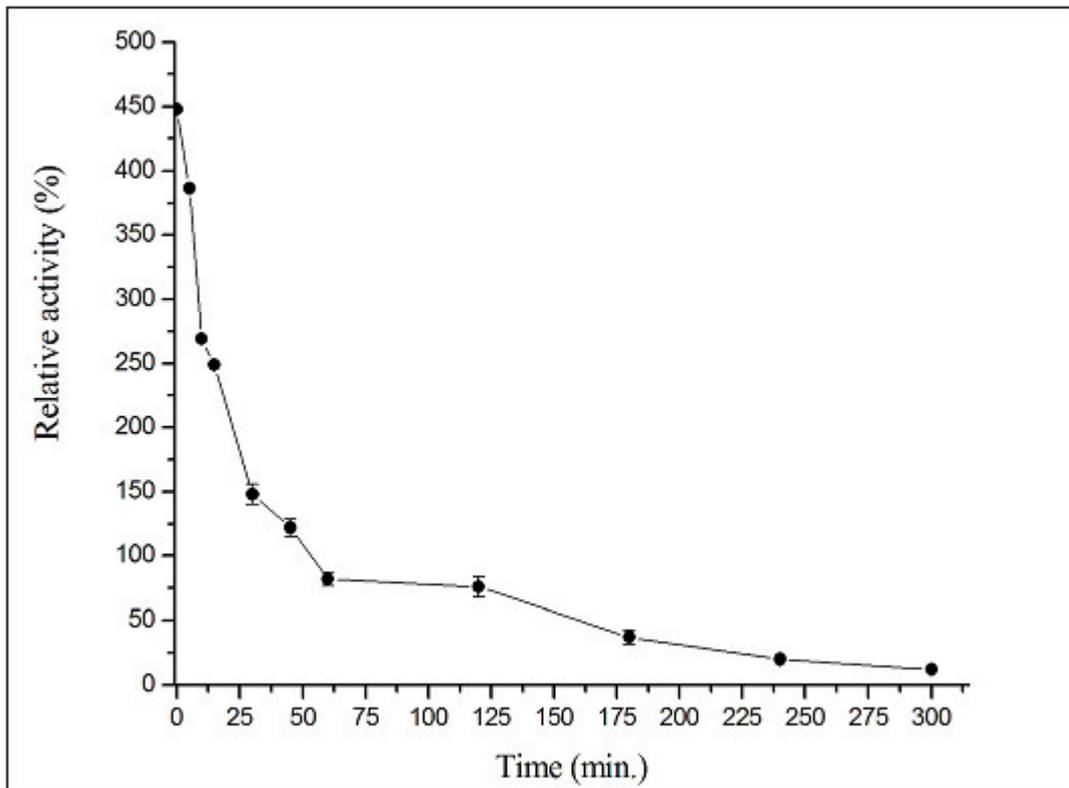


Figure 4.

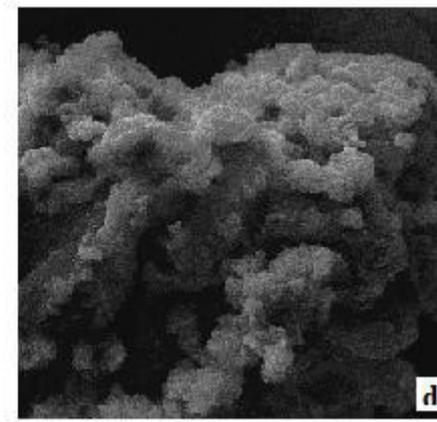
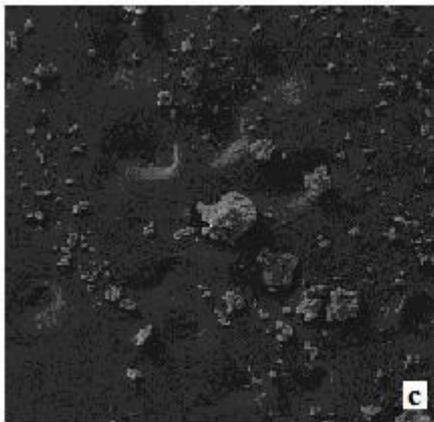
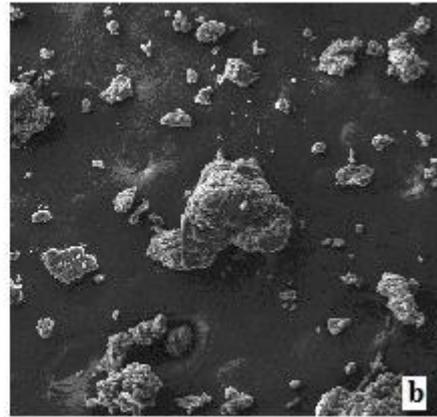
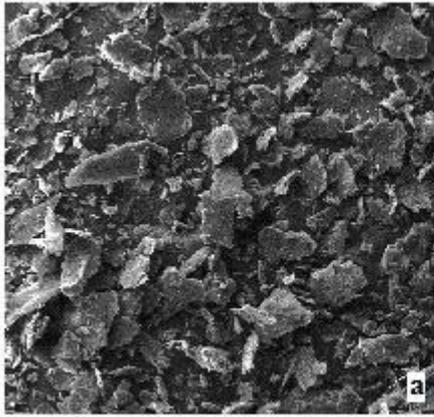


Figure 5.

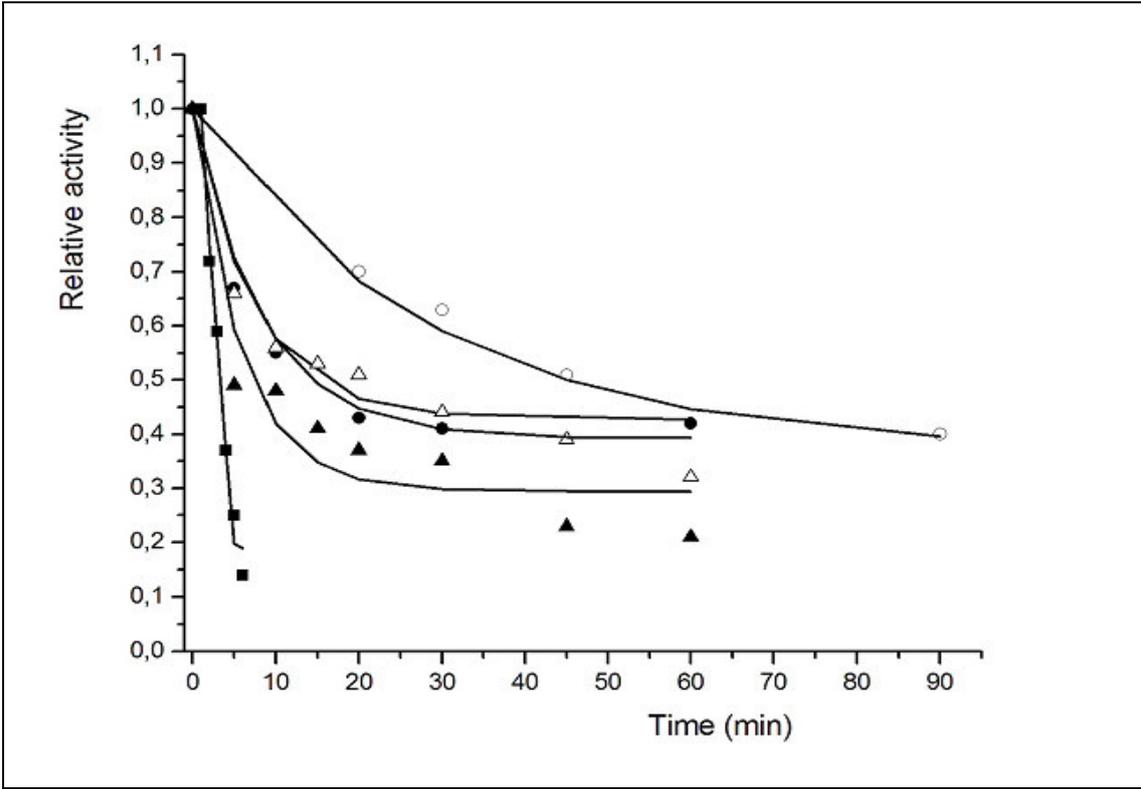


Figure 6.

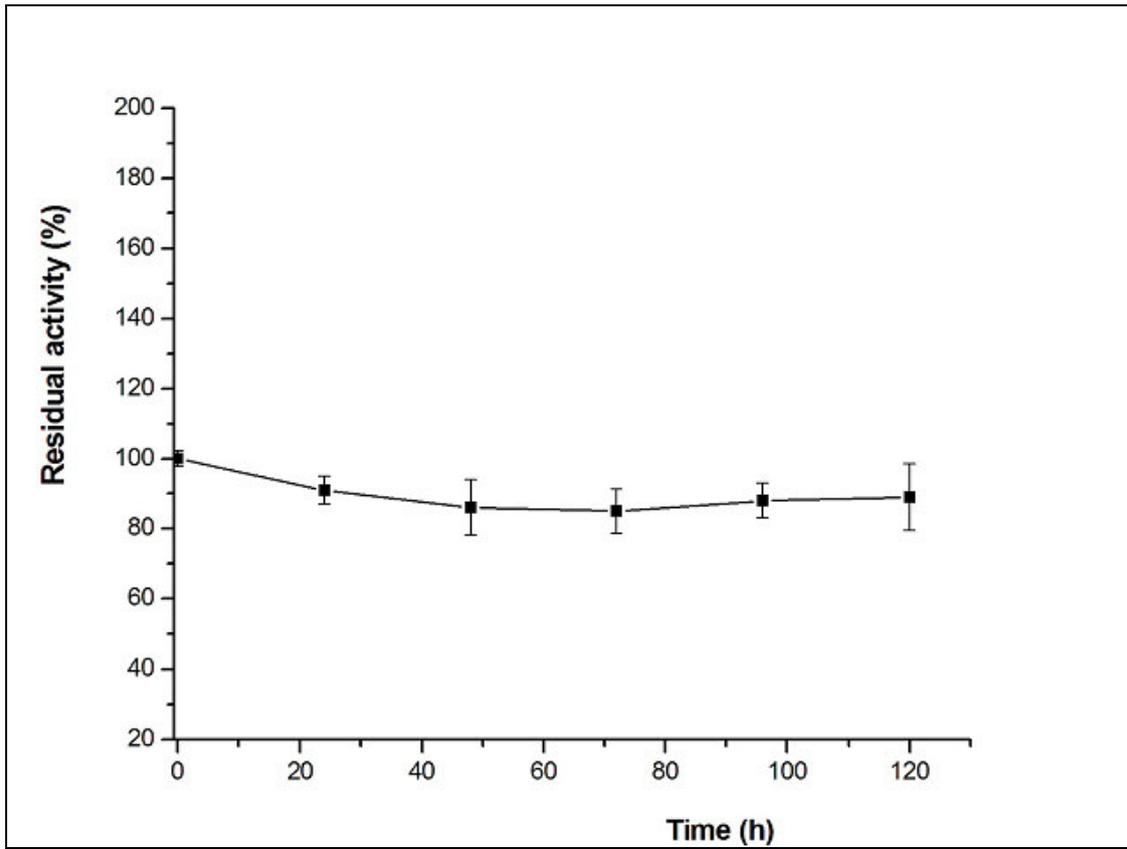
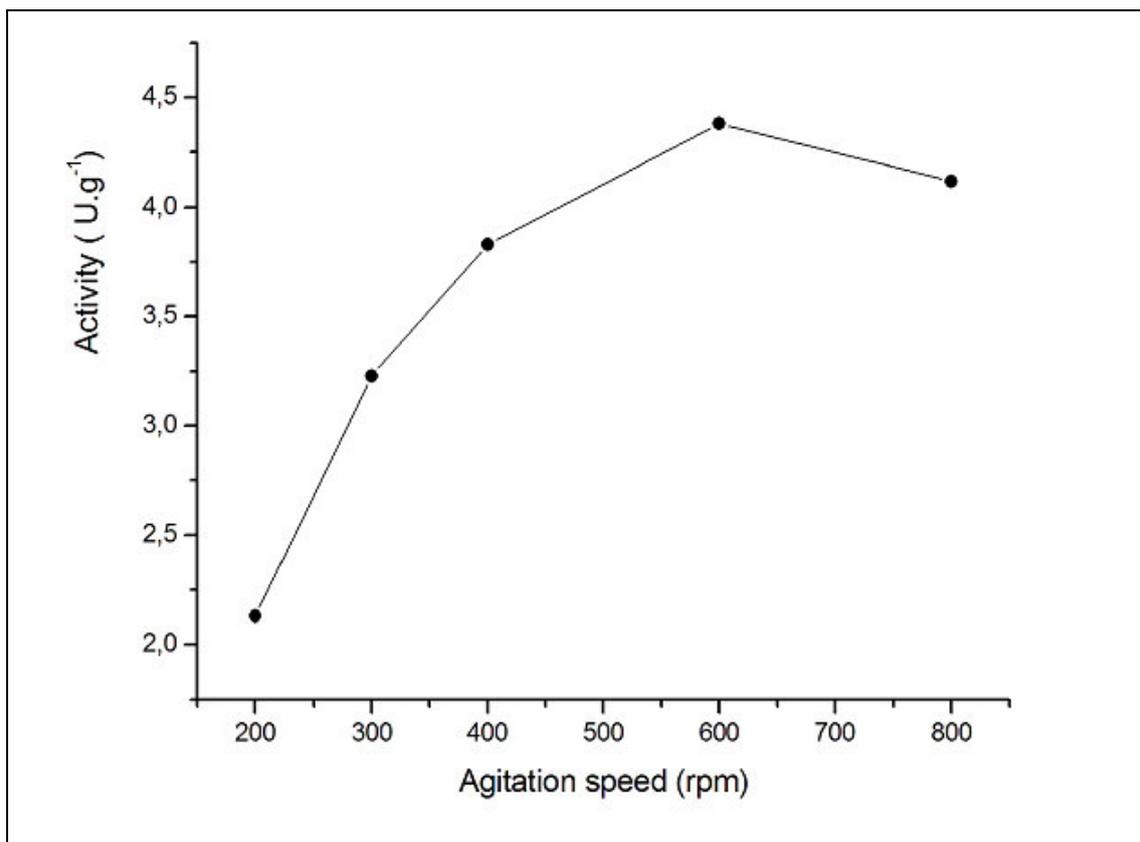


