



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



FERNANDO AMANCÍO PEREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Rhizomucor miehei* EM ORGANO-GEL:
DESENVOLVIMENTO DE UM CATALISADOR PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES**

CUITÉ – PB

2015

FERNANDO AMANCÍO PEREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Rhizomucor miehei* EM ORGANO-GEL:
DESENVOLVIMENTO DE UM CATALISADOR PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia, pela Universidade Federal de Campina Grande.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano

CUITÉ – PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

P436i Pereira, Fernando Amancio.

Imobilização de lipase de *Rizomucor miehei* em organogel: desenvolvimento de um catalisador para produção de ésteres. / Fernando Amancio Pereira. – Cuité: CES, 2015.

57 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Wellington Sabino Adriano.

1. Organo-géis. 2. Lipases. 3. Quitosana. 4. gelatina.
5. Ésteres. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615

FERNANDO AMANCÍO PEREIRA

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Rhizomucor miehei* EM ORGANO-GEL:
DESENVOLVIMENTO DE UM CATALISADOR PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES

Aprovação em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano
(ORIENTADOR)

(2º MEMBRO)

(3º MEMBRO)

CUITÉ-PB
2015

Dedico este trabalho a minha
família em especial aos meus pais,
João Amâncio e Maria do Socorro
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

O meu mais caloroso obrigado vai para duas pessoas que sempre cuidaram tão bem de seus filhos, e que encheram os olhos de lágrimas no dia da minha aprovação no vestibular, e desde então agarraram esse sonho com unhas e dentes, que foram meus pais, João Amâncio e Maria do Socorro (*in memoriam*), que são verdadeiros guerreiros, infelizmente minha mãe não pode esperar o fim de um sonho que era mais seu do que meu.

Agradeço a todos os outros familiares, que muito torceram e lutaram junto comigo nesses vários anos, tenho sorte de ter tido pessoas tão especiais nessa jornada, um muito obrigado a todos os meus irmãos e em especial as minhas quatro irmãs Silvania, Rosimere, Simone e Rosana, que são mulheres incríveis e batalhadoras com as quais sempre pude contar, e também a minha querida madrinha Maria Aparecida por todo o incentivo.

A todos os meus amigos de infância, aos amigos residentes, e aos demais amigos da universidade que a vida acadêmica me deu, em especial as pessoas de Márcia Dantas, Patrícia Oliveira, Manoel Marcelino, Josevandro Barros, Adenilza Souza, João Crispin, Isack Pinto, Edvalcilia Santos, Milena Faccio, Shellygton Lima e Geoclecia Cruz, que se tornaram minha família longe de casa, obrigado pelo carinho e companheirismo.

A todos os docentes do Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, por todos os ensinamentos compartilhados, em especial ao meu orientador o Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano, muito obrigado pelas contribuições e apoio.

A todos os meus professores desde o ensino infantil até o médio, obrigado pela colaboração para minha formação acadêmica e pessoal. A todos os funcionários da universidade, o pessoal dos laboratórios, da biblioteca, do restaurante universitário, funcionários da residência e toda a equipe.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta e indireta para a construção deste trabalho e para a realização deste sonho, o meu muito obrigado.

“Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes”.

Albert Einstein

RESUMO

As enzimas atuam como catalisadores de alta eficiência durante o transcurso das reações químicas, no entanto apesar de suas excelentes perspectivas e vantagens frente à catalisadores químicos sua aplicação na indústria não é tão imediata por algumas características como: a solubilidade no meio reacional, e a instabilidade operacional. Os organo-géis são suportes para imobilização que tem permitido superar as desvantagens citadas, e quando imobilizado lipases nesse sistema o conjunto se mostra um catalisador ideal para a produção e transformação de compostos bioativos, como os ésteres. Reações de esterificação são empregadas na produção de compostos de alto valor agregado em vários setores industriais. O objetivo desse trabalho foi à obtenção de catalisadores estáveis de lipase de *Rhizomucor miehei* em suportes de baixo custo com a adição de microemulsões visando à utilização deste catalisador na produção de ésteres. Os suportes foram preparados com o uso de dois polímeros como gelificantes, a gelatina e a quitosana sendo esses aplicados em géis distintos. Foi utilizado o hexano como fase orgânica e o tensoativo dodecilsulfato de sódio (SDS), para a síntese dos dois organo-géis. A atividade dos derivados foi determinada para posteriores aplicações em outros ensaios como o de estabilidade térmica, onde foi verificado o tempo de meia vida e o fator de estabilidade. A conversão foi analisada por meio de testes de 24 horas de duração a 37°C, com as amostras sob agitação, medindo a acidez inicial e final do meio reacional. O catalisador à base de quitosana se mostrou mais resistente e apresentou uma maior atividade, comparado ao de gelatina. Nos ensaios de estabilidade, o derivado a base de quitosana apresentou um maior tempo de meia vida e um maior fator de estabilidade do que a enzima livre, sendo assim, esse foi aplicado nas reações de esterificação. A maior conversão obtida foi de 80,0% na razão molar ácido/álcool de 1:1 nos ensaios sem o agente dessecante, e com o uso do amido essa conversão caiu para 68,16%. A conversão para todas as razões decaiu nos dois ensaios quando a quantidade de álcool usada foi aumentada. Essa conversão também decaiu quando se aplicou o amido aos ensaios. Presume-se que as grandes quantidades de álcool inibiram e/ou desnaturaram a enzima, e que o amido não otimizou os ensaios, visto que houve uma queda nos valores da conversão para os ensaios com esse agente dessecante.

Palavras-chave: Organo-géis, lipases, quitosana, gelatina, ésteres.

ABSTRACT

Enzymes act as highly efficient catalysts during the course of chemical reactions, however despite their excellent prospects and advantages over chemical catalysts to its application in industry is not so immediate for some features such as solubility in the reaction medium, and instability operating. Organo-gels which are supports for immobilization has allowed to overcome the disadvantages mentioned, and when immobilized lipase in this system the assembly shown an ideal catalyst for the production and processing of bioactive compounds, such as esters. Esterification reactions are employed in the production of compounds of high added value in various industrial sectors. The aim of this study was to obtain stable catalyst *Rhizomucor miehei* lipase in low-cost carriers with the addition of microemulsion aiming to use this catalyst in the production of esters. The supports were prepared using two polymers as jelly, gelatin and chitosan being applied in these different gels. Hexane was used as the organic phase and the surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS), two for the synthesis of organo-gels. The activity of the derivatives were determined for subsequent applications on other tests such as thermal stability, which found the half-life and the stability factor. The conversion was analyzed by 24-hour test at 37 ° C with stirring samples, measuring the initial acidity and the end of the reaction medium. The catalyst chitosan base proved more resilient and showed greater activity compared to gelatin. In the stability tests, the chitosan derivative base had a greater half-life and greater stability factor than the free enzyme, thus, it was applied in esterification reactions. The higher conversion obtained was 80.0% in molar ratio acid / alcohol 1: 1 in assays without the desiccant, and the use of starch that conversion decreased to 68.16%. Conversion ratios for all fell in both tests when the amount of alcohol used was increased. This conversion also declined when applied starch testing. It is presumed that large amounts of alcohol inhibited and / or denatured enzyme and the starch is not optimized assays, whereas there was a drop in the conversion of values for assays with this desiccant.

Keywords: Organo-gels, lipases, chitosan, gelatin, esters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A ação catalítica de lipases, onde um triglicerídeo pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos, visto também a reação inversa de síntese que pode combinar glicerol e ácidos graxos para formar o triglicerídeo.....	22
Figura 2: Ativação interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas.....	23
Figura 3: Mecanismo de esterificação.....	25
Figura 4: Imobilização de lipases aprisionando-as em micelas reversas.....	27
Figura 5: Imobilização de lipases por aprisionamento da enzima na forma de gel ou matriz polimerizado.....	28
Figura 6: Modelo proposto para a estrutura do organo-gel.....	29
Figura 7: Representação esquemática das estruturas primárias de (a) quitina e (b) quitosana.....	30
Figura 8: Estrutura do ácido oleico.....	31
Figura 9: Fluxograma para preparação do organo-gel a base de gelatina.....	33
Figura 10: Fluxograma para preparação do organo-gel a base de quitosana.....	33
Figura 11: Reação de hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB).....	34
Figura 12: Atividades medidas no processo de imobilização.....	35
Figura 13: Ensaio de estabilidade térmica para a enzima solúvel e imobilizada.....	36
Figura 14: Obtenção de ésteres a partir dos ácidos graxos livres do ácido oleico.....	39

Figura 15: Comportamento gráfico das absorvâncias, degradação do substrato no dimetilformamida.....	42
Figura 16: Enzima imobilizada no organo-gel a base de gelatina.....	43
Figura 17: Comportamento gráfico das absorvâncias, degradação do substrato pela enzima imobilizada.....	43
Figura 18: Enzima imobilizada no organo-gel a base de quitosana.....	45
Figura 19: Tubos com o organo-gel a base de quitosana imersos em hexano, para o ensaio de estabilidade térmica.....	45
Figura 20: Comportamento gráfico da estabilidade térmica apresentada pela enzima, livre (A), e enzima imobilizada (B), no organo-gel a base de quitosana.....	46
Figura 21: Gráficos referentes ao índice de acidez inicial (A), final (B).....	48
Figura 22: Perfis de conversão em função da variação da razão molar ácido/álcool nas reações de esterificação, sem uso do agente dessecante em (A), com a aplicação de zeólitas em (B).....	48
Figura 23: Perfis de conversão em função da variação da razão molar ácido/álcool nas reações de esterificação, com a aplicação do amido.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Vantagens e desvantagens quanto ao uso de enzimas imobilizadas.....	21
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Razões molares utilizadas de ácido graxo e etanol, e as concentrações equivalentes de ácido e etanol para cada razão molar.....	38
Tabela 2: Absorbância ao longo do tempo, enzima em dimetilformamida.....	41
Tabela 3: Absorbância ao longo do tempo, enzima no dimetilformamida após imobilização.....	42
Tabela 4: Absorbância ao longo do tempo, enzima no organo-gel.....	43
Tabela 5: Parâmetros comparativos, enzima livre e imobilizada.....	46
Tabela 6: Resultado dos ensaios de esterificação, onde se tem a média \pm desvio padrão de cada razão molar, sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AG: Porcentagem de ácidos graxos, %

Ar: Atividade relativa, adimensional

At: Atividade enzimática, U. mL⁻¹ ou U.g⁻¹

FE: Fator de estabilidade térmica

IA: índice de acidez, mg KOH.g⁻¹

pNP: p-nitrofenol

pNPB: butirato de p-nitrofenila

SDS: Dodecilsulfato de sódio

t_{1/2}: Tempo de meia-vida, minutos

X: Conversão, %

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 Enzimas.....	19
3.2 Lipases.....	21
3.3 Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> e os processos de esterificação.....	25
3.4 Suportes para imobilização.....	26
3.4.1 <i>Organo-gel</i>	27
3.4.2 <i>Gelatina</i>	29
3.4.3 <i>Quitossana</i>	30
3.5 Ácido oleico.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Material.....	32
4.2 Métodos.....	32
4.2.1 <i>Preparo do organo-gel a base de gelatina</i>	32
4.2.2 <i>Preparo do organo-gel a base de quitossana</i>	33
4.2.3 <i>Determinação da atividade hidrolítica da lipase e auto-degradação do substrato</i>	33
4.2.4 <i>Imobilização da lipase no organo-gel a base de gelatina</i>	35
4.2.5 <i>Imobilização da lipase no organo-gel a base de quitossana</i>	35
4.2.6 <i>Ensaio de estabilidade térmica</i>	36
4.2.7 <i>Parâmetros de inativação térmica</i>	37
4.2.8 <i>Aplicações do derivado na esterificação do ácido oleico com o uso do amido</i>	38
4.2.9 <i>Índices de acidez e porcentagem de ácidos graxos livres</i>	39
4.2.10 <i>Conversão em ésteres</i>	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Atividade da enzima livre.....	41
5.2 Imobilização no organo-gel a base de gelatina.....	41
5.2.1 <i>Atividade no dimetilformamida, antes da imobilização</i>	41
5.2.2 <i>Atividade no sobrenadante após a imobilização</i>	42

5.2.3 <i>Atividade do organo-gel, enzima imobilizada</i>	43
5.3 Atividade do derivado a base de quitosana e ensaios de estabilidade térmica.....	45
5.4 Ensaio de esterificação do ácido oleico na presença do amido.....	46
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	57
ANEXO A	57

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas na sua forma nativa (enzimas livres) pode ser rastreada desde as civilizações antigas na produção de alimentos e mais recentemente nas indústrias farmacêuticas e químicas. Atualmente quase 4000 enzimas são conhecidas, e dessas, cerca de 200 estão em uso comercial, sendo que esse número continua a multiplicar-se por causa das muitas transformações que podem catalisar (SHARMA, CHISTI; BANERJEE, 2001).

