

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**COMPORTAMENTO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DE
LIPASES NÃO COMERCIAIS EM PROPANO PRESSURIZADO**

GRACIELE DE OLIVEIRA KUHN

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

AGOSTO 2010

COMPORTAMENTO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DE LIPASES NÃO COMERCIAIS EM PROPANO PRESSURIZADO

Graciele de Oliveira Kuhn

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Débora de Oliveira, D. Sc.
(Orientadora)

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.
(Orientador)

Márcio Mazutti, D. Sc.
URI – Campus de Erechim

Camila da Silva, D. Sc.
UEM – Umuarama

Erechim, Agosto de 2010.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

**“...todos querem viver no topo da montanha,
mas toda felicidade e crescimento ocorre
quando você está escalando-a.”**

William Shakespeare

Agradecimentos

Muitas pessoas passaram pelo meu caminho, algumas eu agradeço de coração, e devo minha amizade, carinho, admiração e respeito.

Agradeço a Deus, por tudo!

Aos meus pais Clóvis e Terezinha, e meu irmão Rodrigo, pois sem dúvida são as pessoas mais importantes da minha vida e sem eles eu não seria nada.

Ao meu amor Thiago, pelo carinho, compreensão e alegria que me traz.

A todos meus familiares que independente de onde eu esteja estão sempre torcendo por mim, em especial a “Tia Gisa”, tia e amiga querida que me incentivou a trilhar este caminho.

Aos meus orientadores queridos Débora e Vladimir por todo o conhecimento que me foi passado, pelo compromisso e dedicação, e por contribuírem tanto ao meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela amizade e carinho.

A todos os professores que colaboraram para a minha formação, por toda a informação transmitida, em especial a Helen que participou de todos os momentos, contribuindo com sua experiência e também amizade. Também ao Márcio pela amizade e auxílio na resolução dos problemas operacionais ocorridos durante a parte experimental.

A minha querida amiga e colaboradora Preta e também ao André pela ajuda e dedicação que desempenharam neste trabalho.

A todos os colegas do mestrado, pela amizade e convivência durante estes dois anos e meio. Aos amigos feitos no Laboratório de Termodinâmica e de Biotecnologia.

A Claudinha, amiga, confidente e companheira de todas as horas.

Enfim, a todas estas pessoas maravilhosas que tornaram meus dias mais felizes e fazem a vida valer à pena! Obrigada, as levarei comigo na lembrança.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 ENZIMAS	6
2.1.1 <i>Lipases</i>	8
2.1.2 <i>Aplicação de lipases</i>	10
2.1.3 <i>Atividade enzimática</i>	12
2.1.4 <i>Imobilização de lipases</i>	13
2.2 FLUIDOS PRESSURIZADOS	15
2.3 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	17
2.3.1 <i>Água</i>	18
2.3.2 <i>Solvente</i>	19
2.3.3 <i>Temperatura</i>	22
2.3.4 <i>Pressão</i>	23
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 MATERIAIS.....	25
3.1.1 <i>Reagentes</i>	25
3.1.2 <i>Enzimas</i>	25
3.2 EQUIPAMENTOS E METODOLOGIA	27
3.2.1 <i>Determinação da atividade enzimática de lipases</i>	27
3.2.2 <i>Tratamento das enzimas em propano pressurizado</i>	29
3.2.3 <i>Caracterização dos catalisadores</i>	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE DE <i>ASPERGILLUS</i> <i>PARASITICUS</i> EM PROPANO PRESSURIZADO.....	33
4.2 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE DE <i>ASPERGILLUS WENTII</i> EM PROPANO PRESSURIZADO	37
4.3 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE DE <i>PENICILLIUM</i> <i>SIMPLICISSIMUM</i> EM PROPANO PRESSURIZADO	39

4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES	46
4.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
5.	CONCLUSÕES	50
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - FONTES BIOLÓGICAS E FORNECEDORES DE LIPASES COMERCIAIS.	9
TABELA 2 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS AVALIADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA CADA LIPASE NÃO COMERCIAL.	32
TABELA 3 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA <i>ASPERGILLUS PARASITICUS</i> IMOBILIZADA SUBMETIDA A PROPANO PRESSURIZADO.	34
TABELA 4 - EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS NA RESPOSTA ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>ASPERGILLUS PARASITICUS</i> IMOBILIZADA NO SISTEMA COM PROPANO PRESSURIZADO, AO NÍVEL DE 95% DE CONFIANÇA.	34
TABELA 5 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA <i>ASPERGILLUS PARASITICUS</i> LIOFILIZADA SUBMETIDA A PROPANO PRESSURIZADO.	35
TABELA 6 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA <i>ASPERGILLUS WENTII</i> LIOFILIZADA SUBMETIDA A PROPANO PRESSURIZADO.	38
TABELA 7 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA <i>PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM</i> IMOBILIZADA SUBMETIDA A PROPANO PRESSURIZADO.	40
TABELA 8 - EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS NA RESPOSTA ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM</i> IMOBILIZADA NO SISTEMA COM PROPANO PRESSURIZADO, AO NÍVEL DE 95% DE CONFIANÇA.	41
TABELA 9 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA <i>PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM</i> LIOFILIZADA SUBMETIDA A PROPANO PRESSURIZADO.	42
TABELA 10 - RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES PELA ANÁLISE DE BET.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES.	11
FIGURA 2 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA MEDIDA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.	28
FIGURA 3 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO APARATO UTILIZADO NO TRATAMENTO DAS ENZIMAS COM O PROPANO PRESSURIZADO. A– RESERVATÓRIO DE SOLVENTE; B– BANHO TERMOSTATIZADO; C– BOMBA DE SERINGA; D– REATOR/CÉLULA DE AÇO; E– INDICADOR DE PRESSÃO; F– TRANSDUTOR DE PRESSÃO; G– VÁLVULA MICROMÉTRICA.	30
FIGURA 4 – DETALHES DA CÉLULA DE AÇO INOXIDÁVEL COM VOLUME INTERNO DE 3 ML E DA CÉLULA DE AÇO MONTADA COM A VÁLVULA MICROMÉTRICA.	31
FIGURA 5 - VISTA DO SISTEMA MERGULHADO NO BANHO TERMOSTATIZADO E DA UNIDADE EXPERIMENTAL UTILIZADA NO TRATAMENTO DAS ENZIMAS.	31
FIGURA 6 - DIAGRAMA DE PARETO PARA A LIPASE <i>ASPERGILLUS PARASITICUS</i> LIOFILIZADA NO SISTEMA PROPANO PRESSURIZADO, EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES ESTUDADAS E DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO OBTIDA.	37
FIGURA 7 - DIAGRAMA DE PARETO PARA A LIPASE <i>ASPERGILLUS WENTII</i> LIOFILIZADA NO SISTEMA PROPANO PRESSURIZADO, EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES ESTUDADAS E DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO OBTIDA.	39
FIGURA 8 - DIAGRAMA DE PARETO PARA A LIPASE <i>PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM</i> LIOFILIZADA NO SISTEMA PROPANO PRESSURIZADO, EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES ESTUDADAS E DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO OBTIDA.	43
FIGURA 9 - COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS DE ATIVIDADE RESIDUAL EM FUNÇÃO DAS LIPASES LIOFILIZADAS APÓS PROCESSAMENTO EM PROPANO PRESSURIZADO.	48
FIGURA 10 - COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DA FORMA DE APRESENTAÇÃO (IMOBILIZADA E LIOFILIZADA) DA LIPASE DE <i>PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM</i>.	49

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

COMPORTAMENTO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DE LIPASES NÃO COMERCIAIS EM PROPANO PRESSURIZADO

Graciele de Oliveira Kuhn

Agosto/2010

Orientadores: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

A literatura indica que o emprego de fluidos pressurizados, sub ou supercríticos, na área da biotecnologia, mais especificamente em tecnologia enzimática, é assunto de intensa exploração científica durante a última década. O objetivo de tal estudo é a utilização de fluidos pressurizados como meio reacional alternativo para reações enzimáticas, explorando propriedades singulares de tais fluidos, como incrementar a atividade e estabilidade de complexos enzimáticos ou inativar complexos enzimáticos que causam danos a alimentos e fármacos. Lipases constituem os mais importantes grupos de biocatalisadores para a síntese de biopolímeros e de biodiesel, para a resolução de misturas racêmicas, transesterificações, acilação regioseletiva de glicóis e mentol, síntese de peptídeos, na produção de fármacos enantiomericamente puros, agroquímicos, e compostos aromáticos. Neste contexto, o presente trabalho visa investigar a influência da pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização na atividade de 3 lipases não comerciais, nas formas imobilizada e liofilizada, em propano pressurizado. Para tal, os experimentos foram realizados utilizando uma célula de aço com volume interno de 3mL, na temperatura de 35°C, variando a pressão (30–70bar), sob diferentes tempos de exposição (1–6h) e adotando distintas taxas de

descompressão (2–20bar/min). Um planejamento experimental com dois níveis e três repetições no ponto central foi utilizado para identificar o efeito das variáveis do processo bem como das possíveis interações entre elas na perda/ganho da atividade lipásica. A atividade foi determinada como a taxa inicial das reações de esterificação entre o ácido oléico e o etanol. Os resultados obtidos mostram que a atividade enzimática depende muito da espécie e forma como a enzima se encontra, do conteúdo de água da enzima/suporte/meio reacional e das variáveis de processo envolvidas, significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema investigado. Em alguns estudos, as enzimas apresentaram grande perda da atividade, enquanto outros proporcionaram um significativo aumento.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

INVESTIGATION OF NON-COMMERCIAL LIPASES ESTERIFICATION ACTIVITY TREATED IN COMPRESSED PROPANE

Graciele de Oliveira Kuhn

August/2010

Advisors: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

The objective of this work was to assess the influence of propane treatment on the esterification activity of three non-commercial lipases in the lyophilized and immobilized forms. In order to evaluate the effect of process variables on the lipase activity a full 2^3 experimental design was carried out. For this purpose, the experiments were performed in a stainless steel cell with internal volume of 3mL, at fixed 35°C, in the pressure range of 30 - 70bar, with varying exposure time, 1 to 6h, adopting different decompression rates, ranging from 2 to 20 bar/min. Lipase activity was determined as the initial rates of esterification reaction between oleic acid and ethanol. From the results obtained in this work, in a general sense, one may infer that the enzyme activity depends significantly on the enzyme, its presentation form, and the experimental condition investigated. It was experimentally observed that for lyophilized and immobilized lipases there was an enhancement in residual lipase activity in several experimental conditions. The present study allows the selection of operational conditions in terms of exposure time, depressurization rate and pressure for advantageous application of these biocatalysts in reactions.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente requisitadas. Além de serem ativas e versáteis, elas catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores químicos. A grande vantagem das enzimas é que elas catalisam as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, o que é comum em sínteses químicas, devido à sua especificidade (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003).

Atualmente, as lipases têm apresentado grande importância no cenário biotecnológico, econômico e industrial. Essas enzimas são utilizadas como ferramenta tecnológica, representando uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de monoglicerídios, ácidos graxos, agentes biotensioativos, compostos de aroma e sabor e lipídeos estruturados ou biomodificados (TREICHEL *et al.*, 2010).

As lipases agem nos alimentos gordurosos hidrolisando os lipídios quase que totalmente, o que resulta no aparecimento de sabores muitas vezes indesejáveis. Participam do processo de rancificação de derivados de leite, de carnes, de peixes e de outros produtos ricos em lipídeos. Contudo, são também responsáveis pelo aparecimento de características desejáveis em determinados produtos como o desenvolvimento de sabores específicos. Outro campo também importante é a aplicação de lipase em detergentes e indústria de papel.

Uma área que ganhou relevância nos últimos anos é o emprego de lipases na produção de biodiesel, através da transesterificação de triglicerídeos com álcoois de cadeia curta. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa produzidos na reação podem ser empregados como combustível, com a vantagem de não propiciar a geração de óxidos de enxofre e de particulados (ISO *et al.*, 2001).

O biodiesel é formado pelos ésteres monoalquil de óleos e gorduras e pode ser utilizado como mistura para os combustíveis derivados de petróleo, o

1 Introdução

diesel. A lipase catalisa a reação de transesterificação de moléculas de ácidos graxos de elevado peso molecular (LEE *et al.*, 2002).

Os catalisadores enzimáticos como as lipases podem catalisar eficazmente o processo de transesterificação dos triglicerídeos nos sistemas aquosos ou não aquosos, isso devido à elevada atividade específica pelo substrato, baixo impacto ao ambiente, grupo funcional e estereoseletividade (MEHER *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006a). Apesar da alta eficiência catalítica das enzimas, fatores ligados ao custo e à estabilidade limitam a utilização destes biocatalisadores. O uso de um catalisador relativamente caro como uma enzima exige, em muitos casos, sua recuperação e reuso, para se ter um processo economicamente viável (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007). A aplicação de enzimas imobilizadas como catalisador de reações envolvendo triglicerídeos apresenta uma série de vantagens, tais como: maior estabilidade, necessidade de baixos teores de água e possibilidade de reutilização das enzimas em processos contínuos ou em batelada (NOVO NORDISK, 1992).