Figure 7.



**Figure 8.**

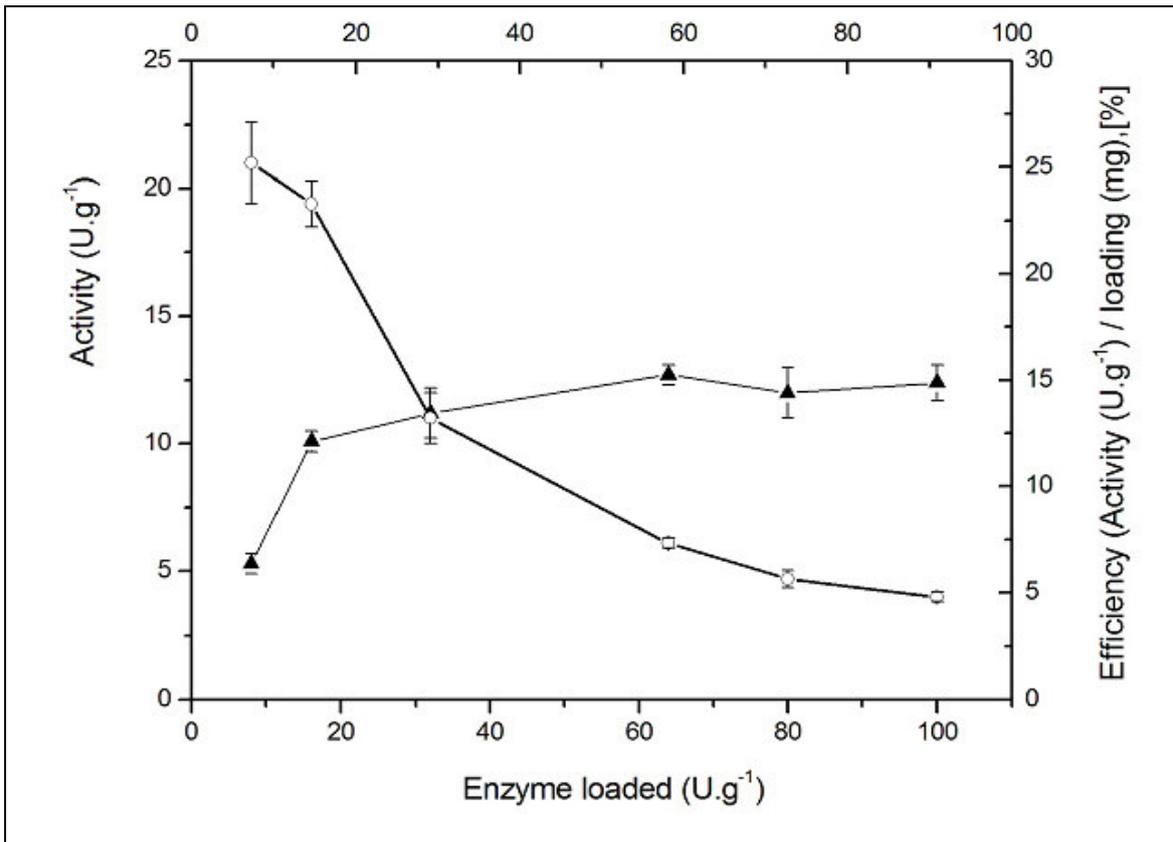


Figure 9.

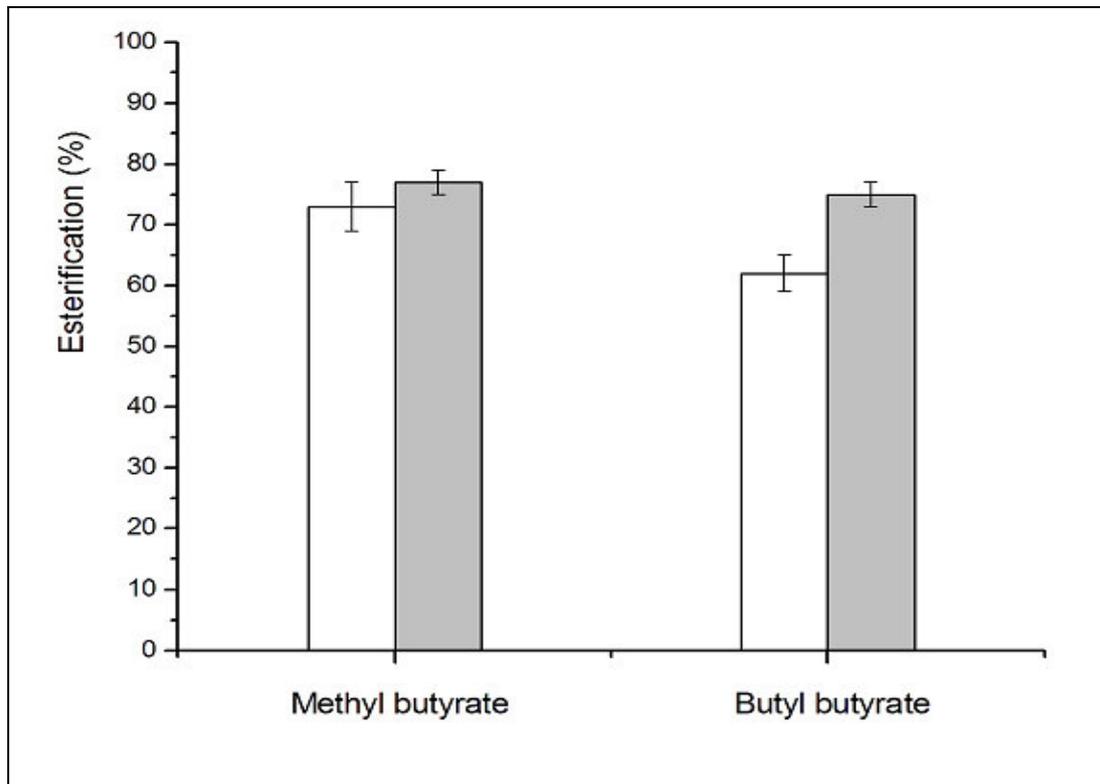


Figure 10.

**ANEXO B - Artigo submetido à ENZYME AND MICROBIAL  
TECHNOLOGY**

**Enzymatic synthesis of methyl and ethyl butyrate using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized onto chitosan support in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS)**

Ulisses M. F. de Oliveira<sup>1</sup>, Leonardo J.B. Lima de Matos<sup>1</sup>, Maria Cristiane M. DE Souza<sup>1</sup>, José C. S. Santos<sup>1</sup>, Luciana R. B. Gonçalves<sup>1\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, 2977, bloco 709 – Campus do Pici -CEP 60604-000 Fortaleza – CE – Brazil

\* Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 9611; fax: +55 85 3366 9601.

E-mail addresses: lrg@ufc.br (L.R.B. Gonçalves)

## ABSTRACT

In this work, lipase from *Rhizomucor miehei* was immobilized onto chitosan support in the presence of the surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS) added at low levels during the immobilization procedure in order to obtain a biocatalyst with high catalytic efficiency to be used on the synthesis of two fruit flavor esters namely methyl and ethyl butyrate. Various parameters that affect the esterification yields were evaluated. The best esterification yields for both esters were obtained when the reactions were conducted at 25°C using n-heptane as a solvent. In the optimized conditions maximum esterification yield for ethyl butyrate was (92 ± 1%) and (89 ± 1%) for methyl butyrate. The esterifications yields for both reactions were comparable or even superior to a commercial enzyme Lipozyme® used at the same reaction conditions. For ethyl butyrate the developed biocatalyst was used for seven consecutive cycles of reaction with retention of its catalytic activity and for methyl butyrate synthesis the biocatalyst was used for four consecutive cycles without loss of its catalytic activity. The results presented at this study show that chitosan support, a low cost natural biopolymer may be employed with in obtaining biocatalysts with high catalytic efficiency and can successfully replace the currently commercial available biocatalysts.

**Keywords:** RmL ; chitosan ; fruit flavor esters

## INTRODUCTION

Short chain aliphatic esters are the major components of some natural flavors and fragrances widely used in the food, beverages, cosmetics and pharmaceutical industries [1,2].

Currently, most of these compounds are extracted from natural sources or produced by chemical routes [3,4].

Extractions from natural sources are too expensive due to their low concentrations in the natural products and very low extraction yields [5]. Chemical synthesis is considered economical but makes use of strong acids such as sulfuric acid, p-toluene sulfonic or phosphoric acid as catalyst and sometimes high temperature and pressure conditions, requiring additional steps for the separation and purification of the obtained products, being considered environmentally unsafe [6,7].