Com o intuito de reutilizar as enzimas nos processos industriais, como também de aumentar sua estabilidade, começaram a surgir às técnicas de imobilização. A enzima imobilizada estará física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz, usualmente sólida, insolúvel em água e inerte (COELHO et al., 2008). Esse sistema permite a condução de reações em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador–produto, e aumento da produtividade (PAULA et al., 2008).

Os ésteres orgânicos possuem muitas aplicações industriais, como a confecção de perfumes, sabores, produtos farmacêuticos, plastificantes e solventes. Os processos tradicionais para a síntese de ésteres são de custo elevado e muitas vezes de baixo rendimento, as rotas químicas estão sendo menos favorecidas visto que, ocorrem reações indesejáveis, baixa produtividade e uma grande poluição (YADAV; TRIVEDI, 2003). Sabendo que os processos químicos são mais caros e danosos ao meio ambiente por geralmente levarem à formação de subprodutos indesejáveis, é desejável desenvolver métodos a partir de matérias-primas mais baratas e com maior disponibilidade (OLIVEIRA et al., 2004).

Uma das alternativas viáveis para a síntese desses produtos, e que está sendo estimulada em muitos setores industriais é o uso de enzimas, pela alta qualidade dos produtos obtidos em função da sua alta especificidade, formando menos subprodutos, e utilizando condições mais amenas de temperatura e pressão. Os processos enzimáticos apresentam muitas vantagens em relação à síntese química, e isso os tornam menos danosos ao meio ambiente (MATOS, 2010; LERIN, 2010).

Dentre as muitas enzimas usadas nos processos industriais, as lipases se destacam cada vez mais e estão entre as mais utilizadas, porque reconhecem uma grande variedade de substratos e podem catalisar muitas reações diferentes, tais como hidrólise ou a síntese de ésteres. A promiscuidade das lipases faz com que essas sejam usadas em muitas reações com diferentes aplicações, como a produção de medicamentos, na produção de biodiesel, ou modificação de alimentos (RODRIGUES; FERNADEZ-LAFUENTE, 2010a).

As lipases têm sido extensivamente usadas em tecnologia de triglicerídeos, sendo aplicadas, principalmente, na biotransformação de óleos e gorduras. A alta especificidade destas com relação ao tipo e à posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo têm sugerido um grande número de aplicações na área de alimentos (OLIVEIRA et al., 2004). A enzimologia moderna tem conseguido melhorias no desenvolvimento e aplicação das lipases como catalisador. Novas técnicas de imobilização tornam possíveis a utilização destas enzimas em processos industriais de uma forma semelhante à catálise clássica para reações heterogêneas (SENGUPTA et al., 2013).

Uma das técnicas usadas para a imobilização de lipases são os organogéis, esses, são preparações a partir de microemulsões usando um agente para gelificação. A matriz de gel formada por esse agente, tal como a gelatina, retém os componentes (surfactantes, água e enzima), e pode ser tratado como um biocatalisador imobilizado que facilita a difusão de substratos não-polares e produtos. Os organogéis são utilizados como matriz para imobilização de enzimas para atingir catálise enzimática em meios não convencionais, eles são estáveis durante um longo período de tempo (BLATTNER et al., 2006; ZOUMPANIOTI, 2010).

Além de gelatina, biopolímeros tais como ágar, celulose e quitosana, têm sido relatados como agentes de gelificação. Dentre esses, a quitosana merece destaque, pois é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos de onde pode ser obtido esse polímero são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, a sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo seu acúmulo (BLATTNER et al., 2006; VIEIRA, 2009).

Muitos ácidos graxos são usados como substrato na produção de ésteres, sendo um deles o ácido oleico, exemplos de produtos químicos de alto valor, obtidos a partir do ácido oleico e com a aplicação de lipases para a esterificação, incluem a síntese de ésteres com álcoois alifáticos primários e secundários e álcoois terpênicos (OLIVEIRA et al., 2004). Portanto, o ácido oleico se mostra como um bom substrato para reações de esterificação a partir de lipases imobilizadas.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o estudo da imobilização de lipase em suportes de baixo custo, utilizando técnicas do organo-gel, visando à estabilização da enzima a ser utilizada na síntese química. Buscou-se, além de promover uma alternativa de aproveitamento de produtos regionais como os suportes de imobilização, contribuir para a expansão e diversificação da tecnologia farmacêutica industrial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Obtenção de catalisadores estáveis de lipase de *Rizhomucor miehei* em suportes de baixo custo com a adição de microemulsões visando à utilização deste catalisador na produção de ésteres.

2.2. Objetivos específicos:

- Estudar a imobilização de lipase para utilização na produção de ésteres;
- Avaliar o impacto da imobilização na estabilidade da enzima;
- Agregar valor a materiais de baixo custo como a quitosana;
- Comparar a aplicação da enzima livre e imobilizada;
- Avaliar a aplicação de lipases imobilizadas nos suportes sintetizados, em processos de esterificação do ácido oleico;
- Avaliar a adição do amido como ferramenta para otimizar a reação de esterificação pela retirada de água do meio.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que possuem um extraordinário poder catalítico frequentemente maior que aqueles dos catalisadores inorgânicos ou sintéticos. Elas se mostram altamente específicas frente aos seus substratos, aceleram as reações químicas e funcionam em soluções aquosas sob condições amenas de temperatura e pH (NELSON; COX, 2006).

As enzimas atuam como catalisadores em processos biológicos, aumentando a velocidade de uma reação química sem interferir no processo e sem serem consumidas durante o transcurso das mesmas. Estas são constituídas de longas cadeias de aminoácidos, encontradas em todos os seres vivos, pois fazem parte do metabolismo destes seres (VILLELA, 1977 *apud* CAMARGO, 2012). São encontradas especificamente em células animais ou de plantas, como também em microrganismos. Porém, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato e/ou quando ocorrem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Do ponto de vista industrial, as enzimas apresentam características notáveis, quando comparadas aos catalisadores químicos, devido à sua especificidade por dado substrato, e por promover apenas uma reação bioquímica, permitindo a síntese de um produto específico, sem a cocomitante formação de co-produtos. Quando se faz uso de enzimas as seguintes vantagens podem ser citadas: alta especificidade; condições suaves de reação; redução de problemas ambientais e toxicológicos; inexistência de toxidez, muito importante para o uso na indústria de alimentos; desenvolvimento de reações em temperatura e pH brandos, necessários muitas vezes para manter as propriedades de alimentos e outros compostos, e também minimizam o gasto de energia (COELHO et al., 2008).

As novas tecnologias e descobertas atuais já nos permitem um amplo uso e aplicações de diversas enzimas em diferentes vertentes industriais, mas essa utilização não é tão recente, se tem registros que o homem utiliza-se de enzimas a milhares de anos, de maneira empírica, em processos diversificados, como a fermentação do suco de uva para a obtenção do vinho, o uso do malte na preparação da cerveja, e do coalho na preparação do queijo. Mas essas aplicações se davam sem o conhecimento das propriedades e do modo de ação desses

catalisadores, que fora elucidado tempos depois, e foi a partir das primeiras décadas do século XX que o desenvolvimento da tecnologia de enzimas se intensificou (NELSON; COX, 2006; COELHO et al., 2008).

A aplicação industrial das enzimas apesar de muito desejada devido às vantagens apresentadas por essas, não é tão imediata. Esses biocatalisadores são geralmente caros, e de difícil recuperação após o uso, pelo fato de serem solúveis e estarem em baixa concentração no meio reacional. O que contorna parte destes problemas é a imobilização das enzimas em suportes insolúveis, pois permite o reuso da mesma. Outra característica indesejada que as enzimas apresentam é sua baixa estabilidade, pois elas só mantêm sua conformação e atividade em uma faixa limitada de condições experimentais (VIEIRA, 2009).

O processo de imobilização para uso desses biocatalisadores em escala industrial se tornou muito importante, e segundo Comerlato (1995), enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região definida no espaço com retenção de sua atividade catalítica, as quais podem ser usadas repetidamente e continuamente.

Brady e Jordaan (2009) citam que o desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante, pois proporcionam o reuso das enzimas, facilitam sua separação do produto final e aumentam a sua estabilidade frente a solventes orgânicos, sendo assim eles defendem que a economia do processo pode ser aumentada. O processo de confinamento também protege a enzima do excesso de água do meio. Entretanto mesmo estando imobilizadas as enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água que ajuda a manter sua conformação tridimensional ativa, pois a água contribui para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, além de limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Além das vantagens mencionadas o processo de imobilização permite inúmeras outras, como segue: o uso da enzima por períodos mais longos do que na forma solúvel; a redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator; um produto de fácil purificação, pois aqui o catalisador não contaminará o meio reacional; uma maior facilidade do controle operacional, operar de forma contínua possibilita um maior controle das variáveis do processo (VIEIRA, 2009; BERGAMASCO et al., 2000).

Entretanto alguns problemas ainda são enfrentados nas técnicas de imobilização e um dos principais, é a perda de atividade catalítica, especialmente devido ao impedimento estérico, entre as moléculas de enzima e substrato. Isso ocorre, porque o microambiente gera

efeitos nocivos, os quais diminuirão parâmetros cinéticos da enzima (OZYILMAZ, 2009). Outro sério problema são as limitações difusionais, essas impedem que o substrato chegue ao sítio ativo de interesse, como também que o produto saia do mesmo, reduzindo assim a atividade enzimática e velocidade de reação (KOVALENKO et al., 2009).

As principais vantagens e desvantagens tecnológicas já citadas, como também outras, quanto ao uso de enzimas imobilizadas são mostradas de forma resumida no quadro 1, a decisão sobre o uso da enzima em sua forma livre ou imobilizada obedecerá a uma avaliação econômica das alternativas do processo, isso se dá confrontando vantagens e desvantagem de forma quantitativa (COELHO et al., 2008).

Quadro 1: Vantagens e desvantagens quanto ao uso de enzimas imobilizadas.

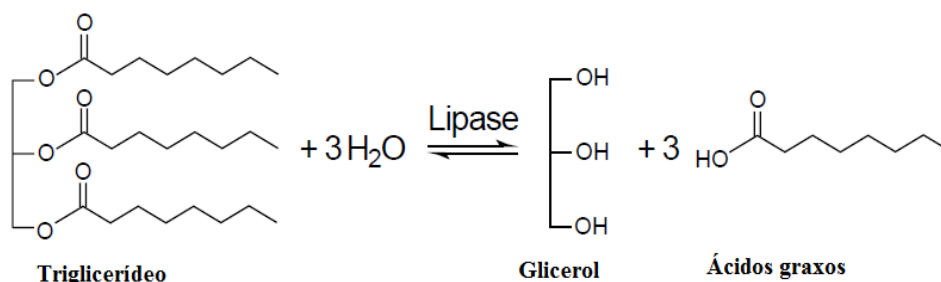
Vantagens	Desvantagens
Desenvolvimento de sistemas contínuos	Custo adicional de suportes, reagentes e da operação de imobilização
Maior estabilidade da enzima	Perdas de atividade durante a imobilização
Uso mais eficiente do catalisador através de reutilizações	Possíveis exigências adicionais de purificação do catalisador
Flexibilidade no projeto de reatores	Técnica pouco adequada a substratos insolúveis ou de alto peso molecular
Efluentes livres de catalisadores	Maiores riscos de contaminação na operação contínua dos reatores
Maior versatilidade na etapa de separação	Restrições difusionais e impedimento estereo
Menor custo de mão de obra	
Facilidade de automação e controle	
Possibilidade de utilização das enzimas “ <i>in-natura</i> ”	

Fonte: COELHO et al., 2008.

3.2 Lipases

As enzimas são classificadas em diferentes grupos que leva em consideração o tipo de reação que catalisam. Sendo assim, as lipases são classificadas como enzimas que pertencem à classe das hidrolases. Essas lipases (EC 3.1.1.3) catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de ésteres, que são formados a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (Figura 1). Estas reações geralmente prosseguem com elevada regio e/ou enantiosseletividade, com isso as lipases mostram-se um importante grupo de biocatalisadores em química orgânica (JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Figura 1: A ação catalítica de lipases, onde um triglicerídeo pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos, visto também a reação inversa de síntese que pode combinar glicerol e ácidos graxos para formar o triglicerídeo.