A empresa Novozymes é a líder mundial em biotecnologia de enzimas. Para mostrar que é possível a síntese de produtos por meio da catálise enzimática de uma forma mais eficaz economicamente, muitos pesquisadores estão produzindo e utilizando enzimas “home-made”.

As lipases encontram-se largamente distribuídas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Atualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de micro-organismos devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção, o que torna viável o cultivo desses micro-organismos.

Em geral, a utilização de lipases como biocatalisadores é acompanhada do emprego de solventes orgânicos líquidos para melhorar a estabilidade da mesma e permitir o adequado contato entre os substratos e o(s) centro(s) ativo(s) da enzima, entretanto estes apresentam desvantagens, como a sua toxicidade, difícil separação dos produtos e uso de volumes elevados. Neste sentido, esforços consideráveis têm sido apresentados na literatura no sentido da realização de reações utilizando tecnologias limpas conduzidas em fluidos

1 Introdução

sub e supercríticos (KNEZ *et al.*, 1998; KUMAR *et al.*, 2004; OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2000; DALLA ROSA *et al.*, 2008). O uso de fluidos comprimidos como solventes para reações químicas pode ser uma rota promissora no sentido de eliminar traços de solventes líquidos convencionais dos produtos da reação. Adicionalmente, processos industriais em condições próximas ao ponto crítico podem ser vantajosos em termos de consumo de energia, facilidade de consumo de energia, facilidade de recuperação do produto e minimização da formação de produtos secundários (KNEZ *et al.*, 1998).

Diversos trabalhos descrevem a produção de ésteres por via enzimática utilizando lipases como catalisadores, e em todos os casos conversões satisfatórias foram observadas quando da utilização de uma razão mássica de solvente:substrato em torno de 40:1 (DALLA ROSA, *et al.*, 2010). Oliveira (1999) e Faccio (2004) utilizaram níveis de solvente n-hexano/substrato nesta proporção na transesterificação de óleo de dendê, mamona e soja, utilizando as lipases comerciais Novozym 435 e Lipozyme IM.

Estudos mostraram que muitas reações podem ser conduzidas em dióxido de carbono líquido ou supercrítico e em fluidos pressurizados, como propano e n-butano (KNEZ e HABULIN, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2000 e 2001; DALLA ROSA *et al.*, 2008) devido suas propriedades de transporte favoráveis à transferência de massa.

Apesar deste comprovante, o uso de dióxido de carbono em reações enzimáticas que utilizam óleos vegetais como substrato, apresenta algumas limitações quanto à solubilidade de tais compostos e no que diz respeito à atividade/estabilidade de algumas lipases neste solvente comprimido (OLIVEIRA *et al.*, 2006a; NDIAYE *et al.*, 2006a). Referente a este aspecto, as propriedades do propano apontam vantagens sobre o dióxido de carbono, o que implica em um sistema mais apropriado para a realização das reações enzimáticas a partir de óleos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2006a e LANZA *et al.*, 2005).

A estabilidade e a atividade enzimática podem depender: da espécie de enzima, das características do solvente, do conteúdo de água da enzima/suporte/meio reacional e das variáveis de processo envolvidas,

1 Introdução

significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema sob investigação (FRANKEN, *et al.*, 2010).

A partir disto, conforme cita KASCHE *et al.* (1988), na realização de reações enzimáticas a altas pressões, é de fundamental importância a avaliação do comportamento das enzimas nestes fluidos, uma vez que a perda de atividade pode levar a baixas taxas de reação e formação de produtos secundários.

Fazendo-se uma análise geral na literatura, observa-se que, enquanto existe uma considerável quantidade de dados acerca da atividade e estabilidade de enzimas em dióxido de carbono, há proporcionalmente, pouca informação relacionada a outros solventes comprimidos, tais como o propano, principalmente quando se tratam de enzimas não comerciais, muito importantes devido ao seu baixo custo de obtenção.

Levando-se em consideração o exposto até o momento, da grande importância da investigação do comportamento de enzimas em fluidos pressurizados, da síntese de diversos produtos a partir das reações catalisadas por lipases, e da observação do estado da arte que revela ausência de um estudo mais detalhado no que se refere ao objeto de interesse deste trabalho, foi possível estabelecer a proposta do mesmo, a qual visa estudar o comportamento da atividade de esterificação de algumas lipases não comerciais, tratadas em propano pressurizado.

Em consonância com o objetivo geral deste trabalho o principal objetivo específico foi definido como avaliar a influência das variáveis: pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização na atividade de esterificação de três lipases não comerciais, produzidas a partir dos micro-organismos *Penicillium simplicissimum*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus wentii*, todas estudadas nas formas liofilizada e imobilizada submetidas ao tratamento com propano pressurizado.

Como forma de embasamento ao trabalho proposto, primeiramente será apresentada uma revisão bibliográfica, procurando evidenciar os resultados disponíveis na literatura referentes ao tema do presente estudo. O Capítulo 3 apresentará os métodos analíticos e experimentais utilizados no decorrer deste

1 Introdução

trabalho. No Capítulo 4 serão apresentados e discutidos os resultados para os sistemas estudados. Por fim, o Capítulo 5 trará as conclusões, e o Capítulo 6 sugestões para trabalhos futuros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta uma breve explanação sobre o estado da arte concernente aos aspectos a serem abordados neste trabalho, procurando evidenciar a relevância do tema sob investigação para a literatura científica. Na seqüência será apresentada uma visão geral sobre as enzimas, lipases, evidenciando suas vantagens e características. Após, especificamente de interesse para o desenvolvimento deste trabalho, aborda-se o uso de fluidos pressurizados sobre a atividade das enzimas, enfatizando as variáveis que influenciam a mesma.

2.1 ENZIMAS

As enzimas, importantes componentes do metabolismo de todos os seres vivos, têm a capacidade de promover e acelerar reações químicas. Micro-organismos ou substâncias com essa propriedade já eram usados por populações humanas muito antigas para modificar alimentos – fermentar uvas e fabricar o vinho, ou alterar o leite e produzir queijo, por exemplo. Depois que pesquisadores desvendaram a atuação das enzimas, estas passaram a ser cada vez mais empregadas, com variadas finalidades, tanto na área de alimentos, quanto em muitos outros setores.

Estes biocatalisadores ou catalisadores biológicos são proteínas cuja principal função, portanto, é catalisar reações nos organismos. Os biocatalisadores são utilizados em química orgânica como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas se destacam: utilização de condições brandas, compatibilidade com substratos sintéticos, em alguns casos podem catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (PAQUES e MACEDO, 2006).

O estudo das ações de enzimas em reações do metabolismo levou à identificação e purificação de milhares delas, à elucidação de sua estrutura

2 Revisão Bibliográfica

molecular e do seu mecanismo químico de ação leva a uma compreensão geral de como elas funcionam (LEHNINGER, 1970 apud BRÍGIDA, 2006).

As enzimas como proteínas biologicamente ativas são responsáveis pela catálise de diversas reações. Em uma proteína enzimática, existe certo domínio chamado de “sítio ativo” que se liga ao substrato – a molécula reagente – e diminui a energia do estado de transição que leva ao produto desejado. A ligação entre o sítio ativo e o substrato é extremamente específica: a molécula precisa ter certas características eletrônicas e espaciais que permitam o seu “encaixe” com a proteína, esta relação tem sido chamada de “chave-fechadura”. Como catalisadores biológicos, as enzimas estão sujeitas às mesmas leis termodinâmicas e cinéticas dos catalisadores químicos, isto é, alteram a velocidade da reação, porém não a reação final de equilíbrio entre o substrato e o produto (WISEMAN, 1991; PRIMO *et al.*, 2007).

Todas as enzimas conhecidas são proteínas e estas, sejam das mais antigas linhagens de bactérias ou das formas de vida mais evoluídas, são construídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos, unidos covalentemente em seqüências características. Esta seqüência apresenta quatro níveis de estruturas. A estrutura primária, que determina a forma e a função da proteína, é somente uma seqüência dos aminoácidos, sem levar em conta a orientação espacial da molécula, dando uma completa descrição das ligações covalentes da proteína. A estrutura secundária é função dos ângulos formados pelas ligações peptídicas que ligam os aminoácidos. A conformação espacial é mantida graças às interações intermoleculares (pontes de hidrogênio) entre os hidrogênios dos grupos amino e os átomos de oxigênio dos outros aminoácidos. Em geral, estas ligações forçam a proteína a assumir uma forma helicoidal, como uma corda enrolada em torno de um tubo imaginário. Esta forma, a mais comum, é chamada de α -hélice. A estrutura terciária relaciona-se com as dobraduras da cadeia protéica sobre ela mesma. A forma das proteínas está relacionada com sua estrutura terciária. O que determina a estrutura terciária são as cadeias laterais dos aminoácidos; algumas cadeias são tão longas e hidrofóbicas que perturbam a estrutura secundária helicoidal, provocando a dobra da proteína. Muitas vezes, as partes hidrofóbicas da proteína agrupam-se no interior da proteína dobrada, longe da água e dos íons

2 Revisão Bibliográfica

do ambiente onde a proteína se encontra, deixando as partes hidrofílicas expostas na superfície da estrutura da proteína. Regiões como "sítios ativos", "sítios regulatórios" e módulos são propriedades da estrutura terciária. Existe, finalmente, a estrutura quaternária, que se refere à conformação espacial das subunidades. Esta estrutura é mantida pelas mesmas forças que determinam as estruturas secundárias e terciárias (LEHNINGER *et al.*, 1995).

A conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, entre outros, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (LIMA *et al.*, 2001).

2.1.1 Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases (DALLA-VECCHIA, 2004).

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos, tais como os fungos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, por leveduras de *Tulopsis* e *Candida* e bactérias como *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Staphylococcus*. Do ponto de vista econômico e industrial, os micro-organismos são preferíveis às lipases de fontes de animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento (DALLA-VECCHIA, 2004).

As lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas, devido à versatilidade de suas propriedades e à fácil produção em massa. As lipases microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as torna atrativas para a aplicação industrial (HASAN *et al.*, 2006). Os fungos filamentosos são

2 Revisão Bibliográfica

considerados bons produtores de enzimas (MAIA *et al.*, 2001), e as lipases fúngicas são as preferidas para aplicação industrial (MAHADIK *et al.*, 2002).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al.*, 2004).

A Tabela 1 apresenta uma compilação acerca de algumas fontes de lipases industriais e seus respectivos fornecedores comerciais (FABER, 2000; NEGISHI *et al.*, 2003; HUANG e TSAI, 2004; SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003; HAN *et al.*, 2003; MARIA *et al.*, 2002; KONTKANEN *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Fontes biológicas e fornecedores de lipases comerciais.

Fonte biológica	Fornecedor
<i>Aspergillus niger</i>	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Fluka, Novozymes, Röhm
<i>Aspergillus sp.</i>	Novozymes
<i>Candida antarctica A</i>	Boehringer, Fluka, Novozymes
<i>Candida antarctica B</i>	Fluka, Novozymes, Boehringer
<i>Candida cylindracea</i>	Meito
<i>Candida rugosa</i>	Aldrich, Altus, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Meito Sangyo, Sigma, Roche
<i>Mucor miehei</i>	Amano, Boehringer, Biocatalysts, Fluka, Novozymes
<i>Penicillium roqueforti</i>	Amano, Biocatalysts, Fluka
<i>Pseudomonas sp.</i>	Amano, Boehringer, Fluka, Mitsubishi, Röhm, Sigma
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Sigma
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano, Sigma
Gérmen de trigo	Fluka, Sigma
Pâncreas suíno	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Röhm, Sigma

2.1.2 Aplicação de lipases

O potencial de aplicação de lipases em processos tem sido objeto de grande interesse nos meios acadêmico e industrial nos últimos anos. Surgiu, então, a possibilidade de realização de vários tipos de reações enzimáticas de interesse científico e industrial, tais como síntese de ésteres, hidrólise e interesterificação.

A reação de hidrólise envolve ataque na ligação éster do triglicerídeo na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos. A alta especificidade das lipases pelo triglicerídeo com relação ao tipo e a posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo propicia um grande número de aplicações dentro da área de alimentos. Aromatizantes para uso em alimentos destinados ao consumo humano e animal têm sido obtidos através da hidrólise parcial de triglicerídeos (MALCATA *et al.*, 1990). Processos comerciais incluem a modificação enzimática da gordura do leite bem como o desenvolvimento de preparações enzimáticas para utilização na produção de queijos.