"Clean technologies" based on enzymatic processes mediated by lipases mainly in its immobilized form are emerging and promising techniques that may successfully replace the methods traditionally used on the ester synthesis [8,9].

Compared to conventional chemical synthesis the enzymatic approach allows the ester synthesis at mild conditions with better product purity, elimination of side reactions with low energy requirements [10,11]. Moreover, products obtained by enzymatic processes are labeled as "natural" having high market value [12,13].

Lipases from different sources immobilized onto various kinds of supports have been used in some non-conventional media (e.g. ionic liquids, supercritical fluids) but especially on organic solvents aiming at the production of various flavoring esters [14-16].

Chitosan (linear  $\beta$ -1, 4-linked polysaccharide), a natural biopolymer obtained by the partial deacetylation of chitin has shown suitable properties for enzyme immobilization

such as low cost of obtaining, variety of forms, high affinity for proteins, nontoxicity, physiological inertness, hydrophilicity, among others [17,18].

Lipases may be immobilized on chitosan supports by physical adsorption or through covalent attachment after modification of its hydroxyl (-OH) and primary amino groups (-NH<sub>2</sub>) with specific reagents like epichlorohydrin, glycidol or glutaraldehyde [19-21 ].

In ester synthesis, the development of biocatalysts that fulfill some requirements such as high catalytic activity, thermal stability and good operational stability and a better understanding of the various parameters affecting the esterification reactions are key factors for possible large-scale production of such compounds using lipases [22,23 ].

Besides, the availability of less expensive immobilized preparations with high activity may contribute for a reduction in the overall cost of the processes where these enzymes are used.

In the present work, enzymatic synthesis of two short chain flavor esters (methyl and ethyl butyrate) have been attempted using *Rhizomucor miehei* lipases (RmL) immobilized on chitosan support in the presence of the surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS).

Immobilization in the presence of some class of surfactants at low concentration levels has proved to be a valuable method for improving enzymatic activity of some lipases [ 24,25 ]

A detailed study of various parameters that affects the reaction rates was evaluated. At the optimized reaction conditions the operational stability of the developed biocatalyst was compared to a commercial enzyme Lipozyme®.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Materials**

Powdered chitosan, 85.2% deacetylation degree, was purchased from Polymar Ind. Ltda. (Ceará, Brazil). Soluble *Rhizomucor miehei* lipase (128 U mL<sup>-1</sup> or 4,12 mg mL<sup>-1</sup> according Bradford [26]), Lipozyme<sup>®</sup> (immobilized lipase from *Mucor miehei*, > 30 U.g<sup>-1</sup> against tristearin at pH 8.0 and 70 °C) and Glutaraldehyde 25% (v/v) were acquired from Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). All other reagents and solvents used were of analytical grade.

### **2.2. Methods**

#### **Support preparation**

Powdered chitosan was dissolved in an acetic acid 5% v.v<sup>-1</sup> solution. The obtained solution of 2.5% (m.v<sup>-1</sup>) was dropped into a gently stirred NaOH 100mmol L<sup>-1</sup> solution at room temperature (ratio chitosan/NaOH = 1:10). After 24h, chitosan beads was washed exhaustively with distilled water until neutrality and then dried by vacuum filtration.

#### **Immobilization procedure**

*Rhizomucor miehei* lipases (RmL) were firstly adsorbed onto chitosan beads in the presence of SDS 0,23% m.v<sup>-1</sup> in phosphate buffer 100mmol L<sup>-1</sup> pH 7.0 at 220 rpm for 1h and 4°C. Then, the composite RmL-chitosan-detergent was cross-linked with glutaraldehyde 0.6% v.v<sup>-1</sup> in phosphate buffer 100mmol L<sup>-1</sup> pH 7.0 under low stirring at 25°C for 1h. After that, the support was washed several times with distilled water to remove excess of surfactant and glutaraldehyde, dried under vacuum and stored at 4°C.

## **Enzymatic synthesis of esters**

The esterification reactions were carried out in 125 mL glass stoppered flasks using n-heptane as a solvent. The reaction mixture (20 mL) containing substrates and biocatalyst was incubated on an orbital shaker (Tecnal TE-420, Piracicaba, Brazil) at different conditions. Before and after reaction aliquots of the reaction mixture were withdrawn and titrated against standard potassium hydroxide using phenolphthalein as an indicator to determine the residual acid concentration [27]. Ethanol was used as quenching agent [28].

The percentage of esterification was calculated from the acid consumed in the reaction system according to the following expression:

$$\text{Esterification (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

where  $C_0$  is the true concentration of acid measured before the start of reaction and  $C$  is the residual acid concentration after reaction time.

Control experiments were also conducted without lipase under similar conditions.

## **FTIR Analysis**

Qualitative analysis of esters standards and the reaction mixture in n-heptane were made by Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR) from a FTLA 2000-102, ABB-BOMEM, with 15 scans at a resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ . A frequency range of  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$  was used.

## **Biocatalyst Reuse**

In order to evaluate the reusability of the biocatalyst produced in this work successive reaction cycles were performed for both esters under the optimum reactions conditions.

At the end of the reaction, the biocatalyst was washing with n-heptane to remove adsorbed reagents and reaction products in the matrix, dried under vacuum at room temperature and introduced in a new reaction medium with freshly reactants.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Effect of the temperature**

In lipase-catalyze systems, temperature markedly influences the reaction rates and the stability of the enzyme altering too some properties of the substrates and reaction products like solubility and ionization state [29].

While the binding equilibrium of substrates and products with enzyme decrease with the increase in temperature, acid dissociation and solubility increase with temperature, all resulting in unfavorable esterification conditions (Krishna et al, 1999).

In most cases, an increase in temperature reaction improves the conversions rates, but the stability of enzymes declines [29, 30].

To study the influence of temperature the esterification reactions were performed in the range of 25-60 °C for ethyl butyrate and 25-50°C for methyl butyrate due to low boiling point of methanol (65°C). The results of this set of experiments are displayed at Figure 1.

### **FIGURE 1.**

Fig. 1 shows that for both esters maximum conversion yield under the experimental conditions described were observed at 25 ° C.

For ethyl butyrate a temperature increase from 25 to 37°C did not promote a great decrease in conversion rates. However, temperatures higher than 37°C drastically reduced the esterification yields. Further increase on the temperature leading to a drastic decrease on conversion ratios probably due to heat deactivation of enzyme [ ]

For methyl butyrate, the conversion rates were conversion rates were drastically reduced in the temperature range 37-50°C.

Some works have pointed out too that the decrease of catalytic activities of immobilized enzymes at higher temperature may be brought about to some restrictions on the enzyme movements due to the covalent bonds established between the enzyme and the support or a low restriction for the diffusion of substrates [Dave & Madamwar].

Considering the results obtained in these experiments 25 ° C was adopted as the optimal reaction temperature

### **Effect of substrate concentration**

The effect of varying of acid and alcohol concentrations added at equimolar proportions on the reaction medium in the range of 0.1-1 mol L<sup>-1</sup> was investigated.

Figure 2 shows the results for these experiments.

### **FIGURE 2.**

For ethyl butyrate maximum esterification yielding of 85% was observed at 0.02mol L<sup>-1</sup> of each substrate. An increase of the substrates concentration above 0.02 mol L<sup>-1</sup>

promoted a sharp decrease on esterification yield. At  $1 \text{ mol L}^{-1}$  of each substrate the esterification yield was only 5%.

On the methyl butyrate synthesis the best result in terms of conversion (80%) was achieved when the concentration was  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  for both substrates. According to Fig 2, above this concentration value the esterification reactions have experienced a pronounced decrease in their yields.

A possible explanation for the observed results is that in the presence of high concentrations of substrates (acid or alcohol), the polarity of the medium is altered making the organic phase more hydrophilic. Consequently, the partition coefficients become less favorable to esters formed (more hydrophobic) shifting the equilibrium of the reaction in the opposite direction of formation of these compounds (Romero et al. 2005).

Furthermore, possible inhibitory effects of one or by the two substrates used in the reactions should also be considered.

### **Effect of alcohol to acid molar ratio**

The molar ratio of the substrates is one of the parameters that influence the yield of esterification reactions catalyzed by lipases. Since the reaction is reversible, the increased concentration of one of the reactants may shift the equilibrium towards products formation resulting in high conversions. By the other hand, inhibitory effects occasioned by both substrates or by the products of the reaction can drastically reduce the esterification yields (Belafi-Bakog et. al., 2004, Ceni et. al, 2010).

For ethyl butyrate the effect of alcohol to acid molar ratio on esterification yields was studied by fixing the alcohol concentration at  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  varying acid concentration in the interval of  $0.2\text{-}0.8 \text{ mol L}^{-1}$  and vice versa. The experiments were performed with

200 mg of the biocatalyst (protein loaded=  $1.61 \text{ mg}_{\text{protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{support}}$ ). For methyl butyrate the alcohol concentration was fixed at  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  varying acid concentration in the interval of  $0.1\text{-}0.8 \text{ mol L}^{-1}$  and vice versa. For this series of experiments 100 mg of the biocatalyst was utilized (protein loaded=  $1.61 \text{ mg}_{\text{protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{support}}$ ).

In both reaction systems, the reaction medium was incubated for 8h at  $25^{\circ}\text{C}$  and 150 rpm.

The results for the synthesis of the two esters are shown in Figure 3.

### **FIGURE 3.**

For ethyl butyrate (Fig 3A) the maximum ester conversion (85%) was obtained when the molar ratio of alcohol / acid was 1:1 ( $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  each).

Figure 3A also show that by fixing the ethanol concentration at  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  and increasing the acid concentration above this value a large inhibition of the enzyme activity can be observed. When the concentration of acid added was  $0.8 \text{ mol L}^{-1}$  (molar ratio alcohol / acid = 1:4) the reaction yield was about 5%.

Several papers have related that high acid concentrations may result in a strong inhibition on enzyme activity probably due to the acid dissociation which in turn leads to a decrease of pH in the microaqueous environment of the enzyme( Krishna *et al.*, 2001).

Besides, some short-chain acids such as acetic, propionic and butyric acid can bind to the serine residue (Ser) in the catalytic site of lipases leading to inhibition of its activities, decreasing the yield of the reactions (Langrand *et al.*, 1990; Sebrão *et.al* , 2007).

In the second set of experiments by fixing the concentration of butyric acid at  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  and increasing the concentration of ethyl alcohol Fig 3A reveals that concentrations higher than  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  of this substrate also promoted a great diminishing on the esterification yields.

A major increment at ethanol concentration may promote the binding of molecules of this substrate with the lipase during the first step of the reaction competing with the acid molecules and thus resulting in a decrease in the amount of butyric acid on the enzyme. In this situation, a decrease in the reaction rate will occur, since the reaction is limited by the amount of acid in the vicinity of the enzyme (Pires-Cabral *et al.*, 2009).

In addition to these factors, low molecular weight alcohols such as methanol or ethanol can be accumulated in the aqueous microenvironment of the enzyme reaching a sufficiently high concentration to induce protein denaturation blocking the nucleophilic portion of its active site (Lane *et. Al*, 1987; Zaidi *et. al*, 2002). Another possible mechanism of inactivation is that these substrates, due to their high polarity, can remove the layer of water necessary for maintaining the structural integrity of the enzyme, distorting its three dimensional structure (Paiva *et. Al*, 2000).

The results for the study of the effect of alcohol to acid molar ratio on the synthesis of methyl butyrate are showed at Figure 3B.

The results presented in Figure 3B show that at a fixed concentration of alcohol, additional acid concentrations above  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (80% conversion), promoted a very significant reduction in yields calculated. For a molar ratio alcohol / acid 1:4, the yield of esterification was 13%. The results show as in the previous case, the large inhibition of enzyme activity caused by acid substrate.