Fonte: JAEGER; REETZ, 1998.

A utilização das lipases na síntese orgânica mostra-se promissora devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, como também capacidade de utilização em uma ampla variedade de substratos, e estabilidade na presença de solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA et al., 2004; MENDES et al., 2013).

Messias et al. (2011), ressalta que as lipases são usualmente obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, exercendo um papel chave na modificação biológica de lipídios. Sendo que dessas, a principal fonte de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os micro-organismos.

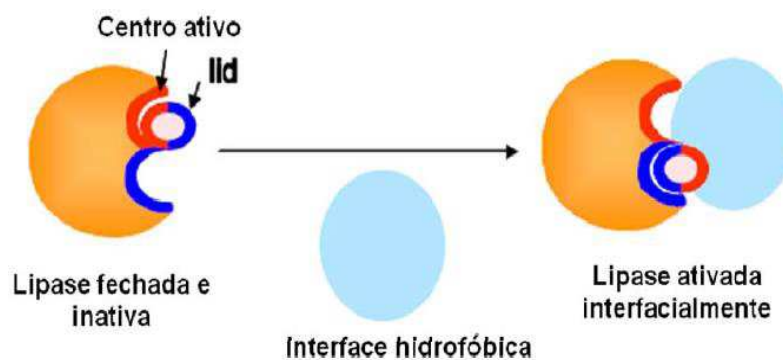
As reações lipolíticas na sua maioria ocorrem na interface água-lipídeo e toleram diferentes solventes usados nas reações (SHARMA, CHISTI; BANERJEE, 2001). O fato de essas requererem um meio reacional diferencial, pode impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea (JAEGER; REETZ, 1998).

Esse grupo de enzimas são biocatalisadores acessíveis e de baixo custo, que em geral, são flexíveis quanto a sua especificidade. As interações físico-químicas com seus substratos se mostra a diferença de maior importância entre as "verdadeiras" lipases e outras hidrolases, como as esterases. Para as esterases quanto maior a concentração do substrato maior a atividade, pois estas apresentam atividade de Michaelis-Menten normal, já as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. A atividade da lipase irá aumentar quando a concentração do substrato estiver próxima ou ultrapassar o seu limite de solubilidade. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (a concentração micelar crítica, CMC), porém somente em concentração acima desta, é chamada de *ativação*

interfacial. E o que explica esse mecanismo de ativação interfacial são as mudanças conformacionais na enzima (COSTA; AMORIM, 1999).

Atualmente entende-se que há uma grande complexidade no sítio catalítico das lipases e que a sua estrutura por si só, não explica o seu mecanismo porque estas apresentam duas diferentes conformações, uma onde o sítio ativo da enzima está fechado através de um oligopeptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou *lid*, que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio de reação, isso ocorre em meios aquosos e nesta conformação a lipase é considerada inativa. A outra conformação ocorre na presença de substratos hidrofóbicos (interfaces), quando há ligação do substrato na superfície da enzima; esta tampa desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma grande superfície hidrofóbica fazendo com que a mesma tenha uma grande afinidade por qualquer tipo de superfície hidrofóbica (nesta conformação a lipase é considerada ativa), (Figura 2). Este fenômeno é referido como “ativação interfacial”. Desse modo a “ativação interfacial”, relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, ou seja, as lipases atuam preferencialmente em substratos emulsionados (COSTA; AMORIM, 1999; BUCHHOLZ et al., 2005 *apud* VOLPATO, 2009).

Figura 2: Ativação interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas.



Fonte: VOLPATO, 2009.

A aplicação e recuperação desse grupo de enzimas em meio aquo-restrito vêm sendo desenvolvida conjuntamente com técnicas de imobilização das mesmas, visando à separação da enzima do meio reacional, seu reuso e maior estabilidade. A escolha do método de fixação quando se imobiliza uma lipase como também outras enzimas é extremamente importante, pois deve prevenir a perda de atividade enzimática, sem alterar a natureza química ou os

grupos reativos no local de ligação da enzima, mantendo as propriedades de interesse da mesma (MACHADO, 2011).

Portanto, um bom protocolo de imobilização deve oferecer uma alta atividade catalítica. Entretanto, algumas enzimas, a exemplo da lipase, podem ter duas formas com atividade muito diferente, e se formos capazes de corrigir a forma da enzima com maior atividade, a preparação final imobilizada pode ser mais ativa do que a forma nativa. O que altera a forma da lipase é o meio, pois na presença de gotas de substrato hidrofóbicos, lipases tornam-se fortemente adsorvida na interface destas gotas e o equilíbrio conformacional é deslocado para a forma aberta das lipases. Com base nessas características, estratégias para obter lipases imobilizadas com uma atividade melhorada têm sido desenvolvidas, tentando corrigir a forma aberta da lipase (MATEO et al., 2007).

Uma delas é a imobilização por adsorção em suportes hidrofóbicos, esse tipo mantém a lipase na forma ativa porque as áreas hidrofóbicas que cercam o centro ativo são envolvidas na adsorção estabilizando a forma aberta. O que ocorre é uma alteração conformacional induzida pela superfície hidrofóbica, fazendo com que haja uma mudança no equilíbrio entre as formas da enzima. Outra estratégia usada na imobilização para deslocar o equilíbrio entre as formas é o uso de surfactantes, quando se imobiliza na presença desses, pode-se obter uma lipase mais ativa, isso também ocorre através da fixação da forma aberta (PAIVA et al., 2000; MATEO et al., 2007).

As enzimas lipolíticas tem atraído muita atenção em virtude do seu potencial biotecnológico, o uso de lipases está intimamente relacionado às várias características que estas apresentam como vantagem, as aplicações de importância para indústria são diversas, como segue: uso de lipases em detergentes, devido à sua capacidade para hidrolisar gorduras; aplicação na indústria de alimentos, modificando características de interesse em lipídeos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001); nesse setor são várias as aplicações, incluindo o desenvolvimento de aromas e sabores dos produtos lácteos (queijo, manteiga, margarina, bebidas alcoólicas, chocolate de leite e doces). Também são usadas no tratamento de resíduos, por meio da quebra de sólidos de gordura, na produção de polímeros biodegradáveis, na produção industrial de celulose e papel, na indústria têxtil, na área de produção e melhoramento de cosméticos, dentre outras aplicações (JAEGER; REETZ, 1998; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

E um dos campos de aplicação onde a cada ano surgem novidades é a síntese orgânica, essa está se tornando cada vez mais importante, uma aplicação que tem merecido destaque é a possibilidade de catálise de lipase enantiosseletiva em escala industrial. Então se faz o uso da

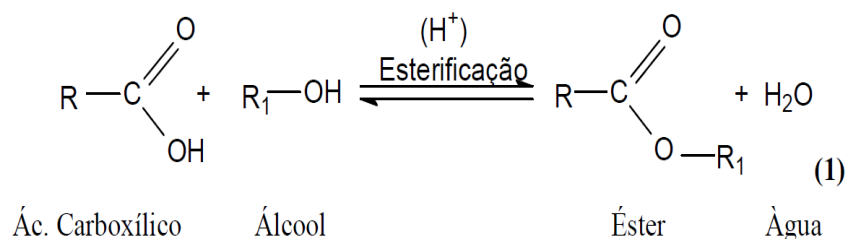
lipase na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, tendo em vista que essas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica (JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; MACHADO, 2011).

3.3 Lipase de *Rhizomucor miehei* e os processos de esterificação

Essa lipase é produzida pelo fungo *Rhizomucor miehei*, sendo uma enzima extracelular (BOEL, et al., 1988). Ela foi descrita pela primeira vez em 1973, e poucos anos depois, uma primeira utilização foi relatada na transformação de alimentos. A enzima purificada possui massa molecular de 31600 Dalton e uma constante isoelétrica de 3,8. Sendo formada por uma cadeia proteica única polipeptídica, constituída por 269 resíduos de aminoácidos (WU; JAASKELAINEN; LINKO, 1996; BRADY et al., 1990; RODRIGUES; FERNADEZ-LAFUENTE, 2010a).

Como já dito anteriormente as lipases, a exemplo da lipase de *Rhizomucor miehei* catalisam não somente a hidrólise como também a síntese dos ésteres, os processos de síntese ocorrem por meio da esterificação. Silva (2008), explica que a esterificação se dá a partir da substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoxila (-OR₁). E que, esta reação de um ácido carboxílico com um álcool, é reversível e ocorre a eliminação de água no processo. A reação ocorre conforme descrito na figura 3.

Figura 3: Mecanismo de esterificação.



Fonte: SILVA, 2008.

Em um dado momento haverá um equilíbrio químico entre os reagente e produtos, e as velocidades tanto da formação dos produtos, como da formação dos reagentes se manterão constantes. Para que seja obtido esse equilíbrio de forma mais rápida se faz uso de catalisadores e/ou do aumento da temperatura como ferramentas para aperfeiçoar o processo. Essa relação de velocidades entre a hidrólise e a esterificação, também é usualmente

controlada pelo conteúdo de água do meio reacional (CARVALHO et al., 2003; RIBEIRO, 2010).

Para Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010b), a esterificação pode ser usada tanto para obtenção de glicerídeos como também para reduzir a acidez de óleos de ácidos, e quando na esterificação se faz o uso de enzimas, algumas vantagens em relação aos processos químicos são obtidas, como a menor produção de produtos secundários e menos etapas de purificação. Quando se utiliza as lipases como catalisadores nesses processos outras vantagens podem ser citadas, tais como: o uso de qualquer substrato hidrofóbico, maior seletividade, melhores condições de processamento e uma melhor extração desse éster como produto final da reação (SENGUPTA, et al., 2013).

Visto que o grau de esterificação é altamente dependente das condições reacionais, em especial do conteúdo de água, por esse promover a hidrólise, uma alternativa é a adição de solventes orgânicos no meio reacional como forma de impedir a hidrólise e aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos, tornando viável a reação (RIBEIRO, 2010).

Os ésteres orgânicos podem ser utilizados em diversas áreas como: solventes, fragrâncias, aromas, sabores, plastificantes e precursores em uma variedade de indústrias. Os ésteres alifáticos são utilizados como aromatizantes na indústria alimentar e ésteres aromáticos em composições de fragrâncias. A lipase de *Rhizomucor miehei* já apresentou ótimas características e foi sucesso em muitas reações de esterificação, a sua estabilidade e atividade sob muito baixa a_w (Atividade de água), torna esta enzima um candidato muito bom para este tipo de reações (YADAV; TRIVEDI, 2003; RODRIGUES; FERNADEZ-LAFUENTE, 2010a).

3.4 Suportes para imobilização

Os procedimentos de imobilização resultam em melhorias notáveis em termos de desempenho, no entanto para obter um biocatalisador com boas características um passo primordial é a escolha do suporte, as características físicas do suporte são cruciais para a imobilização de enzimas e influenciarão de maneira direta no comportamento catalítico. Por isso, se faz necessário nos estudos sobre imobilizações a escolha de materiais de matrizes certas com propriedades que vão melhorar a atividade da enzima, como também a escolha de boas condições de imobilização (MILETIĆ et al., 2009).

Para que o suporte seja efetivo na imobilização, este deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema

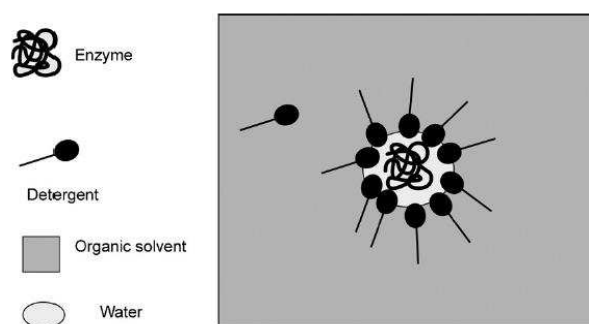
(suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que alterações indesejadas se façam presentes como as distorções estruturais que levam a diminuição ou perda da atividade enzimática (DALLA-VECHIA et al., 2004).

Não existe uma técnica de imobilização ou suporte ideal para todos os processos enzimáticos e isso se dá devido a grande especificidade das reações enzimáticas. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá das características de cada enzima e as condições de uso da enzima imobilizada. Para uma escolha econômica do método é necessário o conhecimento da reação desejada, o processo de aplicação da enzima imobilizada, condições do meio, modificações causadas na estabilidade, atividade, pH e demais fatores. Na maior parte das vezes é realizado o procedimento de imobilização em vários suportes por meio de diferentes métodos, avaliando-se a seguir a atividade do sistema imobilizado, e então escolher o que oferece uma maior atividade após a imobilização (COELHO et al., 2008).