A reação de esterificação entre polióis e ácidos graxos livres é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise do glicerídeo correspondente. As velocidades relativas da reação direta (hidrólise) e inversa (esterificação) são usualmente controladas pela atividade de água da mistura reacional. Exemplos de produtos químicos de alto valor obtidos pelo uso de lipases para esterificação incluem a síntese de ésteres de ácido oléico 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, 1999). O termo interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou um éster e outro éster (transesterificação). Nessas reações o triglicerídeo reage com um ácido graxo, um álcool ou outro éster, resultando em um rearranjo dos grupos de ácidos graxos do triglicerídeo de forma a produzir um novo triglicerídeo. O rearranjo é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação. A concentração ótima de água no meio reacional deve ser suficientemente baixa de forma a minimizar a formação de produtos de

2 Revisão Bibliográfica

hidrólise indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça totalmente ativa (MALCATA *et al.*, 1990).

A Figura 1 ilustra as reações catalisadas por lipases (PAQUES e MACEDO, 2006).

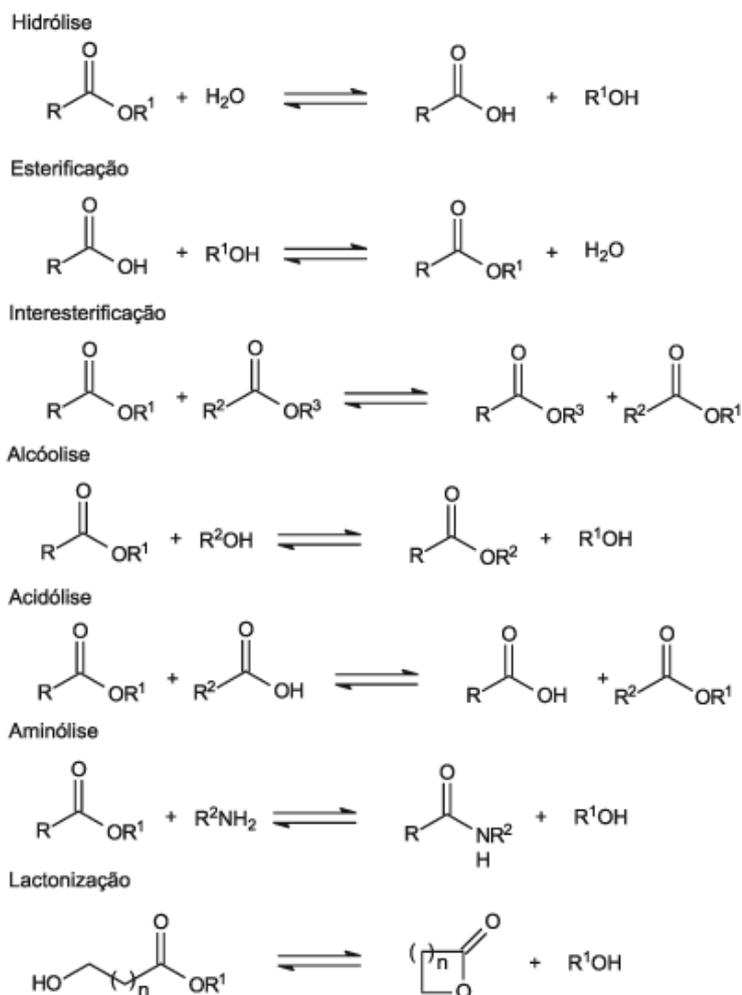


Figura 1 - Reações catalisadas por lipases.

O potencial de aplicações industriais que as lipases possuem abrange a indústria de alimentos, como aditivos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (BURKERT, 2002; BURKERT *et al.*, 2004).

2 Revisão Bibliográfica

Os estudos sobre a aplicação de lipases para obtenção de biodiesel têm aumentado significativamente nos últimos anos. O crescente interesse em obter combustíveis alternativos é consequência da escassez de petróleo e do menor impacto ambiental provocado pelos biocombustíveis. Esses estudos iniciaram-se nos anos 30, quando óleos vegetais foram testados em máquinas nas quais se usava diesel como combustível (LEE *et al.*, 2002).

O biodiesel é formado pelos ésteres monoalcois de óleos e gorduras e pode ser utilizado como mistura com os combustíveis derivados de petróleo, o diesel. Recentemente as pesquisas têm sido voltadas para utilização das lipases na transesterificação de moléculas de ácidos graxos de elevado peso molecular. A lipase catalisa a reação do álcool com óleos vegetais e gordura animal. Sabendo-se que várias matérias-primas agro-pecuárias são ricas em gorduras e óleos, o emprego delas como fontes de biocombustíveis ganha uma notável importância tecnológica, social e econômica (LEE *et al.*, 2002).

Os catalisadores enzimáticos como as lipases, podem catalisar eficazmente o processo de transesterificação dos triglicerídeos nos sistemas aquosos ou não aquosos, superando os problemas relacionados ao conteúdo de água presente. Em particular, os subprodutos, glicerol, podem facilmente ser removidos sem nenhum processo complexo, e também os ácidos graxos livres contidos nos óleos e nas gorduras podem completamente ser convertidos a ésteres (MEHER *et al.*, 2006).

As lipases são geralmente biocatalisadores eficazes devido à elevada atividade específica pelo substrato, baixo impacto ao ambiente, grupo funcional e estereoseletividade. As reações químicas podem ser conduzidas diretamente usando lipases em meio orgânico (OLIVEIRA *et al.*, 2006a).

2.1.3 Atividade enzimática

Segundo SCRIBAN (1985), a atividade das enzimas é função direta da sua estrutura terciária ou quaternária. Nessas condições, todo tratamento que modifique a conformação da enzima (aquecimento, modificação do pH, pressão), dificultando ou impedindo a fixação do substrato na enzima ou ainda modificando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da

2 Revisão Bibliográfica

enzima e, portanto, o seu funcionamento. Existe uma zona de temperatura, às vezes estreita, para a qual atividade enzimática é máxima. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é determinada em condições de operação bem definidas. De fato, a variação da atividade enzimática resulta de dois efeitos antagônicos: de um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura que aumenta a freqüência das colisões entre o substrato e a enzima; de outro, a desnaturação da proteína enzimática. Esta desnaturação vai modificar as estruturas terciária e quaternária da proteína globular e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. De fato, na desnaturação das enzimas pelo calor, o que conta, sobretudo, é o binômio tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico.

A expressão da atividade de uma enzima é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB (Internacional Union of Biochemistry) considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um μmol de substrato por minuto em condições de ensaio definidas (LIMA *et al.*, 2001).

2.1.4 Imobilização de lipases

Com o intuito de aumentar a atividade catalítica das lipases, vários processos de imobilização ou modificação na estrutura nativa vêm sendo estudados.

As enzimas estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. A técnica de imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação ao final do processo (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

De acordo com Dalla-Vecchia (2004), o principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como

2 Revisão Bibliográfica

modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização.

O processo de imobilização pode também adicionar um obstáculo na transferência de massa, uma vez que o contato dos substratos com os sítios ativos das enzimas fica mais limitado do que quando a enzima se encontra na sua forma livre, daí o interesse no emprego de fluidos pressurizados, visando o aumento das taxas de transferência de massa, devido sua maior difusividade.

Apesar da alta eficiência catalítica das enzimas, fatores ligados ao custo e à estabilidade limitam a utilização destes biocatalisadores. O uso de um catalisador relativamente caro como uma enzima exige, em muitos casos, sua recuperação e reuso para se ter um processo economicamente viável (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

O custo elevado com a enzima é o obstáculo principal à comercialização dos processos catalisados por lipases. Avanços recentes na tecnologia enzimática, tais como o uso de lipases solvente-tolerantes e a reutilização da lipase imobilizada são feitos para desenvolver sistemas de custo eficaz (OLIVEIRA *et al.*, 2006b), como também a produção de lipases não comerciais como substitutas para as enzimas comerciais oriundas de grandes produtoras, cujo preço é bastante elevado.

Enquanto o número de companhias que comercializam enzimas está próximo do milhar, o número de produtores é muito inferior. Ao todo, nos Estados Unidos e parte oeste da Europa, existem apenas cerca de 30 indústrias produtoras de enzimas. Muitos produtores são do ramo da indústria químico-farmacêutica, para os quais o lucro proveniente da comercialização das enzimas desempenha um papel pouco significativo no seu faturamento global (CASTRO *et al.*, 2004).

Cerca de 90% da produção anual provém das maiores empresas produtoras de enzimas, como Novozymes com sede na Dinamarca; Gist Brocades, na Holanda; Amano, no Japão; Solvay, Pfizer e Genencor, nos Estados Unidos (CASTRO *et al.*, 2004).

Em vista disso, e estando a lipase presente em animais e vegetais e principalmente podendo ser produzida por fungos, leveduras e bactérias, torna-

se atrativamente viável a produção e o uso industrial da lipase a partir do cultivo desses micro-organismos em substratos apropriados.

2.2 FLUIDOS PRESSURIZADOS

O uso de fluidos, que se comportem como gases em condições ambientes, nas reações de transesterificação enzimática pode se constituir em alternativa para os inconvenientes relacionados as etapas de separação do solvente.

Os fluidos pressurizados possuem diversas vantagens sobre os solventes líquidos, como a alta difusividade, que pode acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas (DALLA ROSA, 2006).

Dentre outras vantagens do uso de fluido pressurizado como meio reacional destaca-se: aumento da seletividade de reação, conversões elevadas; solubilização de reagentes; facilidade de separação de produtos e reagentes, catalisador e subprodutos na mistura (SUBRAMANIAN e McHUGH, 1988).

Knez *et al.* (1998) observaram na síntese de oleil oleato, utilizando Lipozyme IM e diferentes gases comprimidos como solvente, em várias faixas de temperatura e pressão, que não houve perda de atividade da lipase em pressões de até 300bar por tempos de até 350min de reação. Neste mesmo estudo, os autores reportam que quanto menor o diâmetro das partículas da enzima (menor valor investigado foi de 250 μ m) maior é o incremento da taxa inicial de reação para este sistema.

Oliveira *et al.* (2006a) investigou a influência da temperatura (35 - 75°C), pressão (10 - 250bar), tempo de exposição (1 - 6 horas) e a taxa despressurização (2 - 50bar/min para propano e n-butano e 10 - 200Kg/m³.min para dióxido de carbono) na atividade de esterificação das enzimas Novozym 435 e Lipozyme IM. Os resultados mostraram que ambas as enzimas apresentaram uma perda significativa de atividade na presença de dióxido de carbono. Para os demais gases, a Lipozyme IM teve apenas uma pequena perda da atividade, enquanto que a Novozym 435 teve um ganho de atividade quando submetida ao propano e n-butano.

2 Revisão Bibliográfica

A atividade hidrolítica de três lipases (Amano PS, Amano AY30 e lipase de *Yarrowia lipolytica*) nas formas livre, ressuspensa e imobilizada foi avaliada por Franken *et al.* (2010). De uma forma geral, para as lipases livres e imobilizadas, foi observado um aumento na atividade residual na presença de propano pressurizado. No caso das lipases ressuspensas, foi demonstrado que a cinética enzimática é sensível ao tratamento neste fluido, conduzindo em alguns casos a ganhos inexpressivos e em outros a perdas significativas da atividade enzimática.

Lanza (2004) investigou o comportamento de fases a alta pressão do óleo de soja em solventes pressurizados, como propano e n-butano. Os resultados obtidos mostraram que o tipo de equilíbrio observado depende do sistema e que para o sistema óleo de soja - propano foi identificada uma ampla região em composição contendo uma única fase, com pressões de transição inferiores a 40bar em toda a faixa composicional (0 a 100%), indicando um meio propício para as reações de transesterificação enzimática.

Quando da utilização dos solventes pressurizados, muitos autores concluíram que o dióxido de carbono é o solvente que acarreta maior perda de atividade enzimática, diferentemente do propano e n-butano que se mostram solventes potenciais para utilização em reações enzimáticas a altas pressões (DALLA ROSA *et al.*, 2008).

Dalla Rosa *et al.* (2008) realizou o estudo para a produção de ésteres etílicos a partir de óleo de soja em propano pressurizado, utilizando a lipase Novozym 435, como catalisador. As variáveis do processo, temperatura (35°C - 65°C), pressão (50 - 150bar), concentração de enzima (1% - 20% m/m), razão molar óleo:etanol (1:3 - 1:15) e razão mássica solvente/substratos (1:1 - 4:1) permitiram a determinação das melhores condições experimentais para a produção de biodiesel. Os resultados demonstram que 50bar e 65°C levam a melhor condição de pressão e temperatura, respectivamente, como também o emprego de baixa razão solvente/substratos (2:1), conversões da ordem de 100% foram atingidas neste sistema reacional. Dentro da faixa experimental deste trabalho (50 - 150bar) o propano encontra-se como líquido pressurizado, de forma que a pressão apresenta pouca influência sobre as propriedades do solvente e sobre a conversão da reação.