In another series of experiments, the results shown in Figure 3B show that in a molar ratio alcohol / acid of 1.5:1, the maximum yield for this reaction was achieved (89%).

Molar ratios above 1.5:1 promoted a fairly sharp decline in yields of reaction obtained.

For a molar ratio of alcohol: acid ratio of 4:1, the reaction yield was only 9%.

The same considerations described previously can be used to explain the results observed for the methyl butyrate synthesis.

From the results obtained on the synthesis of these two esters, the optimal molar ratio alcohol / acid for ethyl butyrate was 1:1 (0.2 mol L<sup>-1</sup> each) and the methyl butyrate was 1.5:1.

These optimal conditions were used in subsequent experiments.

### **Effect of protein load on esterification reactions**

From the standpoint of practical and economical it is desirable that high yields of reaction should be achieved using a small amount of enzyme in a short reaction time.

The esterification reactions were carried out at 25°C and 150 rpm in n-heptane using variable amounts of immobilized lipase (0.52 -3.22 mg<sub>protein</sub> g<sup>-1</sup><sub>support</sub> ).

For ethyl butyrate the reactions were performed by using an equimolar mixture of butyric acid and ethanol (0.2 mol L<sup>-1</sup>). For methyl butyrate, an alcohol to acid molar ratio of 1.5:1 (0.15/0.1 mol L<sup>-1</sup>) was used in these experiments. The results for both esters are showed at Figure 4.

### **FIGURE 4.**

As depicted in Fig. 4, the conversion percentage for both esters is increased as more lipase was present in the reaction medium but until certain limit. The maximal conversion for ethyl and methyl butyrate was achieved at a protein load of 1.61 mg<sub>protein</sub> g<sup>-1</sup><sub>support</sub>.

For the two esters the conversions remained almost constant when amounts of protein greater than the aforementioned value were added on the reaction probably due to diffusional limitations of substrates to the active site of enzymes located inside the biocatalyst (Chaâbouni, 2006). In this case, the additional active sites of the enzyme molecules are not exposed to the substrates remaining within the particles of biocatalysts without contributing significantly to reaction (Gandhi et. al. 1995).

According to the results obtained, the protein load used in further experiments was  $1.61 \text{ mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ .

### **Effect of biocatalyst load**

In a reaction catalyzed by enzymes immobilized on a support increasing the amount of enzyme can within a certain limit positively affect the reaction rates (Mahapatra, 2009).

The effect of increasing the mass of biocatalyst used in reaction systems was evaluated.

The results for this experiment are displayed at Figure 5.

### **FIGURE 5.**

The results of these experiments presented in Fig. 5 show that for both esters increasing amounts of mass biocatalyst promoted an increase in conversion rates, but up to a certain limit.

For methyl butyrate the maximum rate of conversion (89%) was obtained when 100 mg biocatalyst was added to the reaction system. Amounts of biocatalyst above 100mg did not produce significant differences on reaction rates.

For ethyl butyrate, the maximum conversion (85%) was observed when 200 mg of the biocatalyst were added to the reaction. Amounts of biocatalyst above this value produced a slight decrease in the yield of this reaction.

According to Shu et al,2001 [ ] a large increase in the amount of biocatalyst used in the reactions may lead to a decrease in synthesis activity due to the random distribution of the enzyme on the support resulting in less contact between enzyme and substrate.

From the results obtained in these experiments, the mass of biocatalyst used in the following experiments were 100 and 200mg for methyl and ethyl butyrate respectively.

### **Effect of agitation speed**

In order to evaluate the possible effects of mass external transference limitations experiments were carried out by varying the agitation speeds from 50-250 rpm

Fig 6 shows the effect of agitation speed on the esterification reactions

### **FIGURE 6.**

As can be seen in Figure 6 the rate of esterification for both esters increased by increasing the stirring rate reaching a maximum at 150 rpm. No significant difference in the reaction rates was observed between 150-250 rpm indicating that the external resistance transfer is negligible at agitation speeds higher than 150 rpm.

Therefore, the rotational speed of 150 rpm was chosen for all further studies.

### **Effect of initial amount of water**

The amount of water present on the surface of some enzymes such as lipases contributes to the maintenance of its structural integrity, limits the solubility of hydrophobic substrates in the vicinity of enzyme and affects the reaction equilibrium (Klibanov, 2001)

Most lipases require only a small amount of water needed to maintain its active conformation and to promote esterification reactions in organic systems with high efficiency (Dordick et al, 1989).

Indeed, a large amount of water may inhibit the esterification reactions shifting the equilibrium toward hydrolysis or may induce enzyme inactivation.

In these experiments water was added in reaction mixture on the interval of 0.5-2% (wt) with respect to total mass of reagents. The results are displayed at Figure 7.

### **FIGURE 7.**

As can be seen in Fig 7 for both esters, conversion rates decreased with the increased amount of water added to the reaction medium. Highest yields were observed in the absence of water (89% for methyl butyrate and 85% for ethyl butyrate).

Thus, it can be concluded that the amount of water initially adsorbed on the support chitosan can be considered sufficient for the enzyme showing its maximum activity for the synthesis of these two esters in particular.

Additional amounts of water may have markedly increased the degree of hydration of support resulting in an increase in the thickness of the film around the enzyme. This phenomenon may have resulted in problems of diffusion of substrates to the active site of the enzyme disadvantaging esterification reactions [Mahapatra et al 2009 ].

Similar results were reported by Gamgui et. al. (2004) [ ] on the enzymatic synthesis of butyl oleate.

### **Effect of time on the esterification reactions**

Generally, a biocatalytic process to be used on a large scale should combine high conversion rates in relatively short times of reaction, using the least amount of enzyme possible (Martins et al. May 2011).

Thus, the reaction time in this context can be considered an important indicator of economic performance and effectiveness of the process.

In this sense, the time courses of both reactions were accompanied. The reactions were assayed at various reaction time intervals and the esterification percentage were determined as described earlier.

The profiles of production for the studied esters at various time intervals are presented in Fig 8.

### **FIGURE 8.**

Fig 8 shows that the conversions for the studied esters were increased with increasing reaction time but after 6 hours of reaction the conversion percentage for both esters started to decrease probably due to large amount of water produced during reactions [Radzi,2011 ].

According to the results obtained in these assays the optimal conditions for the synthesis of methyl butyrate and ethyl butyrate are summarized in Table 1

## **Table 1.**

### **Identification of reaction products**

After completion of the reactions, the synthesized esters were analyzed using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.

In the conditions previously described Figure 9 shows the spectra obtained for the synthesized esters.

### **FIGURE 9.**

According to Figure 9A and 9B, a strong peak indicating the presence of ester carbonyl group (C=O) about  $1740\text{ cm}^{-1}$  for both esters was evidenced. These results are in agreement with some results reported at literature [ Radzi et al, 2005 ]

### **Comparative study**

Within the optimized conditions to obtain the esters studied , a comparative study of esterification yields between the biocatalyst produced in this work, the commercial enzyme Lipozyme ®, the soluble enzyme and the biocatalyst produced in the absence of the surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) was performed.

The results for both synthesis are shown in Figure 10

### **FIGURE 10.**

For ethyl butyrate (Fig 10 A) , the conversion yield for the derivative III ( $92 \pm 1\%$ ) was comparable to the commercial enzyme Lipozyme <sup>®</sup> ( $86 \pm 1\%$ ) and soluble enzyme ( $89 \pm 1\%$ ).

Making a comparison between yields obtained with the biocatalysts produced in the presence and absence of SDS (II and III, respectively) the results clearly show the increase in enzymatic activity promoted by the addition of this tensoactive used during the immobilization procedure. The esterification yield for biocatalyst III was 2.3 greater than biocatalyst II ( $37 \pm 2\%$ ).

For methyl butyrate according to Fig 10B the conversion rate of the derivative III ( $89 \pm 1\%$ ) was 4.5 times the rate of conversion of the ester derivative obtained when using the immobilization was effected in the absence of surfactant SDS (derivative II) that showed a percentage conversion of 20%.

In the preparation of this ester the biocatalyst obtained in the presence of SDS also has provided reaction rates slightly higher than those obtained when commercial enzyme Lipozyme <sup>®</sup> ( $86 \pm 1\%$ ) and soluble enzyme ( $87 \pm 2\%$ ) were used under the same reaction conditions.

The presented results show that the biocatalyst produced in this work under optimized conditions showed high catalytic efficiency in the synthesis of esters studied comparable to commercial enzyme Lipozyme <sup>®</sup> widely used in the ester synthesis.

### **Operational stability of immobilized lipase**

The reusability of immobilized lipase is one of the major advantages to makes an enzymatic process cost effective.

In this set of experiments the protein load was  $27 \text{ mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ .

A comparison between our preparations and the commercial enzyme Lipozyme ® was made.

According to procedure described in material and methods section Figure 11 shows the results for both esters.

#### **FIGURE 11.**

As can be seen the biocatalyst used for the synthesis of methyl butyrate (Fig 11 A) retained its high activity only until the fourth cycle. Until this cycle the developed biocatalyst showed esterification conversions higher than the commercial enzyme Lipozyme ® used in the same conditions. From the fourth reaction cycle the esterification yields experienced a decrease almost linear in their values and after eight consecutive cycles the conversion percentage was only 13%. The decreases on the esterification yields observed may have been a consequence from loss of mass of the biocatalyst due to the successive steps of handling of the derivative after each reaction cycle (Foresti & Ferreira, 2007).

For ethyl butyrate synthesis the biocatalyst was used for seven consecutive cycles without loss of its catalytic activity (Fig 10B). The conversion yields during these cycles were higher than the conversions obtained by the commercial enzyme Lipozyme ®. After ten cycles the esterification yield remained at 50%.

As in the first case, possible loss of mass of the biocatalyst during the successive cycles of reaction may have contributed to the reduction of yields esterification reaction after seven cycles.

Besides, the reductions on the esterification percentages for the two esters studied can also be attributed to enzyme denaturation caused by one or both substrates used in the reactions after many cycles.

## **CONCLUSIONS**

In this work, *Rhizomucor miehei* lipases were immobilized onto chitosan support in the presence of surfactant SDS 0,23% (w.v<sup>-1</sup>) in order to obtain low cost biocatalysts for use in the synthesis of two flavor esters methyl butyrate and ethyl butyrate with high catalytic efficiency and operational stability.

In the optimized conditions throughout this study, the biocatalysts produced showed high catalytic efficiency in obtaining the mentioned esters providing esterification yields comparable and even superior to commercial enzyme Lipozyme<sup>®</sup> used under the same reaction conditions.

For ethyl butyrate the biocatalyst was used for seven consecutive cycles of reaction with retention of its catalytic activity and for methyl butyrate synthesis the biocatalyst was used for four consecutive cycles without loss of its catalytic activity. The results shows that an increase in the load of immobilized protein can minimize the effect of loss of mass of the biocatalyst and inactivation of the enzyme observed in this study during the repeated reaction cycles.

It was proved that the addition of surfactant SDS at low levels for this particular case during the immobilization procedure produced biocatalyst with high catalytic activity.

Moreover, the chitosan support, a low cost natural biopolymer may be employed in obtaining biocatalysts with high catalytic efficiency and can successfully replace the currently commercial available biocatalysts.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brazilian research-funding agencies FUNCAP, CNPq and CAPES.