3.4.1 *Organo-gel*

As microemulsões água-em-óleo, conhecidas também como soluções micelares reversas (Figura 4), podem ser transformadas, sob certas condições em géis altamente viscosos. Uma vez que o componente principal é um solvente orgânico, estes géis podem ser referidos como organo-géis (LUISI, 1990).

Figura 4: Imobilização de lipases aprisionando-as em micelas reversas.



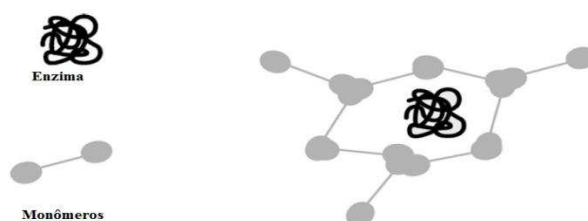
Fonte: RODRIGUES E FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a.

Essas microemulsões podem ganhar consistência de gel pela adição de agentes gelificantes como gelatina, derivados de celulose, ou ágar, dando origem a uma matriz adequada para a imobilização de enzimas. O termo "gel" é usado para caracterizar sistemas sólidos ou semi-sólidos consistindo em pelo menos dois componentes. Eles são sistemas de

condensado que consiste de um líquido, enquanto no seu interior há outro solvente orgânico, e as moléculas podem ser transferidas pela parede do gel por meio da difusão (ZOUMPANIOTI, 2010).

Essa técnica de imobilização baseia-se no aprisionamento da enzima em uma matriz (Figura 5). Esta técnica de imobilização pode ser bastante simples, e a geração de um ambiente circundante definido, pode ter alguns efeitos positivos, no entanto, o aprisionamento pode enrijecer a enzima (RODRIGUES; FERNADEZ-LAFUENTE, 2010a).

Figura 5: Imobilização de lipases por aprisionamento da enzima na forma de gel ou matriz polimerizado.



Fonte: RODRIGUES E FERNADEZ-LAFUENTE, 2010a.

Como o organo-gel se origina a partir de uma microemulsão, este será uma dispersão isotrópica e opticamente transparente de óleo em água (O/W) ou de água em óleo (W/O), onde o óleo é um solvente orgânico (hexano, heptano). Como as micro-emulsões são sistemas organizados, elas são fáceis de serem preparadas. A estabilidade da microemulsão depende da razão da concentração de água pelo surfactante adicionado ao meio (JESUS et al., 1997).

No caso da microemulsão água em óleo (W/O), o meio é constituído por pequenas nanogotículas aquosas dispersa numa fase orgânica não polar, estabilizadas por tensoativos. Esse sistema proporciona uma fase aquosa, onde enzimas hidrofílicas podem ser hospedadas, e uma fase orgânica não polar onde substratos ou produtos hidrofóbicos são solubilizados (ZOUMPANIOTI, 2010). A estrutura proposta para o sistema organo-gel ou MBG (do inglês “microemulsion-based gels”) está representada na figura 6.

Figura 6: Modelo proposto para a estrutura do organo-gel.



Fonte: JESUS et al., 1997.

3.4.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína solúvel, obtida pela desnaturação térmica do colágeno isolado de pele animal, ossos e cartilagens, usando ácidos diluídos. As moléculas de colágeno são compostas por três cadeias entrelaçadas, cadeias alfa, arranjadas em tripla hélice, e esse polímero contém um número grande de glicina, prolina e resíduos de 4-hidroxiprolina. A sua estrutura é principalmente estabilizada por cadeia intra e inter de ligação de hidrogênio, esse produto quase sempre segue uma sequência de repetição Gli-XY, em que X é principalmente prolina e Y é principalmente hidroxiprolina (ADRIANO, 2008; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

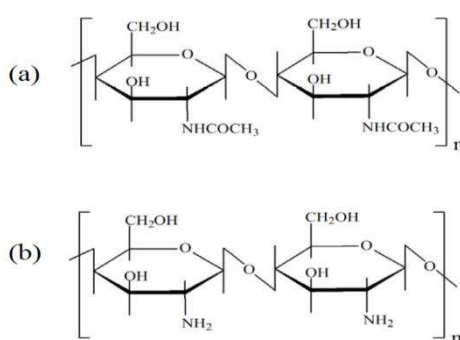
Gelatina é bem conhecida por sua ótima capacidade em formar géis não permanentes a temperatura ambiente e é largamente usada na indústria alimentícia, como agente emulsificante, como também nas indústrias cosmética e farmacêutica, com outros fins (MOREIRA, 2004).

A qualidade de gelatina para uma aplicação particular depende em grande parte das suas propriedades reológicas. Além de propriedades físico-químicas básicas, como parâmetros de composição, solubilidade, transparência, cor, odor e sabor. Os principais atributos que melhor definem a qualidade comercial da gelatina são; a força do gel e estabilidade térmica (gelificação e temperaturas de fusão), (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

3.4.3 Quitosana

A quitosana é um copolímero constituído por unidades N-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis, sendo composta predominantemente, por unidades *D*-glicosamina (Figura 7), (SILVA, 2006). Este biopolímero policatiônico é geralmente obtido por desacetilação alcalina de quitina, que é o componente principal do exoesqueleto de crustáceos, tais como camarões (BERGER, 2004).

Figura 7: Representação esquemática das estruturas primárias de (a) quitina e (b) quitosana.



Fonte: ADRIANO, 2008.

As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes em áreas de costa marítima e são rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram como poluentes. A produção de quitosana é uma reciclagem desse material, e sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (SILVA, 2006; VIEIRA, 2009).

O interesse por esse polímero se deve ao fato, desse ser abundante na natureza, sua produção ser de baixo custo e ecologicamente interessante. Já como suporte para a imobilização de enzimas se deve às suas diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras e outras, além da presença de diferentes grupos funcionais, como hidroxila e amino, que permitem a utilização de diferentes métodos de imobilização (BERGER, 2004; MENDES et al., 2011).

Apesar de os polímeros naturais apresentarem vantagens em relação aos sintéticos por terem menos limitações quanto à biodegradação e biocompatibilidade, eles podem exibir uma limitação em suas reatividades e processamentos (ADRIANO, 2008).

3.5 Ácido oleico

O ácido oleico (ácido cis-9-octadecenoico) é um dos ácidos graxos mais importantes na natureza. Pode ser produzido a partir de óleos de plantas, e os ésteres produzidos pela catálise enzimática podem ser aplicados como lubrificante (SENGUPTA et al., 2013).

O ácido oleico é um ácido graxo de cadeia longa possuindo 18 carbonos na sua estrutura e por possuir uma dupla ligação no nono carbono de sua cadeia, é chamado de ácido graxo mono-insaturado. É também um ácido carboxílico por possuir um grupo funcional COOH (PASSOS, 2007).

Exemplos de produtos químicos de alto valor, obtidos a partir do ácido oleico e com a aplicação de lipases para a esterificação, incluem a síntese de ésteres com álcoois alifáticos primários e secundários e álcoois terpênicos e a produção de ésteres dos álcoois geraniol e mentol com ácido butírico e ácido láurico, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2004).

O ácido oleico possui em uma das extremidades uma ligação C=O e uma hidroxila e em consequência disso é uma molécula polar (Figura 8). Sua dupla ligação induz uma curvatura na cadeia, dificultando assim o rearranjo das moléculas, enfraquecendo as interações entre moléculas vizinhas, que são as interações de Van der Waals. Com isso, à temperatura ambiente, o ácido oleico encontra-se na fase líquida (PASSOS, 2007).

Figura 8: Estrutura do ácido oleico.



Fonte: MARIA, 2009.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Como suportes para imobilização utilizou-se quitosana na forma de pó, sendo adquirida junto a POLYMAR IND. LTDA, com grau de desacetilação de aproximadamente 85,9%, e gelatina em pó incolor, sem sabor da marca Royal[®].

Os reagentes utilizados para a preparação dos organo-géis, e para outros fins na pesquisa foram: hexano P.A, álcool etílico P.A, dodecilsulfato de sódio (SDS), ácido acético glacial 95%, dimetilformamida, butirato de p-nitrofenila (pNPB).

Para a imobilização foi utilizada a lipase (E.C 3.1.1.3) de *Rizhomucor miehei*, Palatase[®] 20,000L da Sigma Aldrich com atividade específica de 450 U/mL de extrato.

No processo de esterificação usou-se o ácido oleico, e como agente dessecante o amido na forma de pellets, da marca YOKI[®], tendo como nome comercial sagu.

4.2 Métodos

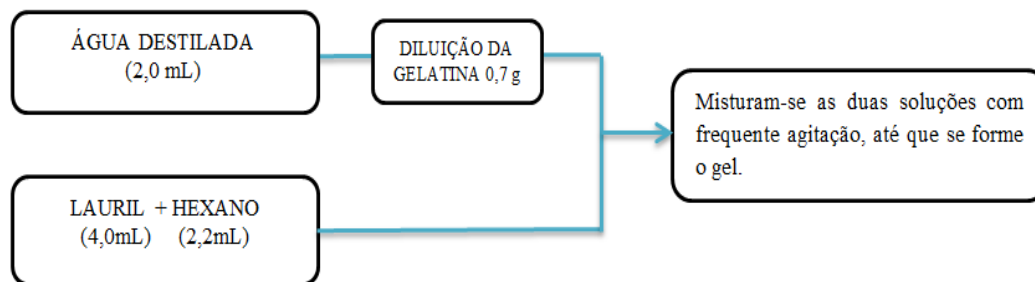
4.2.1 Preparo do organo-gel a base de gelatina

O organo-gel foi preparado na capela de exaustão, com seus componentes levados separadamente ao banho-maria (temperatura em torno de 40 a 50 °C).

No banho-maria foram colocados dois béqueres, um deles contendo 2,0 mL de água e quando aquecida, diluiu-se 0,7g de gelatina, e no outro 4,0 mL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,5M (feito em água destilada) + 2,2 ml de hexano, essa segunda solução foi feita à temperatura ambiente.

No momento em que as duas soluções foram aquecidas, e misturadas sob frequente agitação, originou o organo-gel. A agitação não pode se dar de maneira brusca para que não comprometesse a consistência do gel (Figura 9).

Figura 9: Fluxograma para preparação do organo-gel a base de gelatina.

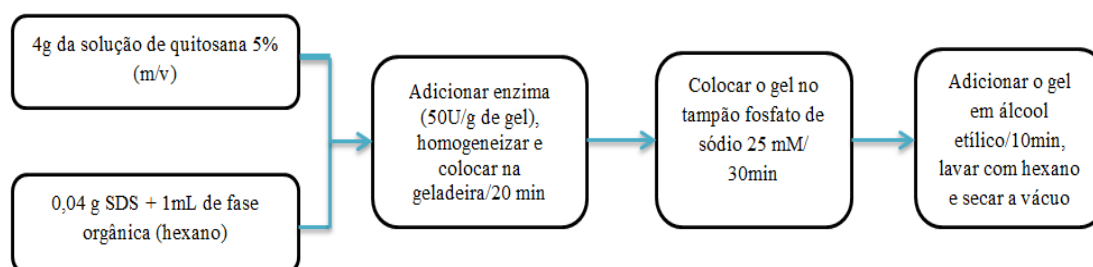


4.2.2 Preparo do organo-gel a base de quitosana

O organo-gel a base de quitosana foi preparado na capela de exaustão e a temperatura ambiente, feito a partir de uma solução de ácido acético a 5% (v/v) com um controle do pH em 5,0, adicionando a quitosana até a concentração de 5% (m/v).

Dissolveu-se 0,04g de dodecilsulfato de sódio (SDS) em 1 mL da fase orgânica (hexano), e adicionaram-se 4 g da solução de quitosana, agitando com bastão até formar a emulsão. Essa emulsão foi levada a geladeira por 20 minutos, depois, colocada em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 10,0, por 30 minutos, para que ocorresse a neutralização do pH e a coagulação da quitosana, posteriormente colocou-a em álcool etílico por 10 minutos, para que ganhasse consistência de gel (Figura 10).