2 Revisão Bibliográfica

As lipases têm grande importância para uma variedade de aplicações industriais, por isso são exploradas e documentadas mais do que qualquer outra enzima em ambientes de alta pressão (EISENMENGER *et al.*, 2009). No entanto, a parcela maior dos trabalhos refere-se às enzimas comerciais tratadas em CO₂ supercrítico, daí o grande interesse em ampliar o conhecimento acerca do comportamento de enzimas, investigando o uso de outros solventes pressurizados, como o propano, além do emprego de enzimas “home-made”, eliminando a desvantagem do alto custo relacionado ao emprego de lipases comerciais.

Existe uma infinidade de aplicações possíveis para gases pressurizados e, possivelmente, um maior conhecimento das características e do comportamento de enzimas nestes solventes, significaria aprimoramento destas aplicações.

É importante salientar que, de modo geral, o solvente pode afetar fortemente a atividade da enzima através de sua interação com o suporte, no caso de enzimas imobilizadas, ou mesmo com radicais da própria enzima. Neste contexto, como etapa anterior à utilização de enzimas como catalisadores de reações em fluidos pressurizados, de fundamental importância é a avaliação de seu comportamento nestes solventes alternativos aos orgânicos convencionais (FEIHRMANN, 2005; PRIMO *et al.*, 2007).

2.3 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Proteínas são estruturas delicadas, mantidas por interações entre a cadeia protéica (determinada pela seqüência de aminoácidos) e pelas interações com o solvente ao redor. Mudanças nos fatores externos, como pressão e temperatura, podem perturbar o complexo balanço das interações intramoleculares e entre solvente-proteína, e podem, conseqüentemente, levar ao desdobramento e/ou desnaturação da cadeia de peptídeos (HENDRICKX *et al.*, 1998).

Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionado para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliadas e otimizadas

(DALLA-VECHIA *et al.*, 2004). Assim, para a realização de reações enzimáticas a altas pressões, é fundamental, primeiramente, conhecer as variáveis que podem afetar a catálise enzimática em fluidos pressurizados, cada variável será abordada individualmente, mas é importante salientar que o efeito destas sobre a atividade e estabilidade enzimática, freqüentemente ocorre de forma combinada.

2.3.1 Água

A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. Está bem documentado na literatura que uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a de síntese (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

De acordo com Zaks e Klibanov (1986), uma das principais propriedades das enzimas suspensas em sistemas não aquosos é o aumento da estabilidade térmica da enzima relativamente ao meio aquoso. A água possui um papel importante na inativação enzimática a alta temperatura. Acredita-se que a altas temperaturas, a água aumente a mobilidade das moléculas de proteína e isto aumente a taxa de desnaturação.

Solventes mais hidrofílicos apresentam uma tendência maior em retirar a água essencial da molécula de enzima. Este princípio também pode ser aplicado a sistemas envolvendo fluidos supercríticos. Geralmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento do conteúdo de água adicionado ao fluido supercrítico, até um determinado limite. Quando o conteúdo de água excede o nível ótimo em reações de transesterificação, as reações de hidrólise tornam-se predominantes e a taxa da reação desejada decresce. Pode-se, com base nas informações da literatura, concluir que o tipo de reação e o meio reacional são também importantes na determinação da dependência da atividade enzimática com o conteúdo de água (OLIVEIRA, 1999).

2.3.2 Solvente

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos, tais como a mudança na rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como a variação da energia livre total, que estão associadas com diferentes energias de solvatação do solvente. Na literatura, não existe um consenso claro com relação à escolha do parâmetro para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas. Porém, o parâmetro mais frequentemente utilizado é o $\log P_{\text{oct}}$, definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

Os solventes que possuem $\log P_{\text{oct}} \leq 2$ são denominados hidrofílicos e não são considerados adequados para a biocatálise, porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes que possuem $\log P_{\text{oct}}$ superior a 4 são denominados hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, mantendo o biocatalisador no seu estado ativo. Parâmetros como constante dielétrica (ϵ), polarizabilidade, bem como o parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ) e o de solubilidade tridimensional – uma derivação do parâmetro de Hildebrand – têm sido propostos para avaliar a influência do solvente nas reações catalisadas por enzimas imobilizadas ou não (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

Oliveira e Oliveira (2001), Oliveira e Alves (1999) e Oliveira e Alves (2000) realizaram estudo da álcoolise enzimática do óleo de dendê e etanol em solvente orgânico (n-hexano). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers numa mistura de enzima (concentração pré-estabelecida), óleo-etanol e 40mL de n-hexano, sendo mantido sob agitação de 200rpm por 6 horas. Na reação catalisada pela enzima Lipozyme IM obteve-se 77,5% de conversão em etil ésteres. Já para a enzima Novozym 435 obteve-se conversão de 58,3%.

Faccio (2004) realizou um estudo da reação de transesterificação dos óleos de mamona e soja utilizando enzimas comerciais (Lipozyme IM e

2 Revisão Bibliográfica

Novozym 435) em erlenmeyers mantendo fixa a quantidade de óleo (1g) e solvente (n-hexano - 40mL) e variando a temperatura, concentração de água e enzima e variando a razão molar óleo:etanol. Os experimentos foram realizados sob agitação rotativa (shaker) a 200rpm por 8 horas. A reação que melhor apresentou conversão foi na temperatura de 65°C, concentração de enzima 20% (m/m), concentração de água 0% (m/m), na razão molar óleo:etanol 1:3 para a enzima Lipozyme IM, obtendo uma conversão de 98% em 6 horas.

Diversos trabalhos descrevem a produção de ésteres por via enzimática utilizando lipases como catalisadores, e em todos os casos conversões satisfatórias foram observadas quando da utilização de uma razão mássica de solvente:substratos em torno de 40:1. Esta elevada relação é, sem dúvida, uma das principais desvantagens do uso de enzimas como catalisadores na transesterificação de óleos vegetais em solventes orgânicos. Relações inferiores a apresentada ou mesmo a ausência de solvente têm se mostrado inadequadas à reação de transesterificação enzimática, possivelmente, dado a significativa resistência à transferência de massa (DALLA ROSA, *et al.*, 2010).

A substituição de um solvente orgânico, tal como o n-hexano, por um fluido pressurizado em reações enzimáticas, resultará em maiores taxas de transferência de massa devido às propriedades de transporte favorável. Um benefício adicional do emprego de fluido supercrítico na catálise enzimática é a presença de um meio adequado à recuperação dos produtos e reagentes (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2000 e 2001).

Numerosos estudos mostraram que muitas reações podem ser conduzidas em dióxido de carbono líquido ou supercrítico e em fluidos pressurizados, como propano e n-butano (KNEZ e HABULIN, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2000 e 2001; DALLA ROSA *et al.*, 2008) devido suas propriedades de transporte favoráveis a transferência de massa.

Entretanto, há um inconveniente com relação à polaridade do CO₂, pois suas características hidrofílicas podem afetar negativamente a atividade da enzima (OLIVEIRA *et al.*, 2006a).

Para Knez e Habulin (2001), que utilizaram as lipases *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* e *porcine pancreas* em CO₂

2 Revisão Bibliográfica

supercrítico e propano a 300bar e 40°C por 24 horas, a atividade das enzimas em propano foi maior do que em CO₂ supercrítico, possivelmente devido às diferentes partições de água no solvente.

Oliveira *et al.* (2006b), avaliaram a atividade de esterificação de lipases imobilizadas (Lipozyme IM, Novozym 435 e lipase de *Yarrowia lipolytica*) em fluidos pressurizados: dióxido de carbono (70 - 275bar), propano (30 - 250bar) e n-butano (10 - 250bar). No processamento em CO₂ as três lipases perderam atividade em todas as condições experimentais avaliadas. Para o processamento com propano, as lipases Lipozyme IM e *Yarrowia lipolytica* apresentaram perda na atividade, enquanto que a Novozym 435 apresentou um aumento na atividade em todas as condições experimentais estudadas. O processamento em n-butano apresentou os mesmos resultados apontados no processamento com propano.

Segundo Lozano *et al.* (2001) apud Eisenmenger *et al.* (2009) a estabilidade e a seletividade de lipases em líquidos iônicos aumentaram 2,7 vezes e 2%, respectivamente, quando comparadas com o hexano.

A atividade enzimática depende do tipo de fluido utilizado, provavelmente como resultado de diferentes interações proteína-solvente. As interações proteína-meio pressurizado que podem afetar a atividade enzimática incluem a partição do substrato, produto e água entre a enzima e o solvente, e interações diretas entre o fluido e a enzima, as quais podem inibir ou inativar a enzima por quebra das ligações de hidrogênio e iônicas. Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (KNEZ e HABULIN, 2001).

O CO₂ não é o único gás para o qual as propriedades parecem ser adequadas para emprego como solvente em biocatálise. Propano pressurizado também pode ser apropriado como um meio de reação para bioconversões catalisadas por enzimas, uma vez que o propano próximo ao seu ponto crítico tem uma constante dielétrica comparável a do CO₂ (HABULIN e KNEZ, 2002),

2 Revisão Bibliográfica

e as pressões de transição de fase com o propano, geralmente encontradas em sistemas formados por compostos de alto peso molecular (triglicerídeos, por exemplo), são muito mais baixas do que aquelas encontradas em sistemas com CO₂ (LANZA *et al.*, 2005; NDIAYE *et al.*, 2006a; NDIAYE *et al.*, 2006b).

Assim, devido ao fato de as enzimas responderem diferentemente à modificações na superfície, os efeitos obtidos no uso de propano comprimido como solvente em um sistema enzimático não podem ser aplicados a outros sistemas enzimáticos.

2.3.3 Temperatura

A maioria das enzimas possui atividade específica, capaz de catalisar apenas uma determinada reação e de fazê-la só em um tipo de meio ou substrato. Algumas enzimas são mais versáteis. Entretanto, todas as enzimas operam dentro de um limite estreito de temperatura e pH (COX, 1987). Grande parte das enzimas apresenta sua atividade ótima em uma faixa de 30 a 40°C, sendo que acima de 45°C pode ocorrer o início da desnaturação (FENNEMA, 1993).

Com o aumento da temperatura pode ocorrer a desnaturação da proteína enzimática, que consiste na perda irreversível da conformação nativa, modificando a estrutura terciária e quaternária da proteína globular. Desta forma, a enzima passa de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. As enzimas possuem uma temperatura de resistência máxima à desnaturação. Entretanto, na desnaturação das enzimas pelo calor a relação tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico são de fundamental importância. Os efeitos que se observam nas enzimas apresentam papel relevante, uma pequena modificação da conformação do centro ativo pode conduzir à perda da atividade catalítica (SCRIBAN, 1985; BELITZ e CROSCHE, 1997).

Uma das principais propriedades das enzimas suspensas em sistemas não aquosos é o aumento da estabilidade térmica da enzima relativamente ao meio aquoso. Em altas temperaturas, a água aumenta a mobilidade das moléculas de proteína e isto pode aumentar a taxa de desnaturação (ZAKS e

KLIBANOV, 1986). Desta forma, é natural que a enzima exiba maior termoestabilidade em meio não aquoso.

2.3.4 Pressão

Ao contrário dos tratamentos térmicos, onde tanto ligações covalentes como não covalentes são afetadas, no processamento à alta pressão em temperatura ambiente as ligações covalentes são pouco afetadas e, conseqüentemente, a estrutura primária das proteínas permanece intacta durante o tratamento sob pressão (CHEFTEL, 1995). Entretanto, ligações químicas relativamente fracas (pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas ou mesmo algumas ligações iônicas) podem ser rompidas (HENDRICKX *et al.*, 1998). Pode-se então pelo tratamento a alta pressão distorcer a estrutura secundária e terciária do polipeptídeo, o que resultaria numa conformação da enzima diferente da nativa, mas que mantivesse ou aumentasse a atividade catalítica, sem que ocorra a desnaturação da proteína. Em geral, pressões acima de 3000bar à temperatura ambiente causam desnaturação protéica irreversível, enquanto pressões menores resultam em mudanças reversíveis na estrutura da proteína (CHEFTEL, 1995).

Os efeitos da alta pressão sobre enzimas podem ser divididos em duas classes. Na primeira, pressões hidrostáticas relativamente baixas (<1000bar) têm mostrado ativação de algumas enzimas (ASAKA *et al.*, 1994; ANESE *et al.*, 1995; CANO *et al.*, 1997; GIEBAUF e GAMSE, 2000; FRICKS *et al.*, 2006). Pressões muito maiores (>1000bar), geralmente induzem à inativação enzimática (WEEMAES *et al.*, 1998), porém há também casos de aumento da atividade (GARCIA-PALAZON *et al.*, 2004).

Pode-se inferir que dependendo da magnitude da pressão aplicada, a extensão das mudanças na estrutura em proteínas globulares pode ser diferente de uma enzima para outra. Neste sentido, pode também não ocorrer mudanças significativas na estrutura da enzima mesmo a altas pressões.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na revisão bibliográfica apresentada no decorrer deste capítulo, procurou-se relatar a aplicação de lipases em fluidos pressurizados, as características do biocatalisador e do solvente, e as variáveis que podem afetar no comportamento da atividade das enzimas quando submetidas a altas pressões.