## REFERENCES

- [1] Singh M, Singh S, Singh RS, Chisti Y, Banerjee UC . Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Bioresour Technol* 2008; 99:2116–20.
- [2] Salah RB, Ghamghui H, Miled N, Mejdoub H, Gargouri Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. *J of Biosc Bioeng* 2007; 103:368-72.
- [3] Macarie EA, Baratti J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *J Mol Catal B: Enzym*. 2000 ; 10: 377–83.
- [4] Lai DT , Connor CJ. Studies on synthesis of short chain alkyl esters catalyzed by goat pregastric lipase. *J Mol Catal B: Enzymatic*. 1999; 6: 411-20.
- [5] de Barros DPC, Fonseca LP, Fernandes P, Cabral JMS, Mojovic L. Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. *J Mol Catal B: Enzymatic*. 2009; 60: 178–85.

- [6] Hills G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur J Lipid Sci Technol* 2003; 105: 601-07.
- [7] Kiss, MA, Sefanovits-Bányai E, Tóth A, Boross L. Extractive Synthesis of Ethyl-Oleate Using Alginate Gel Co-Entrapped Yeast Cells and Lipase Enzyme. *Eng Life Sci* 2004; 4: 460-64.
- [8] Yadav GD, Lathi PS. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. *Biochem Eng Journal* 2003; 16:245-52.
- [9] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 2006; 39:235-51.
- [10] Orrego CE, Valencia JS, Zapata C. *Candida rugosa* lipase supported on high crystallinity chitosan as biocatalyst for the synthesis of 1-butyl oleate. *Catal Lett* 2009; 129: 312-22.
- [11] Vaidya A, Gera G, Ramakrishna S. Evaluation and optimization of immobilized lipase for esterification of fatty acid and monohydric alcohol. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24:2987–95.
- [12] Longo MA, Sanromán MA. Production of Food Aroma Compounds. *Food Technol Biotechnol* 2006; 44(3): 335–53.
- [13] Berger RG. Biotechnology of flavours-the next generation. *Biotechnol Lett* 2009; 31: 1651-59.
- [14] Habulin M, Šabeder S, Paljevac M, Primožič M, Knez Z. Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media. *J of Supercritical Fluids* 2007; 43: 199-03.

- [15] Raghavendra T, Sayania D, Madamwar D. Synthesis of the “green apple ester” ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in mbgs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2010; 63:31-38.
- [16] Radzi SM, Mustafa WAF, Othman SS, Noor HM. Green Synthesis of Butyl Acetate, A Pineapple Flavour via Lipase-Catalyzed Reaction. *World Academy Science Engineering and Technology* 2011; 59: 677-80.
- [17] Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol* 2004; 35:126–39.
- [18] Kasimova MR, Velazquez-Campoy A, Nielsen HM. On the Temperature Dependence of Complex Formation between Chitosan and Proteins. *Biomacromolecules* 2011; 12: 2534–43.
- [19] Fangkangwanwong J, Yoksan R, Chirachanchai S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. *Polymer* 2006; 47: 6438-45.
- [20] Silva JA, Macedo GP, Rodrigues DS, Giordano RLC, Gonçalves LRB. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochem Eng Journal* 2012; 60: 16– 24.
- [21] Rodrigues DS, Mendes AA, Adriano WS, Gonçalves, LRB. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J Mol Catal B:Enzymatic* 2008; 51: 100-09.
- [22] Tufvesson P, Törnvall U, Carvalho J, Karlsson AJ, Hatti-Kaul R. Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2011; 68: 200-05.
- [23] Krishna SH. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnol Adv* 2002; 20: 239–67.

- [24] Fernández-Lorente G , Palomo JM, Mateo C, Munilla R, Ortiz C, Cabrera Z, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance, *Biomacromolecules* 2006; 7: 2610-15.
- [25] Filice M, Marciello M, Betancor L, Carrascosa AV, Guisán, JM, Fernandez-Lorente G. Hydrolysis of Fish Oil by Hyperactivated *Rhizomucor miehei* Lipase Immobilized by Multipoint Anion Exchange. *Biotechnol Prog* 2011; 27: 961-68.
- [26] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem* 1976; 72: 248-54.
- [27] Aragão VC, Porto MRA, Burkert CAV, Kalil SJ, Burkert JFM. Response Surface Methodology Approach for the Synthesis of Ethyl Butyrate. *Food Technol Biotechnol* 2011; 49 (1):103-10.
- [28] Romero MD, Calvo L, Alba C, Daneeshfar A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane, *J. Biotechnol* 2007; 127: 269-277.
- [29] Mahapatra P, Kumari A, Garlapati VJ, Banerjee R, Nag A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2009; 60: 230–39.
- [30] Ozyilmaz G, Esra G. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and *porcine pancreatic* lipase into calcium alginate gel. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2010; 64:140-45.

- [31] Krishna, SH, Manohar, B, Divakar, S, Karanth, NG. Lipase-Catalyzed Synthesis of Isoamyl Butyrate: Optimization by Response Surface Methodology. *JAACS* 1999; 76: 1483-88.
- [32] Foresti ML, Ferreira ML. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. *Enzyme Microb Technol* 2007; 40 : 769–77.
- [33] Garcia T, Sanchez N, Martínez J, Aracil J. Enzymatic synthesis of fatty esters: Part I. kinetic approach *Enzyme Microb Technol* 1999; 25(7): 584–90.
- [34] Romero MD, Calvo L, Alba C, Daneshfar A, Ghaziaskar HS. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in *n*-hexane. *Enzyme Microb Technol* 2005; 37: 42–8.
- [35] Dave R, Madamwar D. *Candida rugosa* lipase immobilized in Triton X-100 microemulsion based organogels (MBGs) for ester synthesis. *Process Biochemistry* 2008; 43:70-5.
- [36] Marty A, Chulalaksasnanukul W, Willemot RM, Condoret JS. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO<sub>2</sub>. *Biotechnol Bioeng* 1992; 39:273–80.
- [37] Ceni G, Lerin LA, de Conto JF, Brancher CV, da Silva PC, Toniazzo G, Treichel H, de Oliveira D, Oliveira JV, Ostreichero EG, Antunes OAC. Optimization of 1-glyceryl benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 2010; 46: 107-12.
- [38] Bélafi-Bakó K, Kabiri BA, Nemestóthy N, Ehrenstein U, Gubicza L. Kinetics of Ethyl Acetate Formation by Lipase in Organic Solvent and Solvent-free System. *Chem Pap* 2003; 57(4): 278-81.
- [39] Krishna SH, Divakar S, Prapulla SG, Karanth NG. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J Biotechnol* 2001; 87: 193-01.

- [40] Langrand G, Rondot N, Triantaphylides C, Baratti J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. *Biotechnol Lett* 1990; 18(8):581–6.
- [41] Pires-Cabral P, da Fonseca MMR, Ferreira-Dias S. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. *Biochem Eng Journal* 2009; 43:327-32.
- [42] Laane C, Boeren S, Vos K, Verger C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 1987; 30:81-7.
- [43] Zaidi A, Gainer JL, Carta G, Mrani A, Kadiri T, Belardi Y, et al. Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in *n*-hexane: kinetic parameters and chain-length effect. *J Biotechnol* 2002; 93:209–16.
- [44] Paiva AL, Balcão VM, Malcata FX. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* 2000; 27:187-204.
- [45] Gonçalves LRB, Ferreira ALO, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Giordano RC, Giordano RLC. Influence of mass transfer limitations on the enzymatic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics catalyzed by penicillin G acylase immobilized on glioxil-agarose. *Bioproc Biosystems Eng* 2008; 31: 411-18.
- [46] Karra-Châabouni M, Ghamgui H, Bezzine S, Rekik A, Gargouri Y. Production of flavor esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent free system. *J Process Biochem* 2006; 41:1692-98.
- [47] Ghandi N, Sawant SB, Joshi JB. Studies on the Lipozyme catalyzed synthesis of butyl laurate. *Biotechnol Bioeng* 1995; 46: p.1-12.
- [48] Shu C, Cai J, Huang L, Zhu X, Xu Z. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2011; 72:139-44.
- [49] Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001; 409: 241-46.

[50] Dordick JS. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 1989; 41:566-71.

[51] Ghamgui H, Karra-châabouni M, Gargouri Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between *n*-hexane and solvent-free system. *Enzyme Microb Technol* 2004; 35:355-63.

[52] Martins AB, Graebin NG, Lorenzoni ASG, Fernández-Lafuente R, Ayub MAZ, Rodrigues RC. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. *Process Biochem* 2011; 46: 2311–16.

[53] Radzi SM, Mahiran B, Abu Bakar S, Arbakariya M, Rosfarizan M, Basyaruddin ARM, Raja Noor Zaliha AR. High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilized lipase from *Candida Antarctica*. *Electron J Biotechnol* 2005; 83(3): 292-98.

[54] Foresti ML, Ferreira ML. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. *Enzyme Microb Technol* 2007; 40:769–77.

## Figure captions

Figure 1. Effect of temperature on the synthesis of methyl butyrate (●) and ethyl butyrate (○). Conditions: Solvent: n-heptane;  $V_{\text{reaction}} = 20 \text{ mL}$ ; protein load ( $\text{mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ ) = 1.61; biocatalyst amount (mg): 100 (methyl butyrate) and 200 (ethyl butyrate); molar ratio [alcohol] / [acid] = 1:1; substrates concentration:  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$ ; agitation speed = 150 rpm, reaction time (t): 8h.

Figure 2. Effect of substrates concentration on esterification yields of methyl butyrate(○) and ethyl butyrate (■). Conditions: Solvent: n-heptane;  $V_{\text{reaction}} = 20 \text{ mL}$ ; protein load ( $\text{mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ ) = 1.61; biocatalyst amount (mg): 100 (methyl butyrate) and 200 (ethyl butyrate); molar ratio [alcohol] / [acid] = 1:1; agitation speed = 150 rpm, reaction time (t): 8h; temperature (T): 25°C.

Figure 3. Effect of alcohol to acid molar ratio on esterification yields of methyl butyrate (B) and ethyl butyrate synthesis (A): alcohol concentration fixed at  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (●) and acid concentration fixed at  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  (○)

Figure 4. Effect of protein load on esterification yields of methyl butyrate (○) and ethyl butyrate synthesis (●). Conditions: Solvent: n-heptane;  $V_{\text{reaction}} = 20 \text{ mL}$ ; molar ratio [alcohol] / [acid] : methyl butyrate 1,5:1 and ethyl butyrate 1:1; biocatalyst amount (mg): 100 (methyl butyrate) and 200 (ethyl butyrate); agitation speed = 150 rpm; reaction time (t): 8h; temperature (T): 25°C.

Figure 5. Effect of biocatalyst load on esterification yields of methyl butyrate ( $\nabla$ ) and ethyl butyrate synthesis ( $\blacktriangle$ ). Conditions: Solvent: n-heptane;  $v_{\text{reaction}} = 20$  mL; protein load ( $\text{mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ ) = 1.61; molar ratio [alcohol] / [acid] : methyl butyrate 1,5:1 and ethyl butyrate 1:1; agitation speed = 150 rpm, reaction time (t): 8h; temperature (T): 25°C.

Figure 6. Effect of agitation speed on esterification yields of methyl butyrate ( $\circ$ ) and ethyl butyrate ( $\bullet$ ). Conditions: Solvent: n-heptane;  $v_{\text{reaction}} = 20$  mL; protein load ( $\text{mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ ) = 1.61; biocatalyst amount (mg): 100 (methyl butyrate) and 200 (ethyl butyrate); molar ratio [alcohol] / [acid] : methyl butyrate 1,5:1 and ethyl butyrate 1:1; reaction time (t): 8h; temperature (T): 25°C.