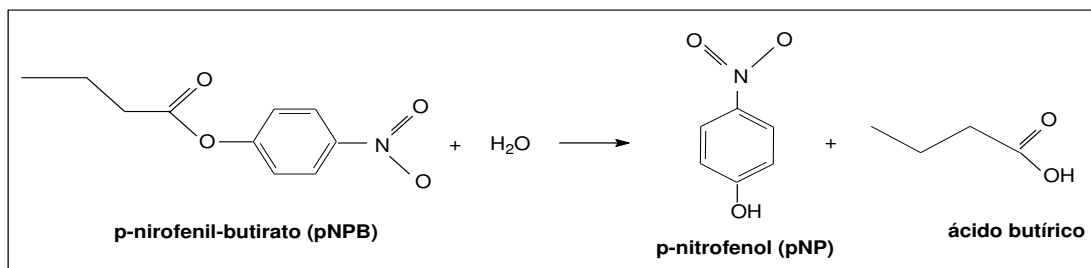
Figura 10: Fluxograma para preparação do organo-gel à base de quitosana.



4.2.3 Determinação da atividade hidrolítica da lipase e auto-degradação do substrato

A quantificação da atividade hidrolítica da lipase se deu através da hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB), sendo o produto da reação o p-nitrofenol (pNP), monitorado espectrofotometricamente utilizando um comprimento de onda de 400 nm (adaptado de Mogensen et al., 2005). A hidrólise do butirato de p-nitrofenila é mostrada na figura 11.

Figura 11: Reação de hidrólise do butirato de p-nitrofenila (pNPB).



Fonte: OLIVEIRA, 2012.

O método consiste na preparação de três soluções:

- Solução A: 26 µl pNPB (15 mM) em 10 mL de isopropanol.
- Solução B: tampão fosfato 25 mM, pH=7,0.
- Solução C: preparada misturando-se 29 mL da solução B com 1 mL da solução A.

Executou-se o ensaio em um reator de 30 mL à temperatura ambiente, sendo o mesmo iniciado com a adição de um volume pré-estabelecido do biocatalisador (solução da lipase em tampão, diluição de 1:200).

A hidrólise do pNPB é monitorada retirando-se alíquotas de 2 mL do meio reacional e medindo-se as absorbâncias de 2 em 2 minutos para determinar a tangente de reação linear. O tempo de monitoramento da reação estabelecido para esta determinação foi de 10 minutos. A atividade hidrolítica do derivado foi dada em unidades por mL de biocatalisador (U/mL).

Todo esse procedimento foi realizado em triplicata, para uma maior confiabilidade dos resultados obtidos. Foi oferecido a cada reator 1mL da solução de pNPB, 29ml de tampão, 100 µL da solução de enzima.

Com o intuito de calcular quanto da degradação de substrato é proveniente da atuação da enzima, também realizou-se o teste de auto degradação de substrato, que mede a degradação do substrato em tampão ao longo do tempo. Sendo usados 29 ml de tampão + 1 ml da solução de substrato, e mediu-se as absorbâncias a cada 2 minutos ao longo de 10 minutos.

A atividade enzimática foi obtida a partir da seguinte equação (1):

$$At = \frac{(\alpha - \alpha_{\text{branco}}) \times 0,0922 \times V_{\text{reator}}(\text{mL})}{V_{\text{enzima}}(\text{mL}) \text{ ou } m_{\text{derivado}}(\text{g})} \quad (1)$$

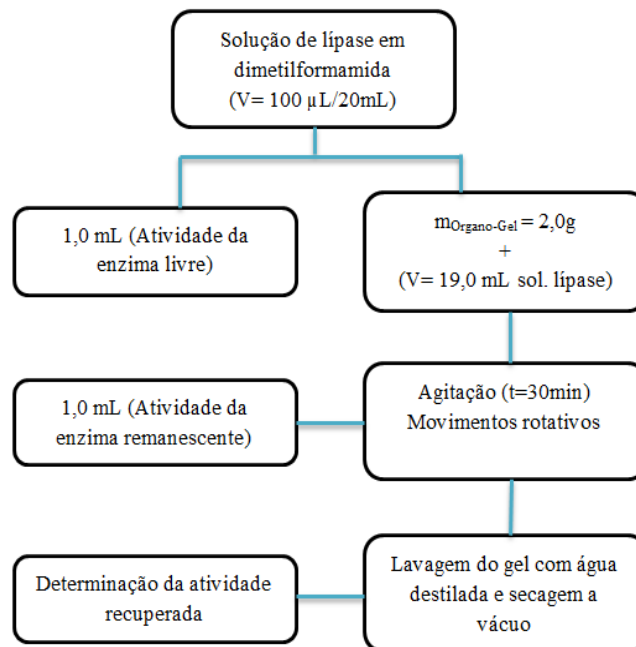
Onde: At é a atividade enzimática (U/mL ou U/g), α é a tangente da amostra, α branco é a tangente do branco, 0,0922 fator da curva de calibração, V_{reator} é o volume do reator (mL) e m_{derivado} é a massa de derivado (g).

4.2.4 Imobilização da lipase no organo-gel a base de gelatina

A diluição enzimática foi feita em dimetilformamida, sendo 100 μ L de enzima para 20 mL de dimetilformamida.

Já a diluição enzimática feita para os testes de atividade da enzima livre e da auto degradação do substrato, foram feitas em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. Para a imobilização procedeu-se da seguinte forma: com o gel em um béquer, adicionou-se a enzima previamente diluída e se agitou o recipiente com movimentos rotativos por 30 minutos (Figura 12).

Figura 12: Atividades medidas no processo de imobilização.



4.2.5 Imobilização da lipase no organo-gel a base de quitosana

A imobilização nesse suporte se deu em uma das etapas de síntese do mesmo, onde no momento que as duas soluções são misturadas para formar a emulsão, adicionou-se a quantidade de enzima referente à quantidade de emulsão previamente medida (50U/g de gel).

A etapa de imobilização da lipase pode ser vista no esquema da figura 10, mostrado anteriormente. Para calcular a atividade desse derivado foram usados 3 reatores com as soluções preparadas de acordo com o item 4.2.3. Para determinação da atividade hidrolítica da enzima imobilizada, as absorbâncias foram medidas a cada 2 minutos e calculou-se a atividade do derivado para cada reator, fazendo uma média das 3 atividades.

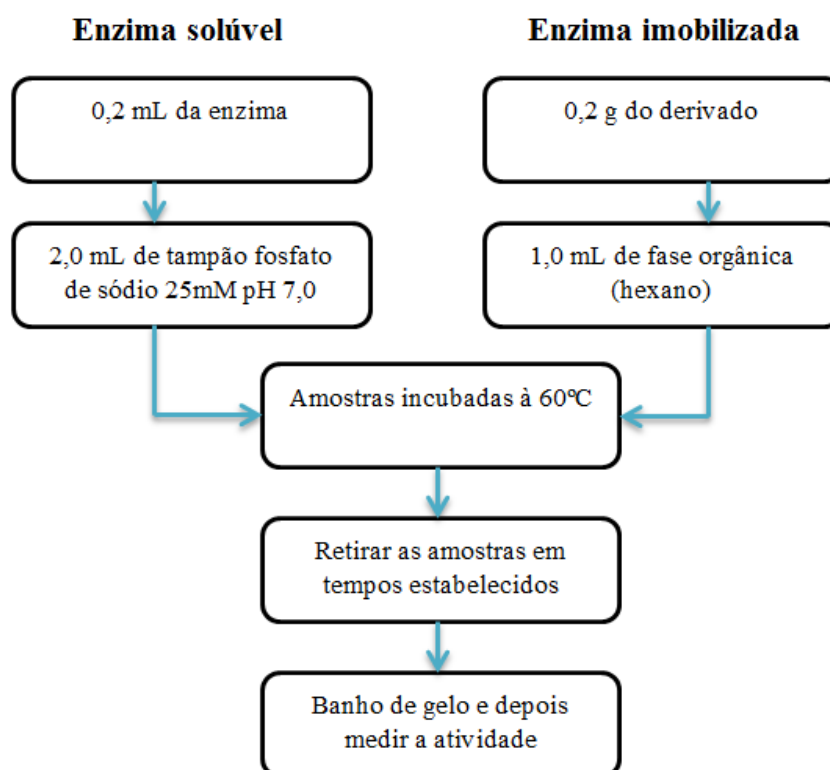
4.2.6 Ensaio de estabilidade térmica

Os ensaios de estabilidade térmica da lipase solúvel e na forma imobilizada foram realizados à temperatura de 60°C, para a avaliação da estabilização do derivado em relação à enzima solúvel.

Os ensaios com a enzima solúvel foram realizados por meio de incubação, adicionando-se 0,2 mL da enzima em 2 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 a 60°C, em banho-maria por um período de tempo pré-estabelecido. Sendo as amostras retiradas em tempos estabelecidos e colocados em banho de gelo para interromper o processo de inativação e em seguida feita a medida de suas atividades.

Para os ensaios feitos com a enzima imobilizada, mediram-se 0,2 g do derivado e foram colocados em 1 mL da fase orgânica (hexano), os derivados foram incubados nas mesmas condições, em banho-maria à 60°C por um período de tempo estabelecido, retirados e colocados em banho de gelo. Em seguida, seco sob vácuo e feita a medida da atividade (Figura 13).

Figura 13: Ensaio de estabilidade térmica para a enzima solúvel e imobilizada.



4.2.7 Parâmetros de inativação térmica

Para a avaliação dos dados obtidos nos ensaios de estabilidade térmica foi utilizado o ajuste exponencial não linear proposto por Sadana e Henley (SADANA; HENLEY, 1987), com isso pode-se obter os cálculos dos parâmetros eficiência, fator de estabilidade e tempo de meia-vida.

Primeiramente calculou-se a atividade relativa, definida como a razão entre a atividade enzimática do estado final (At_f) e a atividade enzimática do estado inicial (At_0), de acordo com a equação 2:

$$A_r = \frac{At_f}{At_0} \quad (2)$$

Através dos valores da atividade relativa plotou-se um gráfico, atividade relativa versus tempo, utilizando o Origin[®], a partir daí estima-se os parâmetros de estabilidade térmica kd e α .

O tempo de meia-vida, definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, é calculado através da equação 3:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{kd \times (1 - \alpha)} \quad (3)$$

Onde: $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida, kd é a constante de desativação e α é a relação entre a atividade específica no estado final e no estado inicial.

Depois de obtido o valor do tempo de meia-vida da enzima solúvel e do derivado calculou-se o fator de estabilização da enzima imobilizada. O fator de estabilidade é definido como a razão entre os tempos de meia vida do derivado e da enzima solúvel conforme equação 4:

$$FE = \frac{t_{1/2 \text{ derivado}}}{t_{1/2 \text{ enzima solúvel}}} \quad (4)$$

Onde: FE é o fator de estabilidade, $t_{1/2}$ derivado é o tempo de meia-vida do derivado e $t_{1/2}$ enzima solúvel é o tempo de meia-vida da enzima solúvel.

4.2.8 Aplicações do derivado na esterificação do ácido oleico com o uso do amido

O procedimento de esterificação foi realizado em diferentes proporções molares onde foi mantida a concentração de ácido oleico fixa em 5g e se variou apenas a concentração de álcool etílico 93,1% (v/v), nas seguintes razões molares 1:1; 1:5; 1:10; 1:15 e 1:20 respectivamente.

As quantidades a serem usadas de etanol nos ensaios foram calculadas a partir de cada razão molar a ser trabalhada e estão descritas na tabela 1, os testes foram realizados em duplicata e com os valores obtidos, calculou-se a média e o desvio padrão de cada razão molar.

Tabela 1: Razões molares utilizadas de ácido graxo e etanol, e as concentrações equivalentes de ácido e etanol para cada razão molar.

Razão molar ácido/álcool	Massa ácido graxo	Volume de etanol
1:1	5g	1,03mL
1:5	5g	4,13mL
1:10	5g	9,30mL
1:15	5g	14,47mL
1:20	5g	19,64mL

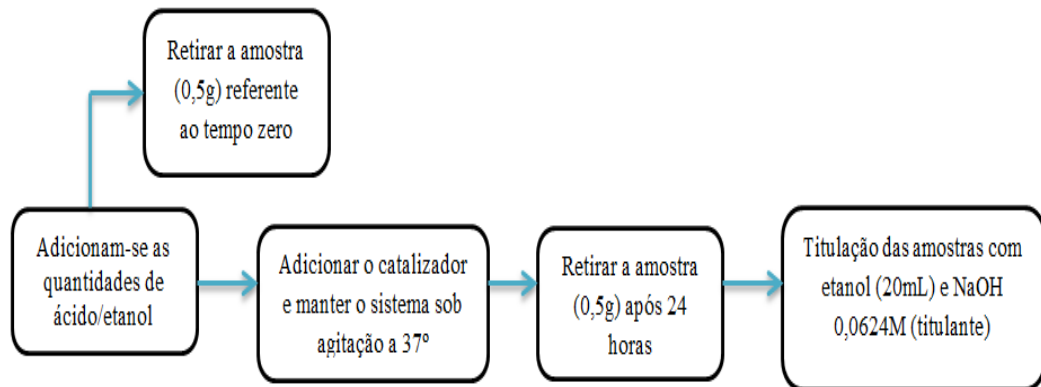
As reações de esterificação foram efetuadas em erlenmeyer de 250 mL, adicionando a quantidade necessária de ácido/etanol de acordo com a razão molar requerida para cada ensaio. Retirou-se a amostra referente ao tempo zero, que foi de aproximadamente 0,5g, para posteriormente ser titulada, quantificando assim o nível de acidez do meio reacional no tempo zero (Figura 14).