Em reações limitadas pela difusão, o uso de um fluido pressurizado como solvente pode se constituir em uma alternativa satisfatória ao uso de solventes orgânicos convencionais, uma vez que as propriedades semelhantes as dos gases, facilitam as taxas de transferência de massa entre reagentes e catalisadores e a quantidade de solvente exigida é reduzida. Como um solvente interessante para as reações catalisadas por lipases, aponta-se o emprego do propano, devido suas propriedades e capacidade de dissolver compostos hidrofóbicos.

Com base nos fatores que podem afetar a atividade das enzimas, de fundamental importância é a sua avaliação prévia no fluido pressurizado a ser empregado.

Tendo como base a revisão da literatura, a carência de dados na mesma, uma vez que poucos trabalhos sobre a atividade de lipases não comerciais submetidas a pressões elevadas em um sistema enzima-solvente estão disponíveis, e a primordial importância do conhecimento prévio das condições adequadas a serem aplicadas nos processos de biotransformação, pode-se verificar a relevância no desenvolvimento de estudos na busca de processos e meios apropriados, visando maior conhecimento das condições ótimas de produção e de métodos de obtenção mais viáveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentada uma descrição dos materiais utilizados e os métodos e equipamentos empregados para realização deste trabalho.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

O solvente utilizado foi propano de procedência White Martins S.A. (com 99,5% pureza, fase líquida). As propriedades críticas do solvente utilizado, segundo Reid *et al.* (1987), são as seguintes: pressão crítica = 42,49bar, temperatura crítica = 96,6 °C e densidade crítica = 0,22g/cm³.

Para determinação da atividade enzimática foi utilizado ácido oléico de pureza elevada de procedência Sigma-Aldrich, álcool etílico Merck (99,9% de pureza), acetona P.A. Fmaia e solução de NaOH 0,01N, todos de grau analítico.

3.1.2 Enzimas

Três lipases não comerciais, nas suas formas imobilizada e liofilizada, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química da UFRJ, foram utilizadas na realização deste trabalho. As características específicas das lipases são apresentadas a seguir:

- Lipase de *P. simplicissimum* imobilizada – produzida por fermentação em estado sólido, pela cepa de *Penicillium simplicissimum*, utilizando torta de pinhão manso como substrato e imobilizada em Accurel MP1000. Não foi estudada uma faixa ótima de temperatura.
- Lipase de *P. simplicissimum* liofilizada – produzida por fermentação em estado sólido, pela cepa de *Penicillium simplicissimum*, utilizando torta de pinhão manso como substrato. Possui temperatura ótima em 50°C.

3 Materiais e Métodos

- Lipase de *A. parasiticus* imobilizada – produzida por fermentação em estado sólido, pela cepa de *Aspergillus parasiticus*, utilizando torta de babaçu como substrato e imobilizada em Accurel MP1000. Não foi estudada uma faixa ótima de temperatura.
- Lipase de *A. parasiticus* liofilizada – produzida por fermentação em estado sólido, pela cepa de *Aspergillus parasiticus*, utilizando torta de babaçu como substrato. Possui temperatura ótima em 35°C.
- Lipase de *A. wentii* imobilizada – produzida por fermentação em estado sólido, pela cepa de *Aspergillus wentii*, utilizando torta de pinhão manso como substrato e imobilizada em Accurel MP1000. Não foi estudada uma faixa ótima de temperatura.
- Lipase de *A. wentii* liofilizada – produzida por fermentação em estado sólido, pela cepa de *Aspergillus wentii*, utilizando torta de pinhão manso como substrato. Possui faixa ótima de temperatura entre 35-40°C.

Os extratos contendo lipases extracelulares de *P. simplicissimum* e *A. wentii* foram produzidos por fermentação em estado sólido utilizando torta de pinhão manso como substrato. Lipase de *A. parasiticus* foi obtida a partir do resíduo de torta de babaçu, em fermentação em estado sólido. 10g de substrato foram suplementados com melão de cana-de-açúcar (6,25% m/m), umedecido a 70% (m/m) e inoculado com 10^7 esporos g^{-1} de substrato seco. Após 72h de fermentação a enzima foi extraída com 45mL de tampão fosfato de sódio 100mmol/L em pH 7,0. A solução de proteína foi precipitada com sulfato de amônio (60% de saturação) e centrifugada a 13.000g por 30min. Após a centrifugação, o precipitado contendo a lipase foi dissolvido em 5mmol/L de tampão fosfato de sódio em pH 7,0 e dialisado contra o mesmo tampão, por 2h a 4°C. Para liofilização, os extratos foram transferidos para placas de Petri, (9cm de diâmetro, altura do líquido de 0,5cm) e congelados por 24 horas a -80°C. As placas foram colocadas em um secador de bandejas (Modulyo, Thermo Scientific, Waltham, MA, E.U.A.) e o extrato liofilizado para um teor de umidade final de 3%.

Imobilização: os extratos enzimáticos foram solubilizados em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) e submetidos à imobilização por adsorção física em

3 Materiais e Métodos

suporte hidrofóbico (Accurel, MP1000, Membrana, Alemanha). A preparação foi realizada pela adição de 10mL de etanol a 1000mg de suporte. Depois de 30min, o sobrenadante foi descartado e o suporte foi lavado várias vezes com água destilada até que o etanol fosse completamente removido. A imobilização da enzima foi obtida na proporção de enzima solúvel (mL): suporte (mg) de 1:25, sendo realizada com agitação magnética em banho de gelo e alíquotas retiradas periodicamente (0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 e 120min) para dosagem de proteína. O sobrenadante e o suporte com a enzima também foram analisados com relação à atividade enzimática. O teor de umidade residual da enzima imobilizada não foi maior que 1%.

Todas as lipases citadas anteriormente foram definidas para avaliação neste trabalho com base em projeto de maior magnitude, existente em parceria da URI, UFRJ e CENPES/PETROBRÁS que visa, em última instância, a produção enzimática de biodiesel em meios não convencionais, utilizando lipases não comerciais como catalisadores.

3.2 EQUIPAMENTOS E METODOLOGIA

3.2.1 Determinação da atividade enzimática de lipases

A atividade das enzimas foi quantificada pelo consumo de ácido oléico na reação de esterificação entre o ácido oléico e o etanol com razão molar ácido-álcool de 1:1 à temperatura de 40°C, com a enzima a 2% (m/m) mantida sob agitação por 12 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em shaker sob agitação. Alíquotas de 150µL, em quadruplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 12 minutos de reação e foram diluídas em 20mL de acetona-etanol (1:1). A quantidade de ácido oléico consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,01N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1µmol de ácido oléico por minuto nas condições experimentais descritas.

Uma vista geral do aparato experimental usado para a medida de atividade enzimática pode ser verificada na Figura 2.

3 Materiais e Métodos



Figura 2 - Equipamentos utilizados para medida de atividade enzimática. A- shaker; B- titulador (bureta automática); C- pHmetro.

A seguinte equação foi empregada para o cálculo da atividade das lipases:

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{[(V^0_{\text{NaOH}}) - (V^{12}_{\text{NaOH}})] \times N \times 10^3 \times V_t}{t \times m_a \times V_a}$$

onde: N = normalidade da solução de hidróxido de sódio;

V^0 = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL);

V^{12} = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra após 12 minutos de reação (mL);

m_a = massa de enzima utilizada na reação (g);

t = tempo de reação (min);

V_t = volume total;

V_a = volume da alíquota;

1U = 1 μ mol de ácido/minuto.

3 Materiais e Métodos

A atividade residual foi calculada através da equação abaixo:

$$\text{Atividade Residual (\%)} = \frac{\text{Atividade (U/g) após a pressurização}}{\text{Atividade (U/g) antes da pressurização}} \times 100$$

As atividades das enzimas foram determinadas no início e ao final das reações em todos os experimentos realizados, objetivando o acompanhamento da alteração da sua atividade quando submetida ao propano pressurizado.

3.2.2 Tratamento das enzimas em propano pressurizado

O equipamento utilizado nos experimentos de avaliação da atividade da enzima em fluidos pressurizados consiste basicamente de um reservatório de solvente (propano), dois banhos termostáticos, uma bomba de seringa (ISCO 260D), uma cuba de aço inoxidável com um volume interno de 3mL, um transdutor de pressão absoluta (Smar, LD301) equipado com um programador portátil (Smar, HT201) com uma precisão de $\pm 0,4$ bar. O diagrama esquemático do equipamento é apresentado na Figura 3. O equipamento foi construído para conduzir os experimentos até 350bar e 80°C (FRICKS *et al.*, 2006; FRANKEN *et al.*, 2010). Todas as linhas de montagem experimental empregaram tubulações OD 1/16" de aço inoxidável (HIP) e entre a bomba e o reservatório de solvente uma "check valve" (HIP 15-41AF1-T 316SS) foi colocada para evitar o refluxo do solvente pressurizado.

Duas outras válvulas micrométricas (HIP 15-11AF2 316SS) completaram o aparato experimental, uma localizada após a bomba de seringa, na entrada da célula de alta pressão, para permitir o carregamento de solvente e a outra logo após a célula para realizar a descarga do solvente. A célula de alta pressão encontrava-se submersa em banho de água e apoiada por um dispositivo simples, enquanto que as válvulas micrométricas ficavam localizadas fora do banho.

3 Materiais e Métodos

A lipase (aproximadamente 0,15g) foi colocada na célula e o reator mergulhado no banho com a temperatura já estabelecida (35°C). Após esta etapa, o sistema foi pressurizado e mantido à pressão e temperatura constantes por um tempo de exposição pré-estabelecido. Tipicamente, o tempo de pressurização era menor que 0,5 minutos, não sendo este incluído no tempo definido devido à sua pouca significância quando comparado ao tempo de exposição estabelecido. A seguir, nas taxas de descompressão pré-definidas (2–20bar/min), o sistema era despressurizado e a atividade lipásica determinada. A atividade residual da lipase foi determinada em relação à atividade antes e após o tratamento.

Uma vista geral da unidade e da célula utilizada nos experimentos pode ser verificada nas Figuras 4 e 5.

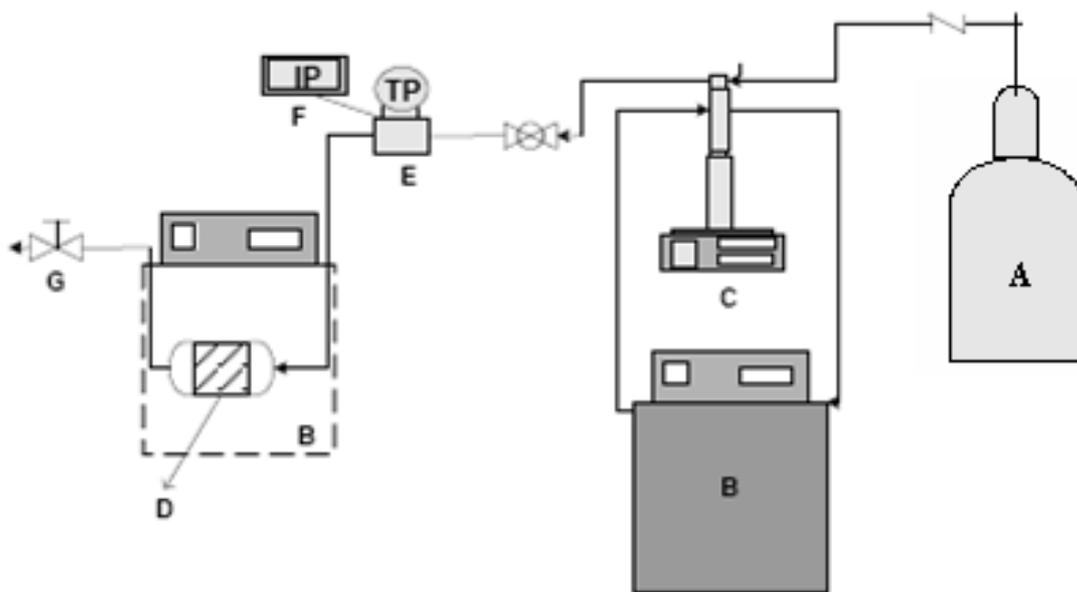


Figura 3 - Diagrama esquemático do aparato utilizado no tratamento das enzimas com o propano pressurizado. A– reservatório de solvente; B– banho termostatizado; C– bomba de seringa; D– reator/célula de aço; E– indicador de pressão; F– transdutor de pressão; G– válvula micrométrica.