Figure 7. Effect of initial amount of water on the synthesis of methyl butyrate ( $\circ$ ) and ethyl butyrate ( $\blacksquare$ ). Conditions: Solvent: n-heptane;  $v_{\text{reaction}} = 20$  mL; protein load ( $\text{mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ ) = 1.61; biocatalyst amount (mg): 100 (methyl butyrate) and 200 (ethyl butyrate); molar ratio [alcohol] / [acid] : methyl butyrate 1,5:1 and ethyl butyrate 1:1; reaction time (t): 8h; temperature (T): 25°C.

Figure 8. Effect of time on the esterification reactions for ethyl butyrate ( $\circ$ ) and methyl butyrate ( $\bullet$ ). Conditions: Solvent: n-heptane;  $v_{\text{reaction}} = 20$  mL; protein load ( $\text{mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ ) = 1.61; biocatalyst amount (mg): 100 (methyl butyrate) and 200 (ethyl butyrate); molar ratio [alcohol] / [acid] : methyl butyrate 1,5:1 and ethyl butyrate 1:1; temperature (T): 25°C.

Figure 9. FTIR spectra for methyl butyrate (A) and ethyl butyrate (B) after 6h reaction.

Figure 10. Comparative study of esterification yields in the synthesis of esters ethyl butyrate (A) and methyl butyrate (B) with biocatalysts: (I) free enzyme; (II) biocatalyst produced in the absence of surfactant; (III) biocatalyst produced in the presence of surfactant and (IV) commercial enzyme Lipozyme ®.

Figure 11. Operation stability study for the synthesis of methyl butyrate (A) and ethyl butyrate (B).

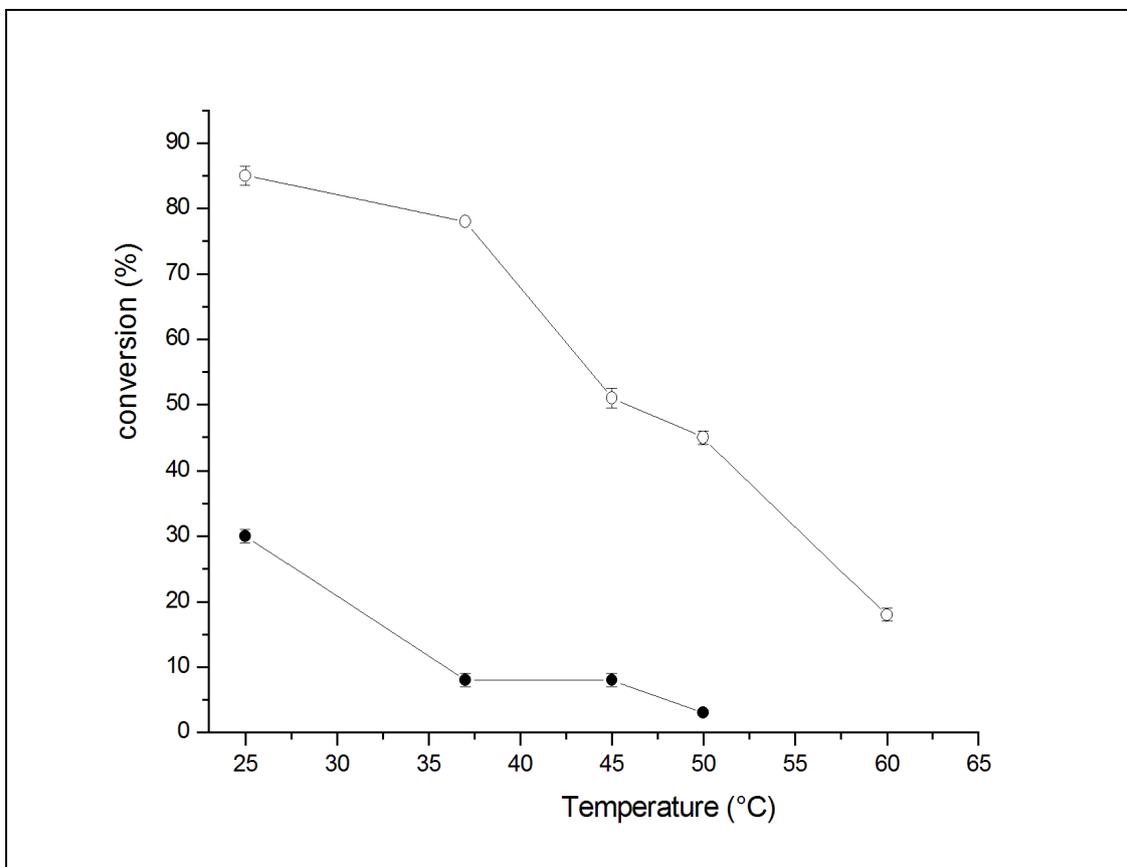
## **Table captions**

**Table 1. Optimized conditions for the synthesis of methyl butyrate and ethyl butyrate**

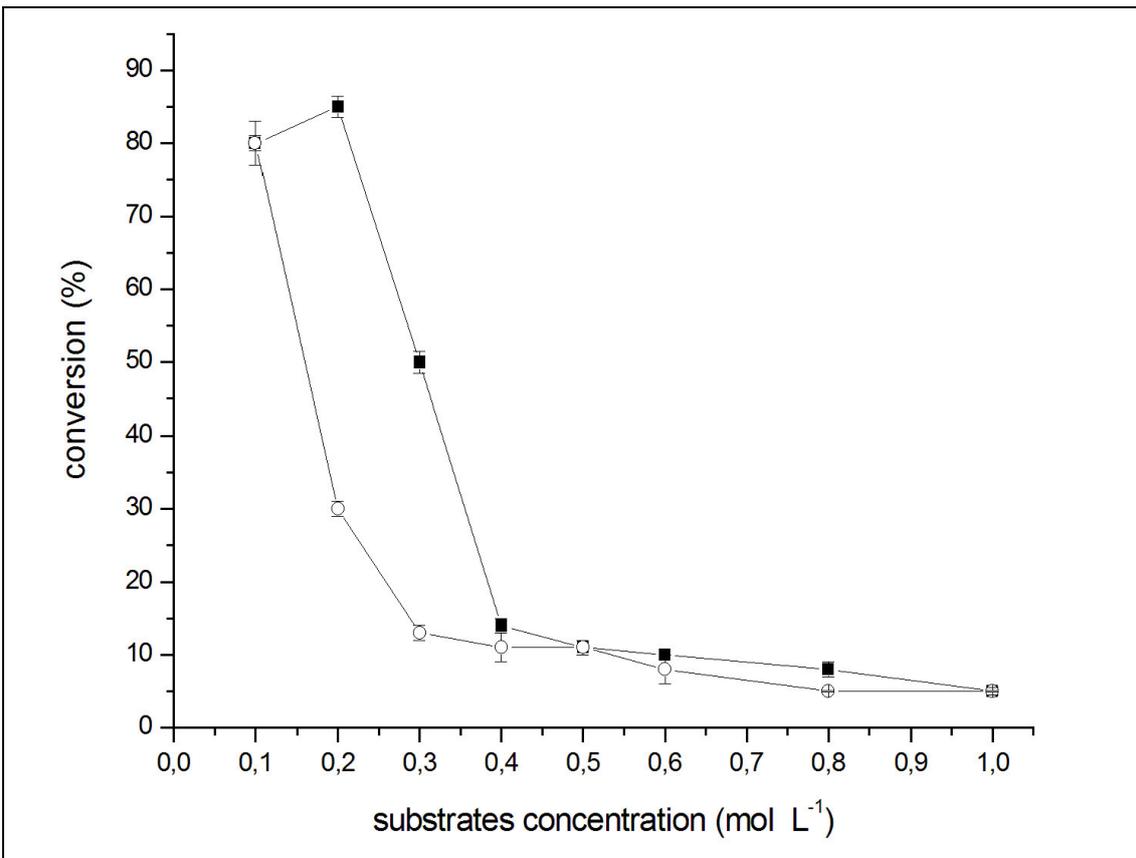
**Table 1:**

<b>Reaction parameters</b>	<b>Esters</b>	
	<b>Ethyl butyrate</b>	<b>Methyl butyrate</b>
Temperature, T (°C)	25	25
molar ratio [alcohol]/[acid]	1:1	1.5:1
Protein load ( $\text{mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{support}}$ )	1.61	1.61
Biocatalyst amount (mg)	200	100
Agitation speed (rpm)	150	150
Water amount (% w.w <sup>-1</sup> )	0.0	0.0
Reaction time, t (h)	6	6