Logo após ser retirada a amostra do tempo zero adicionou-se ao meio 0,5g de derivado e 4g do amido, que foi adicionado para avaliar o efeito da retirada de água do meio reacional.

Esse sistema foi mantido sob agitação, em estufa a uma temperatura de 37°C por 24 horas, e após decorrido esse tempo foi retirado outra amostra em torno de 0,5g referente ao tempo de reação de 24 horas e então titulou-se essa amostra, procedendo-se da mesma maneira feita para a amostra referente ao tempo zero. Com esse resultado pode-se então calcular o nível de acidez existente após a reação.

A solução titulante usada foi hidróxido de sódio com concentração 0,0624M, e para diluir a amostra a ser titulada foi adicionado 20mL de álcool etílico, e 2 gotas de fenolftaleína como indicador. Com o resultado das titulações foi descontado a acidez proveniente do álcool e então a partir daí calculou-se o índice de acidez, porcentagem de ácidos graxos livres, e a conversão em ésteres, para as amostras no tempo zero e 24 horas.

Figura 14: Obtenção de ésteres a partir dos ácidos graxos livres do ácido oleico.



4.2.9 Índices de acidez e porcentagem de ácidos graxos livres

O método utilizado para medir o índice de acidez e a porcentagem de ácidos graxos livres são baseados na metodologia proposta pela *American Oil Chemistry Society* (A.O.C.S) métodos oficiais Cd 3d-63 e Ca 5a-40, respectivamente. Esses métodos consistem na utilização da solução de NaOH para titulação do ácido graxo livre na amostra segundo a metodologia descrita por Moreto e Fett (1998).

A partir dos volumes obtidos de NaOH gastos nas titulações, o índice de acidez pode ser determinado de acordo com a equação 5, e os valores de porcentagem de ácidos graxos são calculados conforme a equação 6.

$$IA \text{ (mg KOH/g)} = \frac{V \times f \times 56,11 \times M}{m} \quad (5)$$

$$\% \text{ AG}(\%) = \frac{V \times f \times 28,20 \times M}{m} \quad (6)$$

Onde: IA é o índice de acidez (mg KOH/g), V é o volume de solução de NaOH necessário para titular a amostra (mL), f é o fator de correção da solução de NaOH (em torno de 1), M é a molaridade da solução de NaOH (mol/L), m é a massa da amostra utilizada (g), 56,11 é o fator de correção com relação ao KOH e % AG é a porcentagem de ácidos graxos livres (%), expressa como ácido oléico, em óleos comuns, brutos e refinados e 28,2 é o fator de correção com relação ao ácido oleico.

4.2.10 Conversão em ésteres

O cálculo da conversão é feito a partir dos valores obtidos do índice de acidez no início (branco) e no final da reação de acordo com a equação 7:

$$X (\%) = \left(\frac{IA_o - IA_f}{IA_o} \right) \times 100 \quad (7)$$

Onde: X é a taxa de redução do índice de acidez (%), IA_o é o índice de acidez no início da reação e IA_f é o índice de acidez no final da reação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade da enzima livre

A atividade da enzima foi calculada com as absorbâncias obtidas de 3 reatores, que são mostradas na tabela A1 no Anexo A, a enzima apresentou uma $A_{tMédia} = 450,04$ U/mL.

No ensaio de auto degradação do substrato feito para observar se havia uma auto degradação do pNPB (substrato), as absorbâncias obtidas de um único reator são mostradas na tabela A2 no Anexo A.

A auto degradação do substrato não chegou a ser representativa, sendo assim não interfere na quantificação da atividade enzimática. No entanto esse valor ainda é considerado nos cálculos, para que a atividade calculada seja somente da atuação enzimática sobre o pNBP.

5.2 Imobilização no organo-gel a base de gelatina

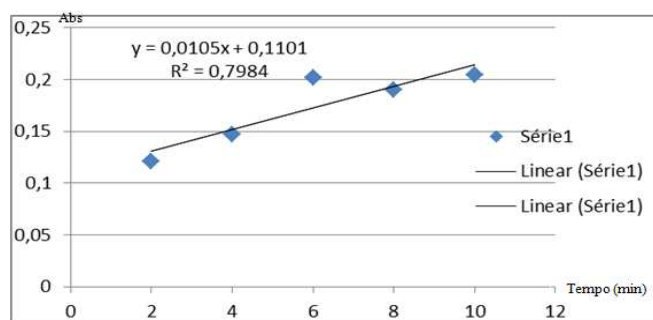
5.2.1 Atividade no dimetilformamida, antes da imobilização

Como o solvente utilizado na diluição enzimática para imobilização foi o dimetilformamida, então a atividade inicial foi medida nessa solução antes do processo de imobilização, sendo obtido um valor de 13,20U/mL. Os dados usados para os cálculos estão apresentados na tabela 2, e no gráfico da figura 15.

Tabela 2: Absorbância ao longo do tempo, enzima em dimetilformamida.

Tempo (min)	Absorbância
2	0,121
4	0,147
6	0,202
8	0,190
10	0,204

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Figura 15: Comportamento gráfico das absorvâncias, degradação do substrato no dimetilformamida.

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

5.2.2 Atividade no sobrenadante após a imobilização

Após a imobilização foi medido a atividade no sobrenadante para mensurar a atividade proveniente da enzima que não fora imobilizada. Os dados das medições são apresentados abaixo na tabela 3, verificou-se que no líquido sobrenadante não há nenhuma atividade enzimática, ou seja, não se tem enzimas ativas nesse meio.

Esse resultado leva a duas hipóteses prováveis, a primeira é que a enzima foi imobilizada com um rendimento de 100%, e a segunda é que parte da enzima não fora imobilizada, no entanto essa parcela não imobilizada desnaturou no dimetilformamida na etapa de imobilização.

Tabela 3: Absorvância ao longo do tempo, enzima no dimetilformamida após imobilização.

Tempo (min)	Absorvância
2	0,068
4	0,076
6	0,089
8	0,120
10	0,110

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Como se busca bons rendimentos do processo de imobilização pode-se dizer que os resultados encontrados foram positivos, já que objetiva-se fazer com que o sobrenadante após a imobilização não apresente atividade, ou se apresentar, que seja baixa.

5.2.3 Atividade do organo-gel, enzima imobilizada

A estrutura macroscópica do organo-gel a base de gelatina é mostrada na figura 16, onde a enzima se encontra no interior do centro micelar, internamente a estrutura do gel.

Figura 16: Enzima imobilizada no organo-gel a base de gelatina.



Fonte: Arquivo do autor, 2015.

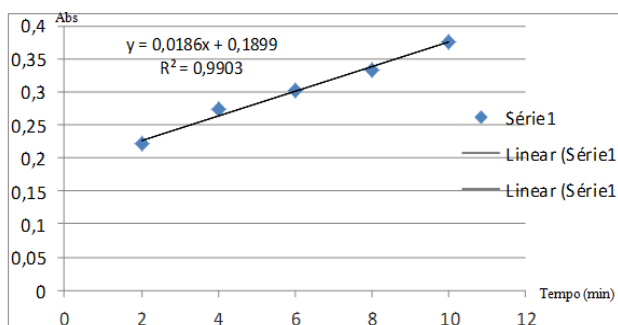
Os dados descritos na tabela 4 e na figura 17 foram medidos com a enzima imobilizada no suporte. Teoricamente, esperava-se uma atividade de 6,6U/g de suporte, entretanto, obteve-se uma atividade bem inferior que foi de 0,01U/g.

Tabela 4: Absorbância ao longo do tempo, enzima no organo-gel.

Tempo (min)	Absorbância
2	0,221
4	0,273
6	0,302
8	0,334
10	0,376

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Figura 17: Comportamento gráfico das absorbâncias, degradação do substrato pela enzima imobilizada.



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

A atividade apresentada aqui, ainda que seja baixa, mostra que parte da enzima foi imobilizada, e que esta apresenta atividade no organo-gel. Esse baixo valor pode ser resultante de problemas difusionais, que ocorrem pelo fato de a enzima estar ligada a um suporte sólido com sua mobilidade restringida, que podem dificultar a transferência de massa do sítio ativo da enzima, nesse caso o substrato pode não ter conseguido chegar ao sítio ativo, como também o produto não ter conseguido sair desse local (PESSELA et al., 2007; KOVALENKO et al., 2009).

No caso do organo-gel onde a enzima estava aprisionada as restrições difusionais estão diretamente relacionadas ao tamanho da matriz, a porosidade e o tamanho dos poros, esses fatores juntos podem levar a uma baixa atividade (CAO, 2005).

Outra complicação que pode ter acontecido no processo e também ter acarretado uma diminuição na atividade é o coeficiente de partição entre os solventes usados que podem ter ocasionado uma maior dificuldade na migração dos substratos no meio reacional. A escolha dos solventes deve ser cuidadosa tanto pelo coeficiente de partição, como também pelo fato de que muitos precursores da mistura do organo-gel podem desnaturar as enzimas (JESUS et al., 1997; HODGSON et al., 2004).

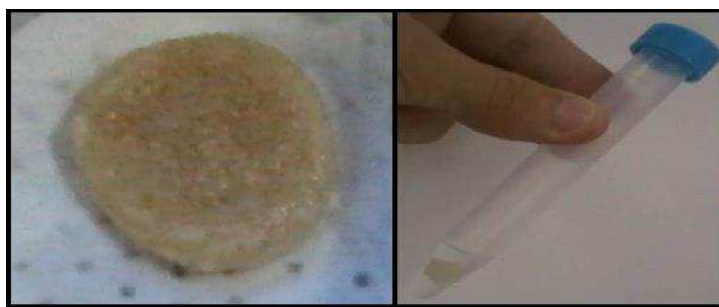
O organo-gel a base de gelatina apresentou alguns problemas quanto à resistência a meios hidrofílicos e também a ensaios que envolviam o uso de altas temperaturas, isso se deve ao fato de que a gelatina tem uma baixa estabilidade mecânica e térmica, uma alternativa seria o uso de biopolímeros mais resistentes tais como derivados de celulose (ZOUMPANIOTI, 2010). Segundo Kempka (2012), outra alternativa para tornar esses géis mais resistentes seria o uso de plastificantes bem como de concentrações maiores de gelatina na sua elaboração, pois, como visto em seu trabalho, as temperaturas de fusão das gelatinas puras cujos géis foram elaborados com 6,67 % de gelatina tiveram como ponto de fusão, temperaturas inferiores a 40°C.

Para continuar os trabalhos com esse suporte se faz necessário uma intensa pesquisa para melhorar suas propriedades tanto difusionais como as características físicas, os solventes usados também precisam de mais estudos e melhor caracterização. Visto que não seria possível fazer alguns dos testes com esse suporte, como por exemplo, a estabilidade térmica sem antes fazer mais estudos e alterações, estes só foram feitos com o organo-gel a base de quitosana.

5.3 Atividade do derivado a base de quitosana e ensaios de estabilidade térmica

A atividade do derivado obtida a partir do ensaio de determinação foi de $0,56 \text{ U/g}^{-1} \pm 0,11$, essa atividade se mostrou bem próxima da obtida em outros estudos que usaram a quitosana como suporte, como por exemplo, o de Cavalcante (2014) que foi de $0,5 \text{ U/g}^{-1}$, e o de Carneiro (2013) que foi de $0,88 \text{ U/g}^{-1}$. Sendo assim o organo-gel tendo a quitosana como agente gelificante se mostrou promissor como um catalisador, com boas características para a aplicação na síntese orgânica, na figura 18, tem-se a visão macroscópica do organo-gel a base de quitosana.

Figura 18: Enzima imobilizada no organo-gel a base de quitosana.



Fonte: Arquivo do autor, 2015.