3 Materiais e Métodos

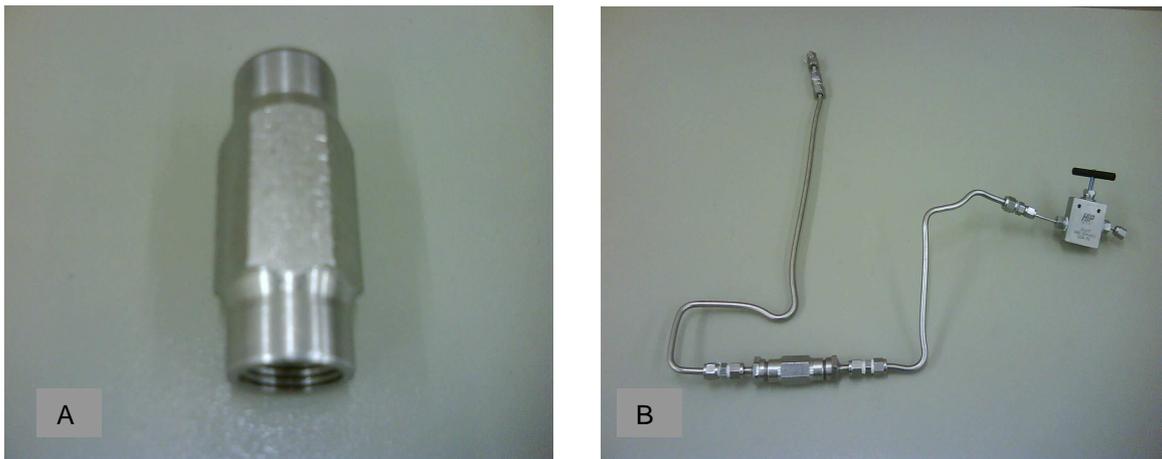


Figura 4 – A- detalhes da célula de aço inoxidável com volume interno de 3mL; B- célula de aço montada com a válvula micrométrica.



Figura 5 – A- vista do sistema mergulhado no banho termostatizado; B- unidade experimental utilizada no tratamento das enzimas.

Um planejamento experimental 2^3 , com dois níveis e três variáveis (pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização) foi adotado. O planejamento experimental, levando em consideração os intervalos de variáveis comumente utilizados para reações de transesterificação é apresentado na Tabela 2. Foi realizada a triplicata do ponto central para a avaliação do erro experimental. Os resultados foram analisados usando o software Statística 6.

Tabela 2 - Condições experimentais avaliadas no planejamento experimental realizado para cada lipase não comercial.

Experi mento	P (bar)	t (h)	R (bar/min)
1	30(-1)	1(-1)	2(-1)
2	30(-1)	1(-1)	20(+1)
3	30(-1)	6(+1)	2(-1)
4	30(-1)	6(+1)	20(+1)
5	70(+1)	1(-1)	2(-1)
6	70(+1)	1(-1)	20(+1)
7	70(+1)	6(+1)	2(-1)
8	70(+1)	6(+1)	20(+1)
9	50 (0)	3,5 (0)	11 (0)
10	50 (0)	3,5 (0)	11 (0)
11	50 (0)	3,5 (0)	11 (0)

3.2.3 Caracterização dos catalisadores

A análise textural dos catalisadores foi realizada a partir das isotermas de adsorção/dessorção de N₂. As medidas foram realizadas para a determinação das áreas superficiais, volume total de poros, volume de microporos e diâmetro médio de poros e distribuição de tamanhos de poros.

Foi empregado o equipamento AUTOSORB-1 da Quantachrome (Nova-2200e). Antes da análise, as amostras foram tratadas a vácuo, a uma temperatura de 100°C para garantir a secagem completa. As medidas foram realizadas na temperatura do N₂ líquido (-196°C). Os parâmetros texturais foram determinados a partir das isotermas obtidas. A área superficial específica foi determinada pelo método BET e o diâmetro médio dos poros utilizou o método BJH (Barret, Joyner, Halenda) na faixa da adsorção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo visa apresentar os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, relacionados à avaliação da atividade de esterificação de lipases não comerciais após processamento em propano pressurizado. Para efeitos de melhor compilação e avaliação dos dados obtidos, a apresentação será abordada de acordo com a lipase utilizada.

4.1 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Aspergillus parasiticus* EM PROPANO PRESSURIZADO

Nesta etapa são apresentados e discutidos os resultados obtidos na avaliação da atividade de esterificação da lipase de *Aspergillus parasiticus* nas formas imobilizada e liofilizada.

Lipase de *Aspergillus parasiticus* imobilizada

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática da lipase de *Aspergillus parasiticus* imobilizada. De acordo com estes resultados a enzima submetida a propano pressurizado apresentou ganho ou perda de atividade dependendo das condições experimentais investigadas. A atividade de esterificação inicial desta enzima, determinada neste trabalho, é de 685U/g. O maior ganho de atividade ocorreu no experimento 8 (258,56%), relacionado às condições de limite superior de pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização.

A Tabela 4 apresenta os efeitos estimados para cada uma das variáveis independentes estudadas na atividade da lipase no sistema com propano pressurizado.

4 Resultados e Discussões

Tabela 3 - Atividade enzimática da *Aspergillus parasiticus* imobilizada submetida a propano pressurizado.

Experimento	P (bar)	T (h)	R (bar/min)	Atividade Final (U/g)	Atividade Residual (%)
1	30	1	2	356,2	52,0
2	30	1	20	338	49,3
3	30	6	2	220,5	32,2
4	30	6	20	459,5	67,0
5	70	1	2	897,8	131,1
6	70	1	20	407,1	59,4
7	70	6	2	417,7	61,0
8	70	6	20	1771,1	258,6
9	50	3,5	11	887,9	129,6
10	50	3,5	11	895,9	130,8
11	50	3,5	11	956,4	139,6

Atividade inicial: 685U/g.

Tabela 4 - Efeitos estimados das variáveis na resposta atividade da lipase de *Aspergillus parasiticus* imobilizada no sistema com propano pressurizado, ao nível de 95% de confiança.

Variável	Efeito	t (2)	P
Independente	100,9591	61,18229	0,000267
Pressão (P)	38,6875	19,99400	0,002492
Tempo de exposição (t)	15,8625	8,19786	0,014556
Taxa de despressurização (R)	19,7625	10,21341	0,009451
Pressão (P) x Tempo de exposição (t)	16,4025	8,47694	0,013632
Pressão (P) x Taxa de despressurização (R)	11,7225	6,05828	0,026181
Tempo de exposição (t) x Taxa de despressurização (R)	38,3375	19,81311	0,002538

Com relação à atividade da lipase submetida a propano pressurizado, como mostra a Tabela 4, todas as variáveis afetaram a atividade enzimática. Nota-se que a pressão, assim como a interação entre o tempo de exposição e

4 Resultados e Discussões

a taxa de despressurização apresentaram-se mais significativas, sugerindo que submeter a enzima ao solvente em uma maior pressão e maior tempo de exposição x taxa de despressurização, ocasionaria um maior ganho de atividade. Alguns trabalhos apresentados na literatura (KNEZ e HABULIN, 2002; FRANKEN *et al.*, 2010 e OLIVEIRA *et al.*, 2006b) sugerem que a etapa de despressurização interfere na atividade enzimática depois do tratamento com fluidos pressurizados e, segundo CHEFTEL (1995), o tratamento a alta pressão pode distorcer a estrutura secundária e terciária do polipeptídeo, o que resultaria numa conformação da enzima diferente da nativa, mas que mantivesse ou aumentasse a atividade catalítica, sem que ocorra a desnaturação da proteína.

Lipase de *Aspergillus parasiticus* liofilizada

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática da *Aspergillus parasiticus* liofilizada submetida a propano em altas pressões.

Tabela 5 - Atividade enzimática da *Aspergillus parasiticus* liofilizada submetida a propano pressurizado.

Experimento	P (bar)	t (h)	R (bar/min)	Atividade Final (U/g)	Atividade Residual (%)
1	30	1	2	423,4	63,7
2	30	1	20	644,2	96,9
3	30	6	2	437,1	65,7
4	30	6	20	808,7	121,6
5	70	1	2	584,7	87,9
6	70	1	20	466,9	70,2
7	70	6	2	491,2	73,9
8	70	6	20	533,7	80,3
9	50	3,5	11	751,5	113,0
10	50	3,5	11	711,5	107,0
11	50	3,5	11	687,5	103,4

Atividade inicial: 665U/g.

4 Resultados e Discussões

De acordo com estes resultados a enzima liofilizada submetida a propano pressurizado apresentou diferentes valores de atividade, sendo que as maiores perdas de atividade ocorreram no experimento 1, que apresentou perda de 36,33% e no experimento 3, que apresentou perda de 34,27%. Estes dois experimentos apresentavam condições de menor pressão (30bar) e taxa de despressurização (2bar/min), porém diferentes tempos de exposição (1h e 6h, respectivamente). A atividade de esterificação inicial desta enzima foi de 665U/g.

Cabe observar que neste solvente a enzima liofilizada apresentou um ganho de atividade enzimática nos experimentos referentes ao ponto central, assim como ocorreu para a enzima imobilizada, mostrando que a enzima na sua forma livre, sem a adição de nenhum processo dispendioso após a sua obtenção, também é estável em solvente pressurizado.

No diagrama de Pareto (Figura 6) são apresentados os efeitos estimados para cada variável estudada na atividade da lipase liofilizada no sistema utilizando propano pressurizado. Pode-se observar que as variáveis taxa de despressurização (R) e a interação pressão x taxa de despressurização mostraram-se significativas a nível de 95%. A variável taxa de despressurização foi a que mais afetou positivamente o ganho de atividade enzimática da enzima submetida a propano pressurizado. Conclui-se então que, quanto maior a taxa de despressurização (R), maior será o ganho de atividade enzimática. De acordo com Knez e Habulin (2002) a taxa de despressurização é um passo determinante em relação à atividade da enzima pré-tratada em fluidos pressurizados.

4 Resultados e Discussões

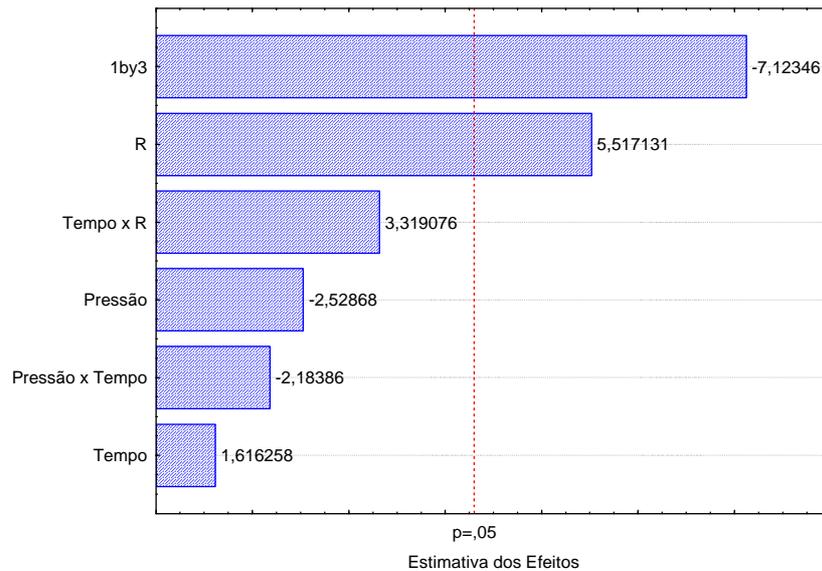


Figura 6 - Diagrama de Pareto para a lipase *Aspergillus parasiticus* liofilizada no sistema propano pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade de esterificação obtida.

4.2 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Aspergillus wentii* EM PROPANO PRESSURIZADO

Nesta etapa são apresentados os resultados obtidos para a atividade de esterificação da lipase *A. wentii* imobilizada. Cumpre salientar que a etapa de avaliação da atividade residual utilizando a referida lipase imobilizada foi investigada em apenas uma condição experimental, devido à falta de amostra de enzima suficiente para completar o planejamento experimental. Deste modo, a lipase *A. wentii* imobilizada, que tem como atividade inicial de esterificação 370U/g, apresentou no experimento de ponto central (pressão de 50bar, tempo de 3,5 horas e taxa de despressurização de 11bar/min) uma atividade enzimática de 59,8U/g, sendo a atividade residual de 16%, ou seja, houve grande perda de atividade para esta enzima nesta condição experimental. Entretanto, tal resultado não é parâmetro para se obter uma conclusão precisa acerca do comportamento de tal enzima em propano a alta pressão, uma vez que a atividade enzimática pode variar de forma significativa dependendo da condição experimental utilizada.

4 Resultados e Discussões

Lipase de *Aspergillus wentii* liofilizada

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática da *Aspergillus wentii* liofilizada. De acordo com estes resultados a enzima submetida a propano pressurizado apresentou um maior ganho de atividade nos experimentos conduzidos no menor nível de pressão. A atividade de esterificação inicial desta enzima é de 582U/g, e nas condições de limite inferior de pressão, a atividade residual da enzima foi superior a 100%.