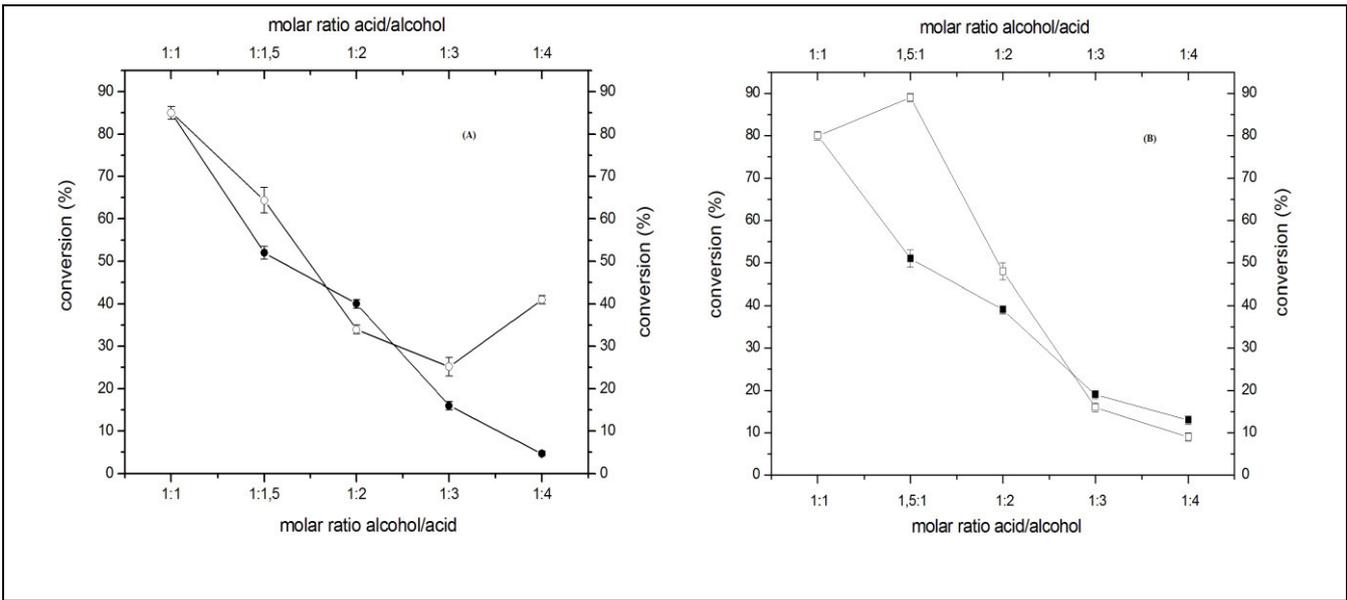
## Figures



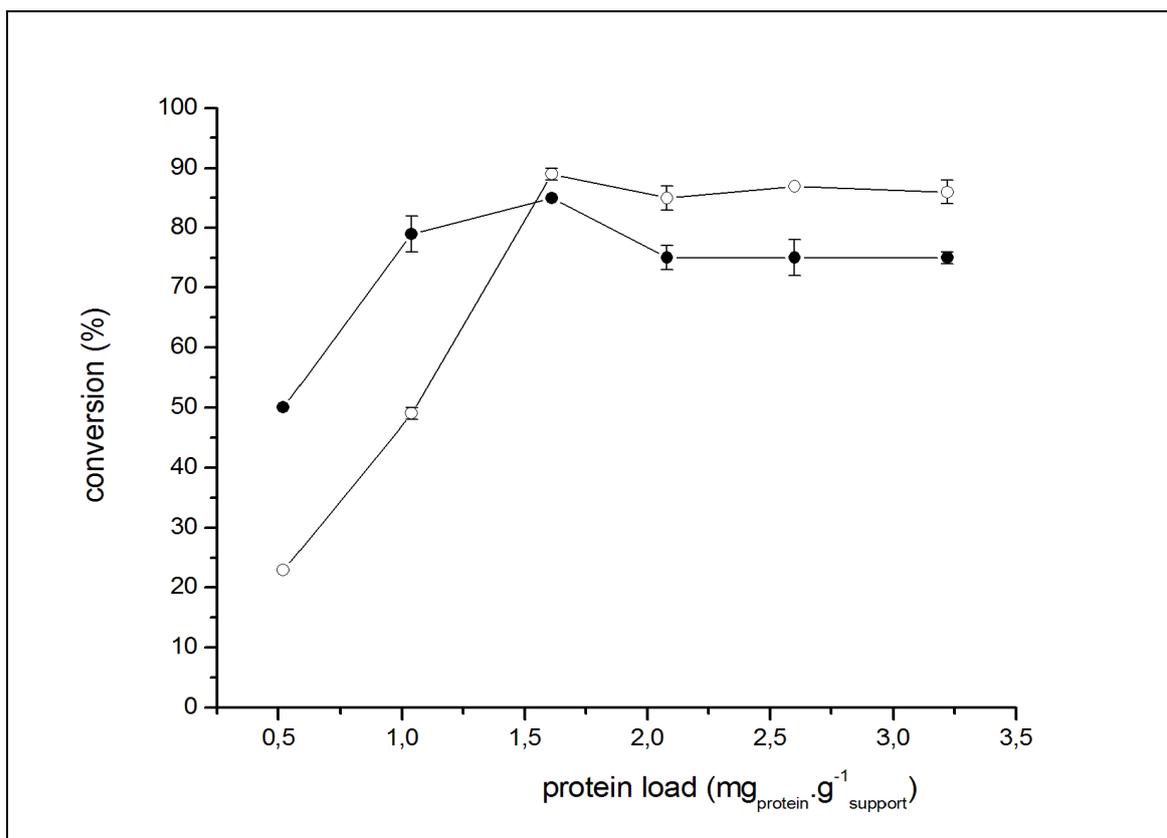
**Figure 1.**



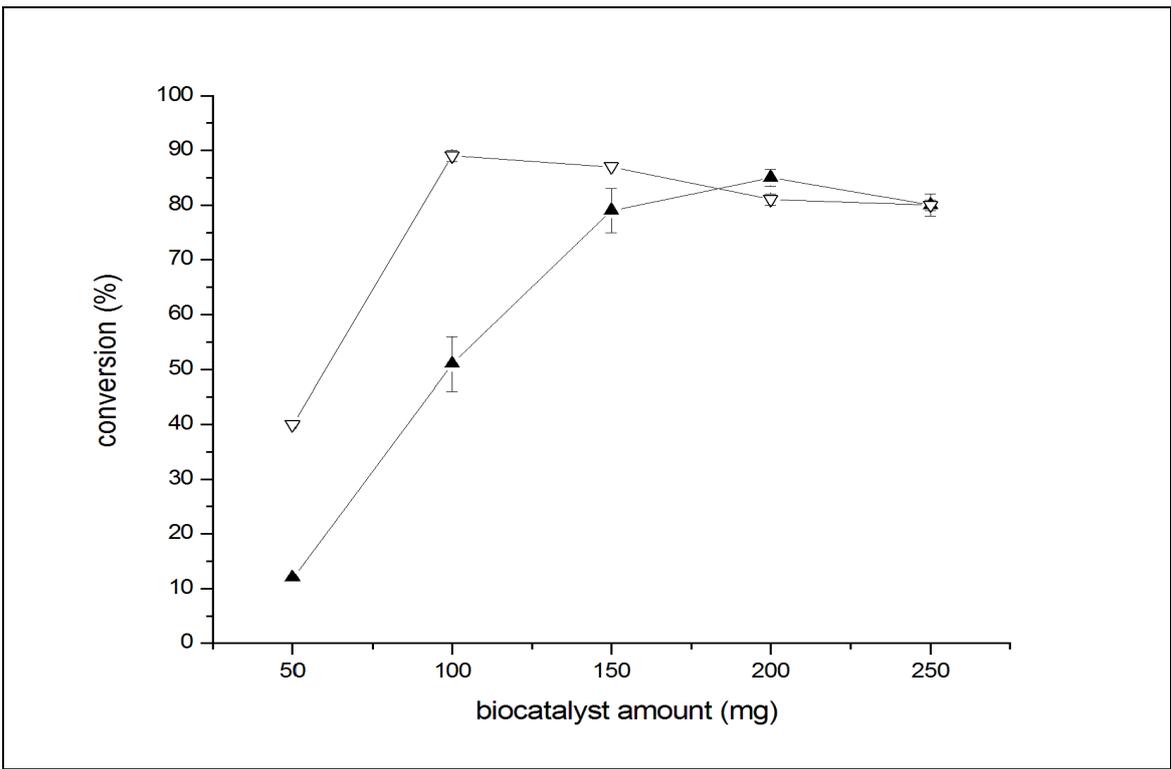
**Figure 2.**



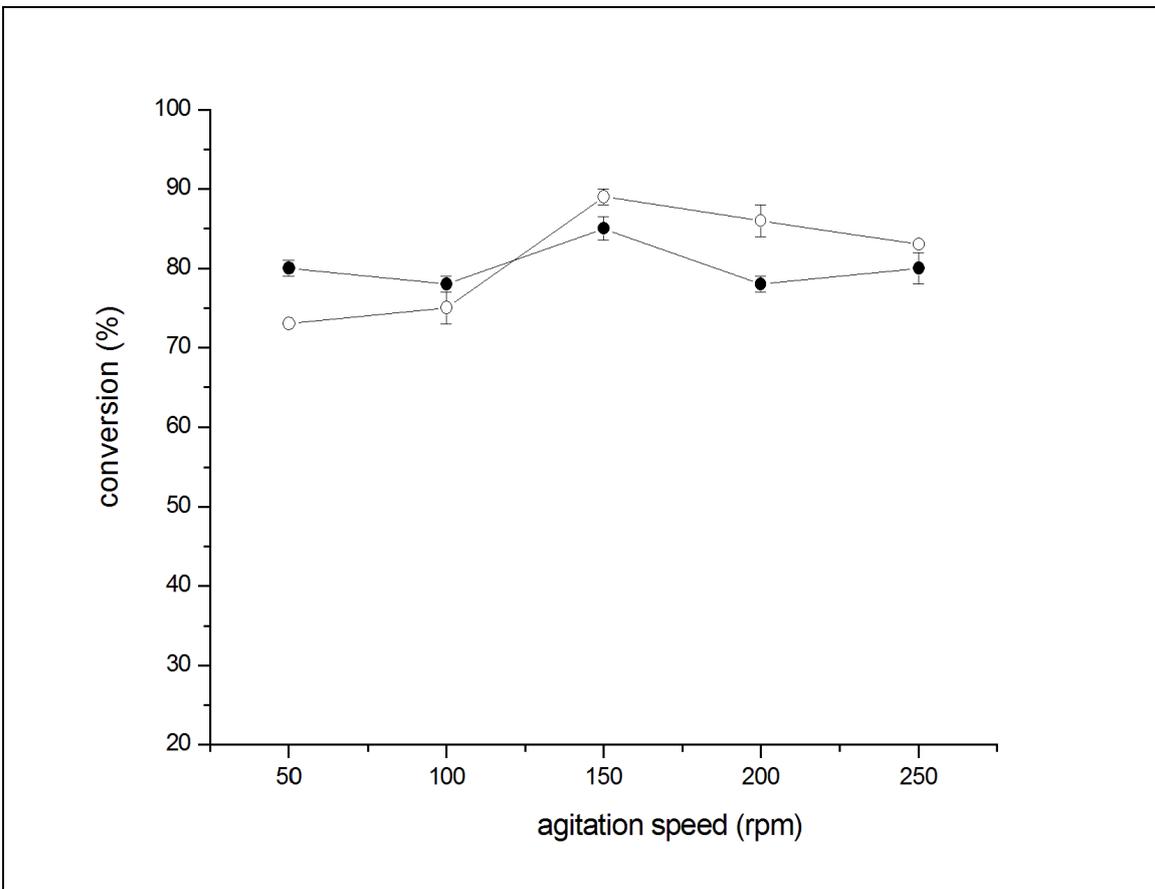
**Figure 3.**



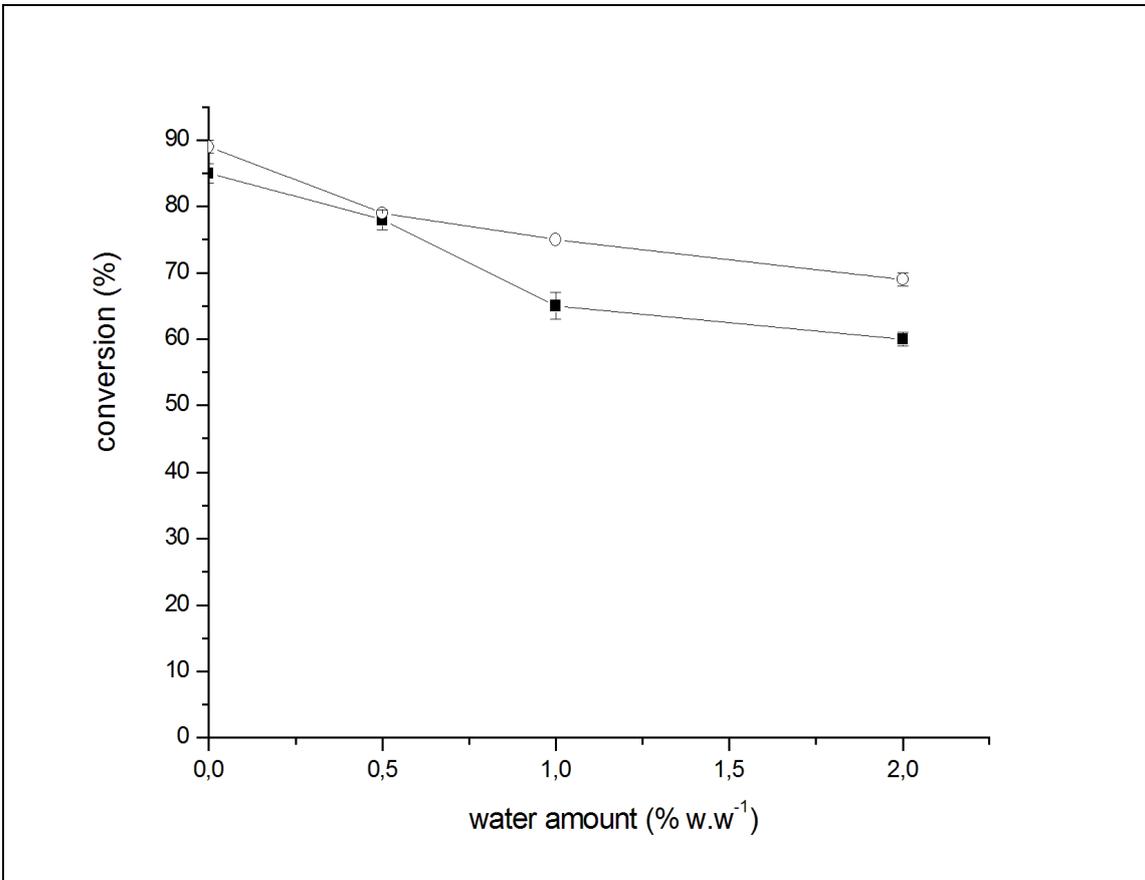