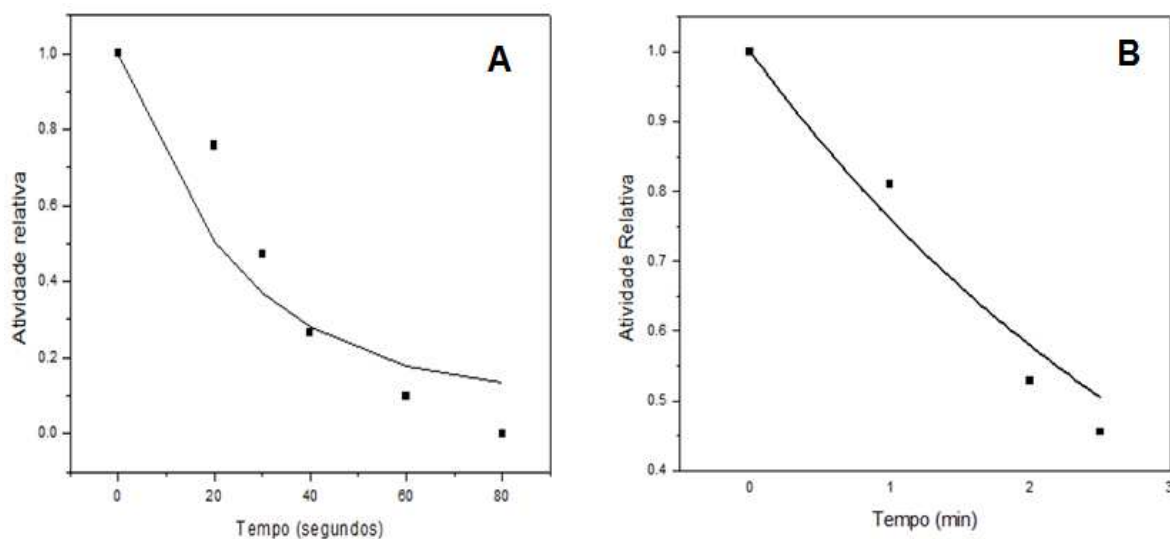
Os tubos usados para os ensaios de estabilidade térmica da enzima imobilizada podem ser vistos na figura 19, e os resultados obtidos a partir do ensaio de estabilidade térmica da lipase solúvel, e na forma imobilizada (organo-gel a base de quitosana) estão expressos nos gráficos da figura 20. Nesse gráfico podemos observar que está ocorrendo uma queda na atividade relativa em função do tempo, a diferença entre os dois ensaios é o tempo decorrido para que essa atividade descaísse pela metade. Que difere significativamente para enzima livre e na forma imobilizada.

Figura 19: Tubos com o organo-gel a base de quitosana imersos em hexano, para o ensaio de estabilidade térmica.



Fonte: Arquivo do autor, 2015.

Figura 20: Comportamento gráfico da estabilidade térmica apresentada pela enzima, livre (A), e enzima imobilizada (B), no organo-gel a base de quitosana.



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Alguns parâmetros comparativos da enzima livre e imobilizada foram obtidos a partir de cálculos feitos com os resultados dos ensaios, como o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e o fator de estabilidade, que são mostrados na tabela 5. Como já observado no gráfico que a atividade decaiu bem mais rápido para a enzima livre, e comprovado também pelo $t_{1/2}$ que foi de 0,41 minutos para enzima livre, e 2,50 minutos para o derivado, evidenciando que houve um aumento na estabilidade da enzima quando imobilizada, e com isso uma diminuição na perda de atividade ao longo do tempo. Esses resultados foram superiores aos obtidos por Cavalcante (2014), que trabalhando com o organo-gel de mesma constituição obteve um $t_{1/2}$, de 0,8 minutos e um fator de estabilidade de 1,8.

Tabela 5. Parâmetros comparativos, enzima livre e imobilizada.

Parâmetro	Enzima livre	Enzima imobilizada
$t_{1/2}$ (min)	0,41	2,50
Fator de estabilidade	1,00	6,09

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

5.4 Ensaios de esterificação do ácido oleico na presença do amido

Neste ensaio buscou-se quantificar e avaliar a conversão de ácidos graxos em ésteres nas reações de esterificação, nesse processo foi analisado a influência da razão molar

ácido/etanol em função da quantidade de etanol usado, e também a influência da remoção de água com o uso do amido no meio reacional.

Os testes foram realizados com o uso do amido como agente dessecante para efeito de comparação, visto que já se tem na literatura ensaios semelhante com o ácido oleico sem a aplicação do amido, ou com a aplicação de outros dessecadores.

O uso do amido é importante porque sob determinadas condições, a quantidade de água no meio reacional irá determinar a direção da reação catalisada pela lipase. Quando há pouca ou nenhuma quantidade água, apenas esterificação e transesterificação são favorecidas. Sendo que quando há excesso de água a hidrólise é a reação favorecida, portanto se faz necessário retirar o excesso de água formada como produto da reação (SHARMA, CHISTI; BANERJEE, 2001).

Os resultados dos ensaios de esterificação são mostrados inicialmente na tabela 6, onde podemos ver os valores para cada razão molar do índice de acidez inicial e final, porcentagem de ácidos graxos livres iniciais e finais, seguido da conversão para cada razão molar. A tabela 6, e os gráficos da figura 21 e 23 que foram plotados a partir dos dados obtidos nos ensaios, foram analisados para elucidação de qual razão possui a maior conversão.

Tabela 6: Resultado dos ensaios de esterificação, onde se tem a média \pm desvio padrão de cada razão molar, sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres).

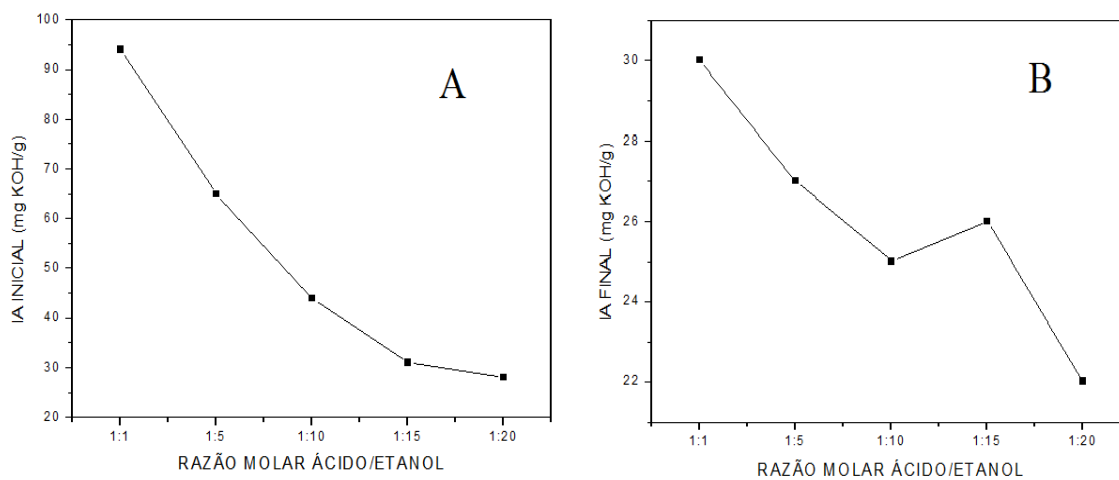
Razão molar	Ia – inicial (mg KOH/g)	Ia – final (mg KOH/g)	% AG (%) – inicial	% AG (%) – final	Conversão (%)
1:1	94,25 \pm 0,16	30,01 \pm 2,73	47,36 \pm 0,08	15,08 \pm 1,37	68,16 \pm 2,97
1:5	64,74 \pm 0,97	26,55 \pm 1,91	32,53 \pm 0,49	13,34 \pm 0,96	58,95 \pm 3,57
1:10	43,80 \pm 0,24	25,32 \pm 0,45	22,01 \pm 0,12	12,72 \pm 0,22	42,16 \pm 1,36
1:15	31,29 \pm 0,40	26,19 \pm 0,16	15,72 \pm 0,20	13,16 \pm 0,08	16,28 \pm 1,62
1:20	27,66 \pm 0,23	22,40 \pm 0,77	13,90 \pm 0,11	11,25 \pm 0,39	19,02 \pm 2,13

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Na tabela 6, e nos gráficos da figura 21, podemos observar os índices de acidez obtidos, e diminuindo a acidez inicial pela final tem-se uma diferença que refere-se à fração de ácidos graxos que foi convertida em ésteres, deixando o meio menos ácido.

A diferença entre o índice de acidez inicial e final reflete diretamente na conversão em ésteres, e essa diferença foi inversamente proporcional à concentração de álcool usado nas diferentes razões molares, sendo que o valor da razão de 1:20 se mostrou um pouco superior da de 1:15, mas bem próximos.

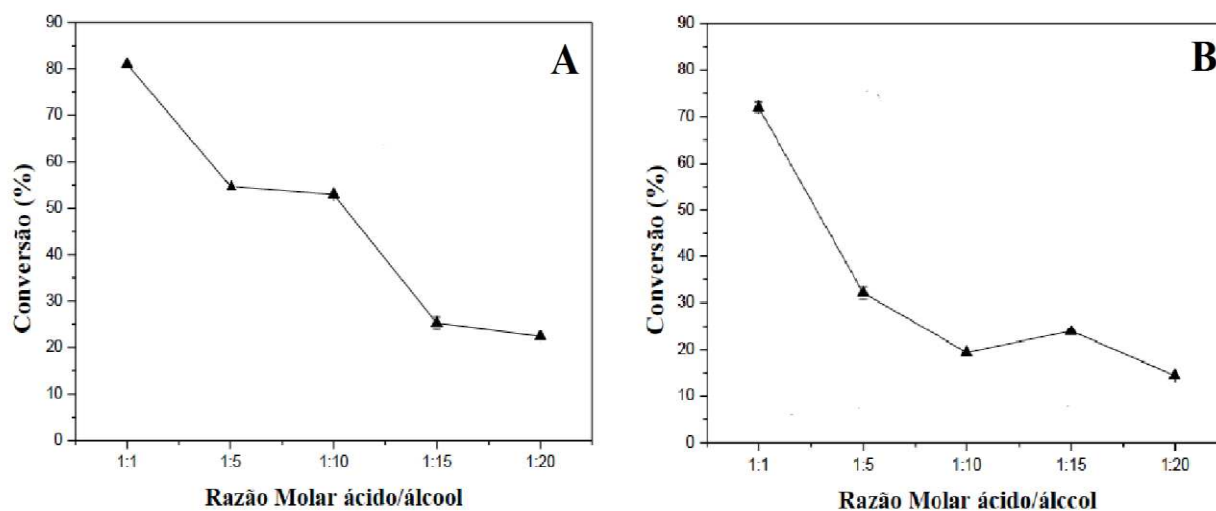
Figura 21: Gráficos referentes ao índice de acidez inicial (A), final (B).



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Nos ensaios de esterificação com o uso do amido esperava-se que as conversões fossem mais altas do que ensaios semelhantes sem o uso do agente dessecante, podemos observar na figura 22 os resultados de ensaios feitos sem a aplicação do amido ao meio reacional (Gráfico A), como também de outro ensaio com o uso de zeólitas (Gráfico B), feitos por Cavalcante (2014).

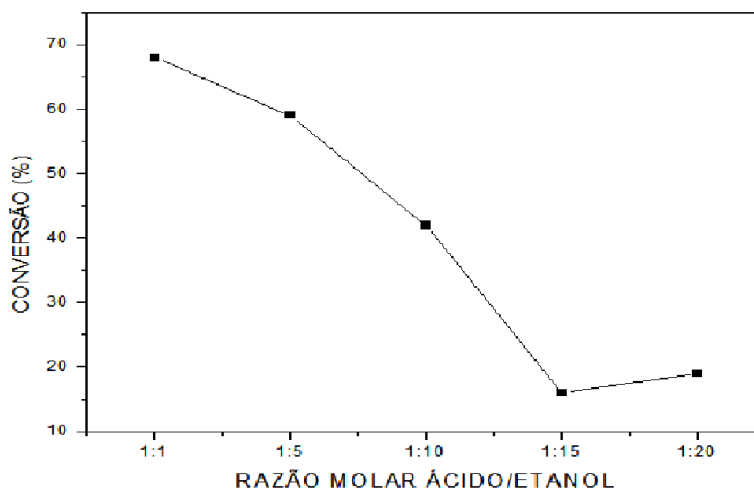
Figura 22: Perfis de conversão em função da variação da razão molar ácido/álcool nas reações de esterificação, sem uso do agente dessecante em (A), com a aplicação de zeólitas em (B).



Fonte: CAVALCANTE, 2014.