O gráfico de Pareto da figura 7 apresenta os efeitos estimados para cada variável estudada na atividade da lipase liofilizada no sistema utilizando propano pressurizado. Com relação ao ganho de atividade, a variável que mais fortemente afetou foi a pressão, tendo esta um efeito negativo, ou seja, a atividade residual enzimática foi maior quando a enzima foi submetida ao menor limite de pressão. Em seguida, com efeitos positivos significativos, tem-se a taxa de despressurização, e as interações pressão x tempo e pressão x taxa de despressurização.

Tabela 6 - Atividade enzimática da *Aspergillus wentii* liofilizada submetida a propano pressurizado.

Experimento	P (bar)	t (h)	R (bar/min)	Atividade Final (U/g)	Atividade Residual (%)
1	30	1	2	723,7	124,4
2	30	1	20	898,4	154,6
3	30	6	2	669,9	115,3
4	30	6	20	687,2	118,3
5	70	1	2	95,6	16,4
6	70	1	20	318,8	54,8
7	70	6	2	265,6	45,7
8	70	6	20	773,7	133,6
9	50	3,5	11	511,1	88,0
10	50	3,5	11	544,7	93,7
11	50	3,5	11	474,6	81,7

Atividade inicial: 582U/g.

4 Resultados e Discussões

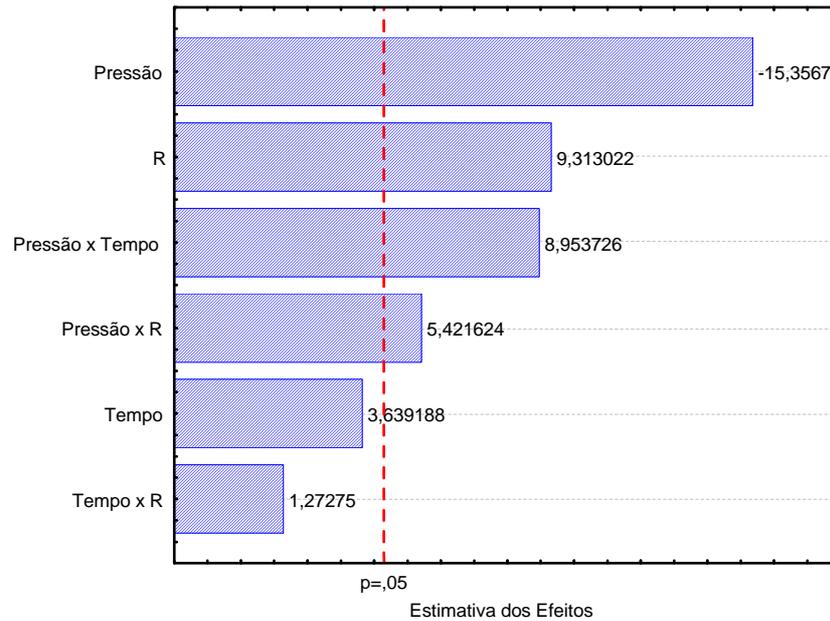


Figura 7 - Diagrama de Pareto para a lipase *Aspergillus wentii* liofilizada no sistema propano pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade de esterificação obtida.

4.3 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Penicillium simplicissimum* EM PROPANO PRESSURIZADO

Nesta etapa são apresentados e discutidos os resultados obtidos na avaliação da atividade de esterificação da lipase de *Penicillium simplicissimum* nas formas imobilizada e liofilizada.

Lipase de *Penicillium simplicissimum* imobilizada

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática da *Penicillium simplicissimum* imobilizada submetida a propano em altas pressões.

4 Resultados e Discussões

Tabela 7 - Atividade enzimática da *Penicillium simplicissimum* imobilizada submetida a propano pressurizado.

Experimento	P (bar)	t (h)	R (bar/min)	Atividade Final (U/g)	Atividade Residual (%)
1	30	1	2	347,3	101,0
2	30	1	20	61,9	17,9
3	30	6	2	321,7	93,0
4	30	6	20	128,8	37,2
5	70	1	2	290,88	84,0
6	70	1	20	375,8	108,6
7	70	6	2	156,3	45,2
8	70	6	20	432,6	125,0
9	50	3,5	11	1003,7	290,1
10	50	3,5	11	963,3	278,4
11	50	3,5	11	913,3	264,0

Atividade inicial: 346U/g.

Pode ser observado que os experimentos que demonstraram maior aumento da atividade enzimática da *P. simplicissimum* imobilizada foram os relacionadas ao ponto central, os quais, como em todos os experimentos deste trabalho, tiveram uma excelente reprodutibilidade. Nos demais experimentos, a enzima apresentou ganho ou perda de atividade dependendo das condições de execução. A atividade de esterificação inicial desta enzima foi de 346U/g.

A Tabela 8 apresenta os efeitos estimados para cada uma das variáveis independentes estudadas na atividade da lipase no sistema com propano pressurizado.

4 Resultados e Discussões

Tabela 8 - Efeitos estimados das variáveis na resposta atividade da lipase de *Penicillium simplicissimum* imobilizada no sistema com propano pressurizado, ao nível de 95% de confiança.

Variável	Efeito	t (2)	P
Independente	131,2491	33,26923	0,000902
Pressão (P)	28,5950	3,09069	0,090673
Tempo de exposição (t)	-2,6350	-0,28480	0,802577
Taxa de despressurização (R)	-8,4550	-0,91386	0,457260
Pressão (P) x Tempo de exposição (t)	-8,5950	-0,92899	0,450967
Pressão (P) x Taxa de despressurização (R)	60,6650	6,55697	0,022478
Tempo de exposição (t) x Taxa de despressurização (R)	20,5150	2,21736	0,156884

Para este sistema, a interação pressão x taxa de despressurização foi a única variável significativa, e que ocasionou ganho de atividade na *P. simplicissimum* imobilizada submetida a propano em altas pressões. Como mostrado na Tabela 8, o efeito foi significativo positivo o que demonstra que quanto maior a interação taxa de despressurização x pressão do solvente sobre a enzima maior é o ganho de atividade enzimática.

Lipase de *Penicillium simplicissimum* liofilizada

A Tabela 9 apresenta os valores de ganho de atividade da enzima *Penicillium simplicissimum* liofilizada submetida ao propano pressurizado. Pode ser verificado que 8 experimentos apresentaram ganho de atividade quando a enzima *Penicillium simplicissimum* liofilizada foi exposta a propano a altas pressões, exceto os experimentos realizados no ponto central, quando a enzima perdeu integralmente sua atividade, sendo que a atividade de esterificação inicial desta enzima é de 89,2U/g.

4 Resultados e Discussões

Tabela 9 - Atividade enzimática da *Penicillium simplicissimum* liofilizada submetida a propano pressurizado.

Experimento	P (bar)	t (h)	R (bar/min)	Atividade Final (U/g)	Atividade Residual (%)
1	30	1	2	181,8	203,8
2	30	1	20	328,6	364,1
3	30	6	2	144,8	162,3
4	30	6	20	177,2	198,7
5	70	1	2	380,7	426,9
6	70	1	20	221,8	248,7
7	70	6	2	299,4	335,7
8	70	6	20	113,9	127,7
9	50	3,5	11	0	0
10	50	3,5	11	0	0
11	50	3,5	11	0	0

Atividade inicial: 89,2U/g.

A Figura 8 apresenta os efeitos estimados para cada uma das variáveis independentes estudadas na atividade da lipase no sistema com propano pressurizado.

Observou-se neste sistema, que nenhuma das variáveis estudadas afetou significativamente a atividade enzimática da *P. simplicissimum* liofilizada, sendo que a mesma apresentou boa estabilidade e ganho de atividade tanto nos níveis inferiores e superiores de pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização, salvo os experimentos de nível intermediário, os quais inativaram a atividade da enzima.

As respostas de atividade enzimática obtidas nos experimentos de ponto central causaram surpresa, assim cabe ressaltar que muitas condições experimentais referentes a lipase *Penicillium simplicissimum* liofilizada como também das demais enzimas estudadas foram realizadas em duplicata, para a garantia da confiabilidade dos resultados.

4 Resultados e Discussões

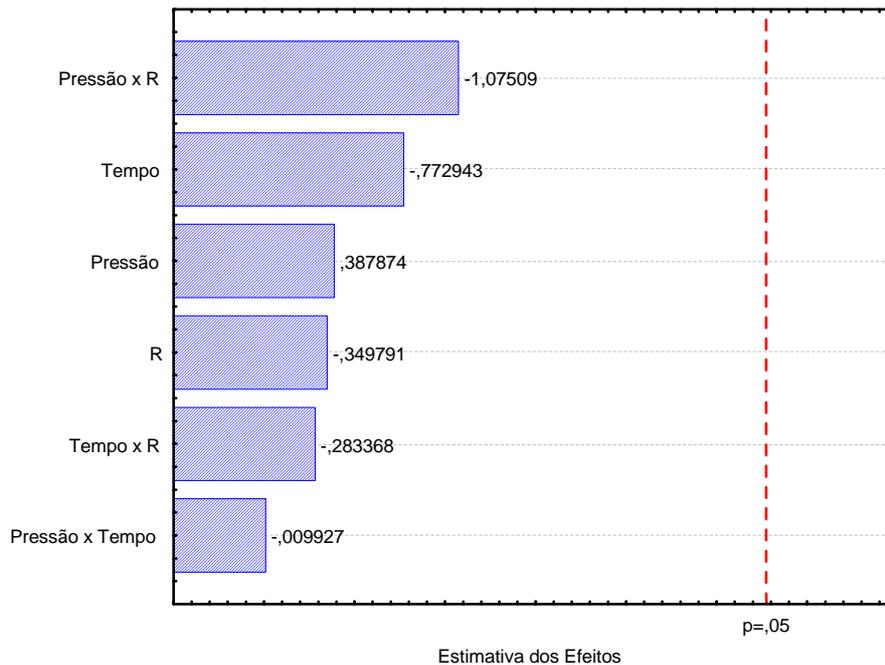


Figura 8 - Diagrama de Pareto para a lipase *Penicillium simplicissimum* liofilizada no sistema propano pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade de esterificação obtida.

A comparação dos resultados para *P. simplicissimum* nas formas imobilizada e liofilizada permite concluir que comportamentos diferentes podem ser obtidos em função da forma da enzima. Especificamente para a lipase de *P. simplicissimum*, pode-se observar que a forma liofilizada apresenta um comportamento particular, apresentando maior atividade residual em muitas das condições experimentais. Uma hipótese possível para este fato pode estar associada ao enrijecimento da enzima causado pelo processo de imobilização, tornando difíceis as alterações conformacionais da estrutura terciária da proteína.

Segundo Yu *et al.* (1993) a natureza do suporte usado para imobilizar uma enzima tem um importante papel na determinação da partição da água entre enzima, solvente e suporte e, conseqüentemente, na atividade da enzima.

Com relação ao processo experimental, as variáveis estudadas mostraram-se significativas no tratamento das enzimas a alta pressão, no entanto, não foi realizado para estas enzimas nenhum outro estudo envolvendo

4 Resultados e Discussões

uma mudança nos níveis das variáveis, uma vez que, as características do solvente utilizado (propano) não sofrem alterações com o aumento de pressão na temperatura estabelecida, a qual foi mantida constante devido seu acréscimo causar a desnaturação das lipases.

Comparando todos os resultados obtidos, do comportamento da atividade enzimática frente ao propano pressurizado, com os de Oliveira *et al.* (2006b), a qual avaliou a atividade das enzimas Novozym 435, Lipozyme IM e *Yarrowia lipolytica* submetidas à CO₂, propano e butano pressurizados, pode-se observar a concordância entre os mesmos, uma vez que este último também reporta ganho de atividade enzimática da Novozym 435 quando esta é pressurizada no fluido propano, e perdas de atividade não significativas para as demais enzimas, neste mesmo fluido. Cabe salientar, também do trabalho de Oliveira *et al.*, que assim como com o uso de propano, o butano também trouxe ganho de atividade para a enzima Novozym 435, em contrapartida, o CO₂ acarretou perda de atividade para todas as enzimas em qualquer condição experimental.

O trabalho apresentado por Habulin e Knez (2001), o qual estuda a atividade de algumas lipases na reação de esterificação de ácido butírico e etanol em CO₂ supercrítico e propano a 100bar e 40°C, mostra que maiores perdas de atividade foram verificadas em CO₂ e que aumento de atividade de esterificação das lipases foi observado nos testes com propano.

É importante mencionar que vários estudos disponíveis na literatura relacionados ao tema atual referem-se à utilização de CO₂ como solvente e na maioria dos casos, o uso deste solvente levou à perdas na atividade enzimática, principalmente devido às características hidrofílicas do CO₂. Segundo muitos autores, CO₂ supercrítico poderia ser responsável pela retirada da água essencial responsável pela manutenção da atividade enzimática (OLIVEIRA *et al.*, 2006 ab; FRICKS *et al.*, 2006; PRIMO *et al.*, 2007).