**Figure 4.**



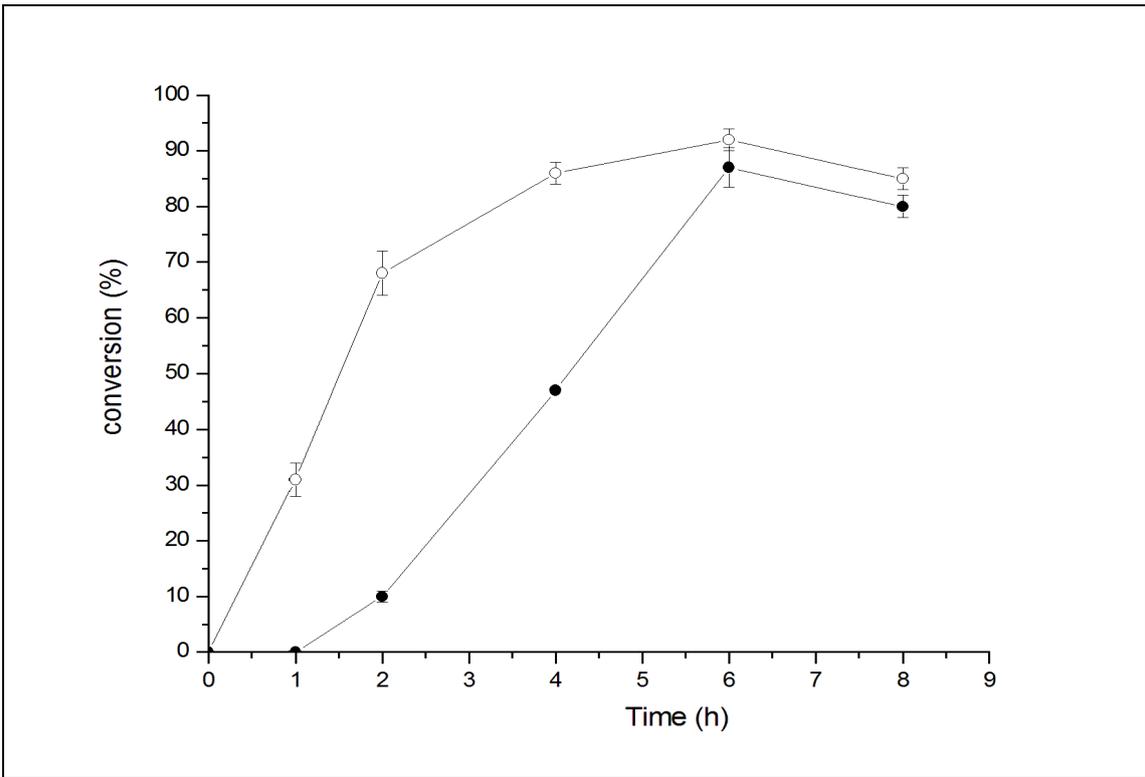
**Figure 5.**



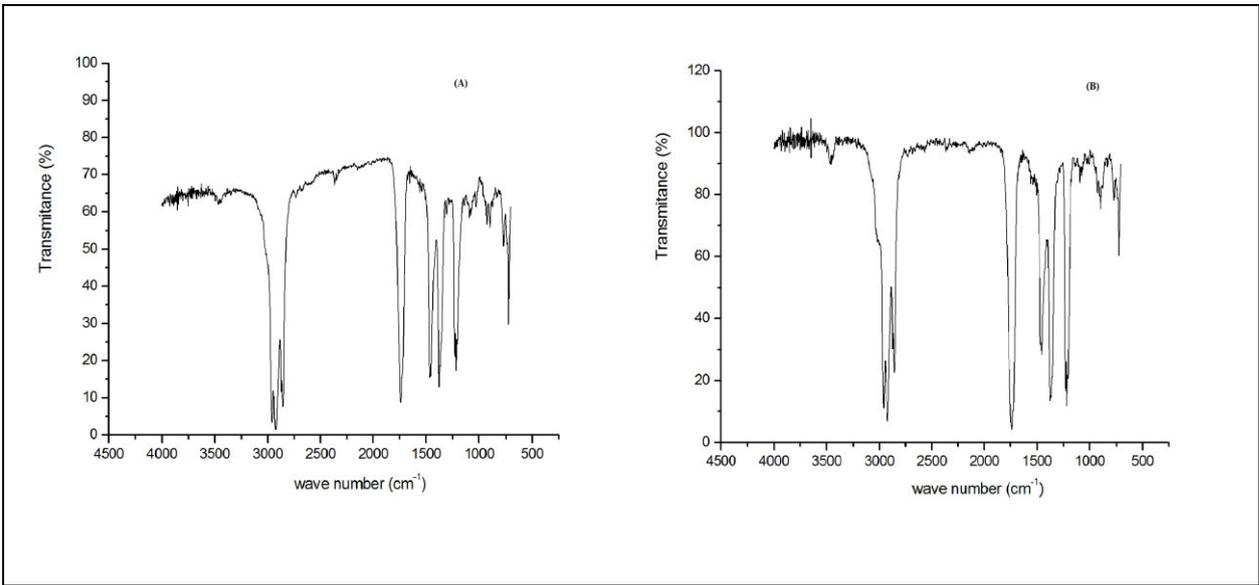
**Figure 6.**



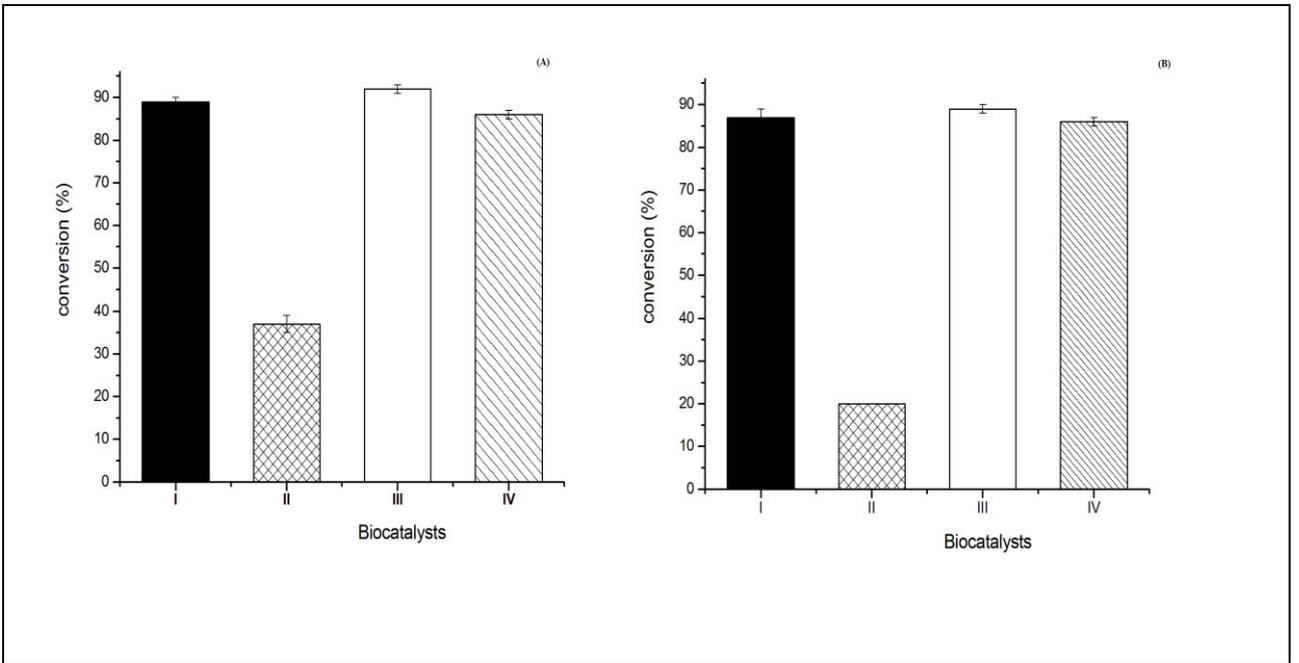
**Figure 7.**



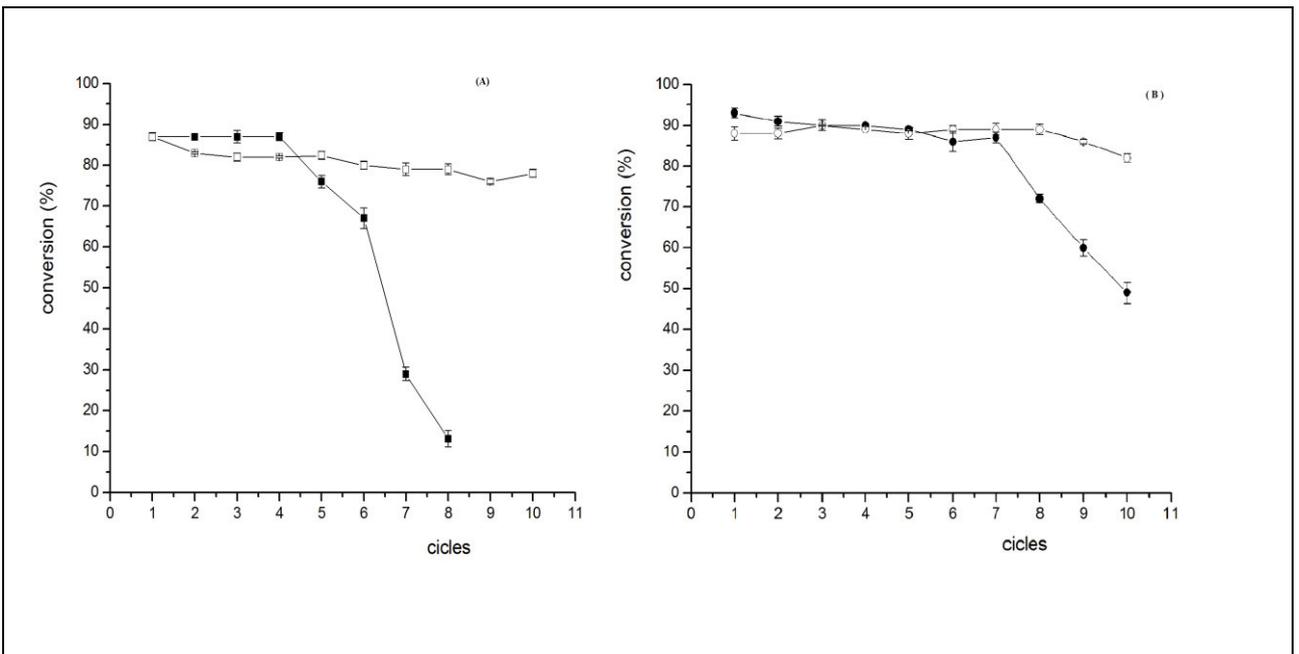
**Figure 8.**



**Figure 9.**



**Figure 10.**



**Figure 11.**