O gráfico de conversão plotado a partir do ensaio com o uso do amido é mostrado na figura 23, onde se pode observar o perfil de conversão em função da razão molar ácido/álcool usada, como também avaliar o efeito da retirada de água pelo amido.

Figura 23: Perfis de conversão em função da variação da razão molar ácido/álcool nas reações de esterificação, com a aplicação do amido.



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

A maior conversão para os três ensaios foi obtida com a razão molar de 1:1, nos ensaios sem o agente dessecante a conversão foi de 80,0%, com o uso de zeólitas foi de 73,0% e com a aplicação do sagu de 68,16 %.

Quando se variou a razão molar e aumentou à quantidade de álcool usada, houve um decréscimo na conversão obtida nas demais razões, para todos os ensaios. Esse comportamento do decaimento da conversão de acordo com o aumento do álcool que foi obtido no presente estudo e no estudo de Cavalcante (2014), foi evidenciado também por Carneiro (2013), que usando a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em suportes à base de quitosana para aplicação na esterificação do óleo de coco com etanol, obteve uma conversão de 51,8 %, na razão molar 1:1, e que essa conversão também decaiu com o aumento da quantidade de álcool.

A explicação para ter ocorrido uma diminuição na conversão decorrente da variação das razões molares, está diretamente ligada à quantidade de álcool no meio reacional, porque segundo Paiva (2000), a quantidade de álcool usada pode ter danificado a estrutura da lipase, visto que álcoois de baixo peso molecular tem a capacidade de sugar as moléculas de água

que estão presentes no centro ativo da enzima e são necessárias para manter a integridade estrutural da mesma, e conseqüentemente seu poder catalítico.

Com o intuito de explicar essa diminuição na conversão e o efeito negativo na lipase causado frente ao excesso estequiométrico de álcool, Wang et al. (2007), citam que devido o etanol ter uma elevada polaridade, quando esse entra em contato com a enzima, pode ficar adsorvido no suporte onde a enzima está imobilizada, isso forma uma camada limite aquosa ao redor do biocatalisador, impedindo assim o acesso ao sítio ativo da enzima, com isso o substrato não consegue chegar nesse local.

A razão 1:20 apresentou uma conversão de 19,02% não se comportando de acordo com as outras razões pois a sua conversão foi maior do que a razão 1:15, essa teve uma conversão de 16,28%, as teorias explicadas anteriormente não se aplicam a este caso particular, e para descobrir o porquê disso se faz necessário outras repetições e um melhor estudo do ensaio dessa razão.

Quanto ao uso do amido na tentativa de otimizar o processo, não foi obtido uma maior conversão, pelo contrário com o uso do amido como agente dessecante a conversão decaiu para quase todas as razões estudadas, na razão 1:1 a conversão caiu de 80,0% para 68,16%. Nos estudos de Cavalcante (2014), mostrados nos gráficos A e B da figura 22, também houve uma diminuição na conversão para todas as razões molares quando os ensaios foram feitos com a presença de zeólitas.

Como já visto é importante que a água produzida durante o processo seja de alguma forma retirada para que a mesma não induza a hidrólise dos ésteres, entretanto com a utilização do amido para essa retirada não houve a melhora esperada, visto que a conversão obtida foi mais baixa, e o mesmo foi visto para a utilização de zeólitas.

A quantidade escolhida do agente dessecante para os ensaios pode ter sido alta e desse modo pode ter havido uma maior retirada de água do meio do que era esperado, sabendo que as enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para manter sua conformação tridimensional ativa, e sua estabilidade (DALLA-VECCHIA et al., 2004), a sua ação catalítica foi comprometida pela ação do amido, tendo em vista que este tenha retirado não só a água do meio reacional como também a água necessária ao funcionamento da enzima.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi preparado um organo-gel com a utilização de microemulsões e biopólimeros e obteve-se um novo catalisador, onde foi imobilizado a lipase de *Rizhomucor miehei*, para a aplicação em reações de esterificação.

Foram aplicados como agentes gelificantes, a gelatina, e a quitosana, e com base nas atividades dos derivados pode-se afirmar que houve a imobilização nos dois suportes, sendo que o organo-gel a base de quitosana se mostrou mais resistente a meios hidrofílicos e a ensaios com altas temperaturas, e com atividade bem superior ao organo-gel a base de gelatina. A baixa atividade apresentada pelo derivado à base de gelatina não o desclassifica como um bom suporte, no entanto se faz necessário mais estudos para o seu melhoramento.

Os resultados dos ensaios de estabilidade mostraram que o tempo de meia vida da enzima aumentou quando imobilizada, alcançando um dos principais objetivos da imobilização, pois o derivado a base de quitosana se mostrou bem mais estável do que a enzima livre, podendo assim ser reutilizado. Com isso o derivado se mostra promissor para aplicação em larga escala agregando assim valor ao biopolímero de baixo custo que foi usado na sua síntese.

A aplicação do biocatalisador sintetizado na esterificação se mostrou promissora, pois se obteve bons índices de conversão nos ensaios, portanto esse suporte apresenta ótimas características para síntese em meio orgânico, no entanto viu-se que quanto maior a quantidade de álcool usada, menor a conversão, mostrando que essa elevada quantidade de etanol levou a desnaturação da enzima, como também impediu o acesso dos ácidos graxos ao sítio ativo. Portanto para uma aplicação em maior escala seria mais interessante trabalhar na razão de 1:1, visto que nessa foi obtido a maior conversão de ésteres.

O uso do amido no intuito de aumentar os índices de conversão pela retirada de água do meio, não apresentou resultados superiores aos ensaios sem o agente dessecante, pelo contrário, reduziu a conversão para todas as razões. Sendo necessários mais estudos para um melhor uso desse dessecador no que diz respeito à quantidade usada para cada razão.

Por apresentar uma elevada resistência e alta atividade frente várias reações, a lipase de *Rizhomucor miehei* quando imobilizada nos organo-géis é uma excelente escolha para aplicação em processos de esterificação, visto que quando imobilizada nos suportes estudados obtiveram-se ótimas conversões e uma maior estabilidade, mostrando que o suporte protegeu a enzima de possíveis desnaturações.

7. REFERÊNCIAS

- ADRIANO, W. S. **Preparação e Caracterização de Derivados de Enzimas Industriais em Quitosana**. 2008. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- BERGAMASCO, R. et al. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brazil Journal Chemical Engineering**, v.17, n. 4-7, p. 10, Dez. 2000.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 35–52, 2004.
- BLATTNER, C. et al. Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p.182–193, 2006.
- BOEL, E. et al. *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. **Lipids**, v. 23, p. 701-706, 1988.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.
- BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v.343, p.767-770,1990.
- CAMARGO, E. C. M. **Aplicação da Síntese Enzimática na Química Fina e na Produção de Fármacos**. 2012. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de graduação em engenharia química) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2012.
- CAO, L. Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, 551 p.
- CARNEIRO, E. A. **Preparação de Catalisadores Visando à Obtenção de Biodiesel Por Esterificação Enzimática de Ácidos Graxos de Óleo de Coco**. 2013. 116 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, p. 75-80, 2003.
- CAVALCANTE, K.F. **Estudo da imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em organo-gel para aplicação em síntese orgânica**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2014.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D.; **Tecnologia Enzimática, 1ª ed.**, Rio de Janeiro: EPUB, 2008.

- COMERLATO, M. H. **Imobilização de Enzimas no Suporte Crisotila**. 1995. 100 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo, 1995.
- COSTA, V, E, U.; AMORIM, H, L, N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.
- DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 235–251, 2006.
- HODGSON, R. J. et al. Protein-Doped Monolithic Silica Columns for Capillary Liquid Chromatography Prepared by the Sol– el Method: Applications to Frontal Affinity Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 2780-2790, 2004.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M, T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 16, p. 396 – 403, 1998.
- JESUS, P. C. et al. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. **Química nova**, v. 20, p. 664 – 672, 1997.
- KEMPKA, A. Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase utilizando gelatina de diferentes blooms adicionada de plastificantes hidrofílicos. 2012. 209 f. – Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- KOVALENKO, G.A. et al. Adsorptive immobilization of enzymatic active substances on alumina–silica foam coated by carbon nanofibers. **Carbon 47**, p. 420-427, 2009.
- LERIN, L. A. **Produção enzimática de ascorbil palmitato em diferentes sistemas reacionais**. 2010. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- LUIZI, P. L. et al. Organogels from water-in-oil microemulsions. **Colloid Polym Sci**, v. 268, p. 356-374, 1990.
- MACHADO, A, C, O. **Obtenção de intermediários quirais utilizando lipases em reatores assistidos por membranas**. 2011. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2011.

MARIA, R. M. **Análise do ácido linoléico conjugado em carne bovina por RMN**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbial Technology**, v.40, p.1451-1463, 2007.

MATOS, L. M. C. **Hidrólise parcial do óleo de palma catalisada por lipases sob irradiação de micro-ondas. Síntese de diacilglicerol**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MENDES, A. A.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R. L.C. Triagem de Suportes Orgânicos e Protocolos de Ativação na Imobilização e Estabilização de Lipase de *Thermomyces Lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MILETIĆ, N. et al. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins—Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196–201, 2009.

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.

MOREIRA, A. L. “**Caracterização estrutural e eletro intercalação de íons lítio em compósitos V2O5/gelatina**”. 2004. 95 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química), Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. USP, RIBEIRÃO PRETO - SP, 2004.

MORETO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**, São Paulo: Editora Varela, p. 114-133, 1998. 1ª Ed.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**, 4. ed., São Paulo: Sarvier, 2006.

OLIVEIRA, D. et al. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 178-182, 2004.

OLIVEIRA, U.M.F. **Síntese de Ésteres de Interesse Comercial Utilizando Lipases Imobilizadas em Quitosana**. 2012. 191 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Rede Nordeste de Biotecnologia- RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

OZYILMAZ, G. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 231–236, Maio. 2009.

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

PASSOS, J. P. R. **Espectroscopia de Lente Térmica aplicada ao sistema Ácido oléico/Beta Caroteno**. 2007. 119 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Física), Departamento de Física da Universidade do Pará, UFPA, Belém – PA, 2007.

PAULA, A. V. et al. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

PESSELA, C.C.B. et al. Modulation of the catalytic properties of multimeric β - galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.310-315. 2007.

RIBEIRO, L. M. O.; **Estudo do processo de produção de biodiesel de óleo de coco catalisado enzimicamente**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Alagoas. UFAL, Maceió – AL, Mar, 2010.

RODRIGUES, C. R.; FERNADEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 1-22, 2010 (a).

RODRIGUES, C. R.; FERNADEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 15-32, 2010 (b).

SADANA, A., HENLEY, J.P. Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 501, p.73–79, 1987.

SENGUPTA, A. et al. Enzymatic synthesis of furfuryl alcohol ester with oleic acid by *Candida antarctica* Lipase B and its kinetic study. **Journal of The Institution of Engineers (India)**, v. 93, p. 31-36, 2013.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, Vol. 29, p. 776-785, 2006.

SILVA, L. L.; **Estudo de óleos residuais oriundos de processo de fritura e qualificação desses para obtenção de monoésteres (Biodiesel)**. 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Alagoas. UFAL, Maceió – AL, 2008.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2009.

VOLPATO, G. **Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol.** 2009. 71 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Jan, 2009.

WANG, J. et al. Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from High Acid Value Waste Oil Using Ultrasonic Assistant. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 1121-1128, 2007.

WU, X. Y.; JÄÄSKELÄINEN, S.; LINKO, Y. Purification and Partial Characterization of *Rhizomucor miehei* Lipase for ester synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 145-158. 1996.

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

ZOUMPANIOTI, M.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Microemulsion-based organogels as matrices for lipase immobilization. **Biotechnology Advances**, v. 28 p. 395–406, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Tabelas com as absorbâncias do ensaio de determinação da atividade da enzima livre.

Tabela A1 - Absorbância ao longo do tempo, enzima livre, e a média das atividades calculadas.

Reator/Tempo (min)	A (Abs)	B (Abs)	C (Abs)
2	0,317	0,406	0,380
4	0,566	0,569	0,646
6	0,600	0,713	0,735
8	0,770	1,075	1,014
10	0,938	1,159	1,151

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

$$\left. \begin{array}{l} At_A = 355,08 \text{ U/mL} \\ At_B = 511,63 \text{ U/mL} \\ At_C = 483,42 \text{ U/mL} \end{array} \right\} At_{\text{Média}} = 450,04 \text{ U/mL}$$

Tabela A2 - Absorbância ao longo do tempo, auto degradação do pNPB.

Tempo (min)	Absorbância
2	0,071
4	0,085
6	0,103
8	0,120
10	0,137

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.