Por outro lado, alguns estudos anteriores mostram que os solventes com baixa constante dielétrica, tais como o propano, poderiam manter, ou mesmo aumentar a atividade e estabilidade enzimática (KNEZ e HABULIN, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006 ab; FRICKS *et al.*, 2006; PRIMO *et al.*, 2007).

4 Resultados e Discussões

As propriedades do solvente afetam sua interação com enzimas específicas e diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo da enzima estudada (KASCHE *et al.*, 1988; FRICKS *et al.*, 2006). Além disso, o gás propano tem relativa baixa solubilidade em água, podendo-se especular que o mesmo poderia atuar como um fluido pistonado, aumentando a atividade enzimática.

É importante citar que na literatura há uma carência de resultados sobre o comportamento das lipases não-comerciais com atividade de esterificação, quando tratadas sob fluidos pressurizados. Neste sentido, os resultados obtidos no presente trabalho podem ser relevantes para efeitos de desenvolvimento de novas aplicações e/ou processos para estes catalisadores de baixo custo, quando comparados às enzimas comerciais, para reações de interesse.

Andrade *et al.* (2008) ao investigar o efeito de CO₂ e propano pressurizado no tratamento sobre a atividade de uma solução contendo D-hidantoinase (2mg sólidos/mL), observaram um declínio contínuo na atividade da enzima em todas as condições experimentais avaliadas em CO₂ comprimido. A atividade da enzima na solução residual apresentou valores de cerca de 60%, indicando que a enzima foi desnaturada durante o pré-tratamento com dióxido de carbono comprimido.

Desnaturação de proteínas induzida por pressão tem sido um importante tópico de pesquisa nos últimos anos e, a partir de alguns exemplos existentes, a desnaturação parece ser um processo reversível, diferente da desnaturação causada pela temperatura (HEREMANS *et al.*, 1996). Além disso, nos trabalhos apresentados por Andrade *et al.* (2008), após 2h de tratamento da enzima em propano pressurizado uma ligeira alteração na atividade residual foi observada.

Comparando os resultados obtidos com CO₂ e propano dos autores acima citados verificou-se que as proteínas parecem ser mais estáveis em propano do que em CO₂. Este fato pode ser explicado em termos da maior solubilidade do CO₂ em solução aquosa em comparação com propano. Uma série de conjecturas tem sido apresentada na literatura sobre o efeito do tratamento com CO₂ na atividade enzimática. No entanto, devido à recente

4 Resultados e Discussões

aplicação de propano pressurizado como solvente, poucas informações sobre o efeito deste líquido na atividade da enzima estão disponíveis.

No caso específico dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se verificar que o emprego de propano pressurizado como solvente, em boa parte das condições avaliadas, conduziu a um aumento da atividade residual da maioria das lipases estudadas.

Assim, os resultados reportados na literatura e os apresentados neste trabalho, parecem indicar que os solventes com baixa constante dielétrica e ativação interfacial, permitem maior acesso ao sítio ativo da enzima (KNEZ *et al.*, 1998).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES

Para a caracterização dos catalisadores e comparação destes com um catalisador comercial (Novozym 435), foram selecionadas duas amostras, as quais apresentaram, de modo geral, maior aumento na atividade enzimática, *P. simplicissimum* imobilizada e *A. parasiticus* imobilizada.

A partir das isotermas de adsorção do nitrogênio foram determinadas as seguintes propriedades do catalisador: A_{BET} (área superficial determinada pela isoterma BET); V_{BJH} (volume dos poros, determinado pelo modelo BJH); diâmetro médio do poro (determinado pelo modelo BJH).

O resultado da caracterização, comparado com os de uma enzima comercial, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultado da caracterização dos catalisadores pela análise de BET.

Enzima	Atividade Enzimática (U/g)	Diâmetro de Poro (nm)	Volume de Poro (mL/g)	Área Superficial ² – BET (m ² /g)
Novozym 435	2388	15,0	0,50	130,0
<i>P. simplicissimum</i> imobilizada (Accurel MP1000)	346	13,0	0,14	42,6
<i>A. parasiticus</i> imobilizada (Accurel MP1000)	685	13,0	0,14	46,3

4 Resultados e Discussões

Conforme a Tabela 10, verifica-se que a atividade da lipase Novozym 435 é significativamente superior às atividades das enzimas não comerciais, todas avaliadas utilizando ácido oléico e etanol como substratos da reação.

Observa-se também que o diâmetro do poro das enzimas utilizadas neste trabalho é semelhante à lipase comercial Novozym 435, porém com relação ao volume do poro e área superficial as mesmas possuem valores consideravelmente inferiores aos da enzima comercial.

O baixo volume de poro e área superficial pode acarretar em dificuldades de transferência de massa devido a menor difusão, uma vez que poros pequenos dificultam a entrada do solvente em suas cavidades, dificultando a reação, todavia esta ainda é uma questão a ser estudada e aperfeiçoada.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados no decorrer deste capítulo, relacionados ao comportamento de três lipases não comerciais, nas formas livre e imobilizada, após processamento em propano pressurizado e, devido ao grande volume de informações, buscar-se-á compilar os dados, como forma de melhor visualização global dos resultados obtidos.

Primeiramente, será apresentada a compilação referente ao comportamento das três lipases avaliadas na forma livre (liofilizada). A Figura 9 apresenta a compilação de tais dados. Os números apresentados na abscissa são relacionados às condições experimentais estudadas no planejamento experimental (Tabelas 5, 6 e 9).

Com base nesta figura, pode-se verificar que, dentre as três lipases liofilizadas, a que apresentou um melhor comportamento em propano pressurizado, foi a lipase de *P. simplicissimum*, a qual obteve excelentes ganhos de atividade. Com relação às demais, houve perda e ganho de atividade dependendo da faixa de pressão, tempo de exposição e taxa de depressurização investigadas. O propano mostrou-se um solvente adequado para a catálise de reações bioquímicas utilizando as enzimas na forma liofilizada em determinadas condições aqui enfocadas.

4 Resultados e Discussões

Para fins de comparação em relação à forma de apresentação da enzima (liofilizada e imobilizada), a Figura 10 apresenta os dados obtidos em relação à lipase de *P. simplicissimum*. Através da análise desta figura pode-se verificar que as duas formas de lipase apresentaram bom comportamento após processamento com propano pressurizado, a forma livre da enzima pareceu apresentar maior estabilidade/ganho que a forma imobilizada em um maior número de condições investigadas, no entanto o incremento de atividade para ambas as enzimas foi satisfatório.

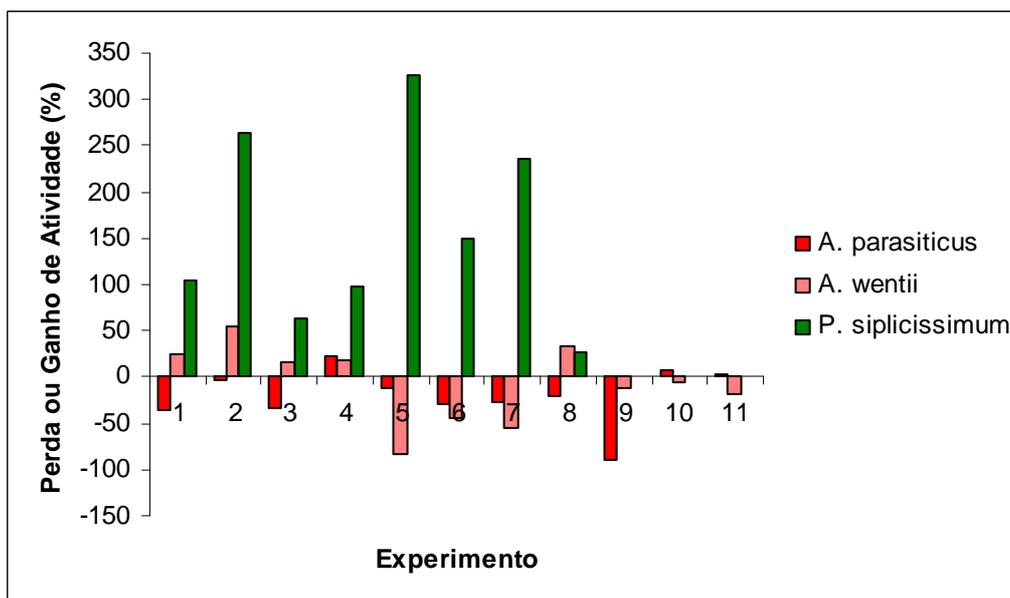


Figura 9 - Compilação dos resultados de atividade residual em função das lipases liofilizadas após processamento em propano pressurizado.

Com base em todos os resultados apresentados, de uma forma geral, pode-se concluir que a atividade enzimática varia de forma significativa dependendo da enzima, da forma de apresentação da mesma e da condição experimental estudada. Os resultados obtidos permitem definir para cada enzima e em cada forma de apresentação, faixas de operação em termos de atividade residual para aplicação das mesmas como catalisadores de reações de esterificação de interesse, tornando possível, com base nos dados apresentados e nos resultados apontados na literatura, verificar que o propano apresenta-se como um solvente adequado à consecução de tais reações.

4 Resultados e Discussões

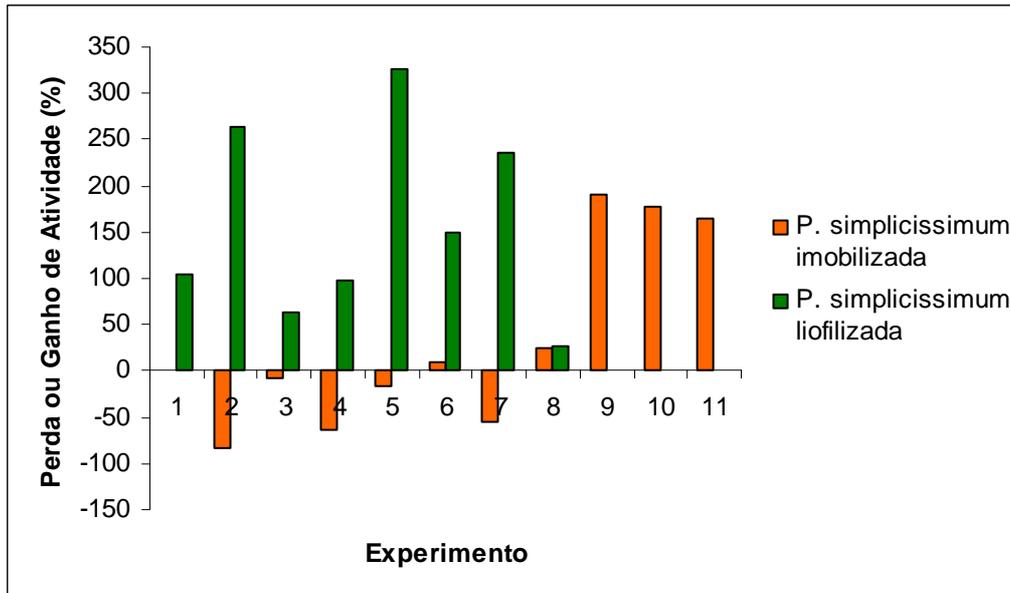


Figura 10 - Compilação dos resultados de atividade enzimática em função da forma de apresentação (imobilizada e liofilizada) da lipase de *Penicillium simplicissimum*.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho investigações acerca do comportamento da atividade enzimática de três lipases, na sua forma liofilizada e imobilizada, submetidas a propano pressurizado foram realizadas a fim de fornecer suporte para reações de esterificação catalisadas por elas. O uso do planejamento de experimentos para avaliar a atividade das enzimas mostrou ser uma ferramenta interessante para a investigação da influência das variáveis de processo no comportamento das lipases.

O presente estudo permitiu uma avaliação da estabilidade das enzimas não comerciais ao propano em alta pressão, assim como das variáveis que afetam o processo. Avaliando a perspectiva da utilização de propano pressurizado como solvente para reações enzimáticas de interesse, o mesmo se mostrou apropriado, pois bons níveis de atividade de esterificação foram obtidos em muitas condições experimentadas.

A concretização deste trabalho permite, de forma abrangente, chegar à algumas conclusões:

- As lipases apresentam diferentes comportamentos dependendo da forma de apresentação e das condições experimentais, podendo-se dizer que os efeitos de interação enzima:solvente apresentam papel fundamental no comportamento da enzima em fluidos pressurizados.
- Ocorreu ganho de atividade, para praticamente todas as enzimas, dependendo das características do sistema de investigação.
- O maior ganho de atividade ocorreu para a enzima *P. simplicissimum* liofilizada (427%) que ocorreu na maior pressão (70bar), menor tempo (1h) e menor taxa de despressurização (2bar/min).
- Os experimentos tiveram uma boa reprodutibilidade, o que pode ser constatado pelos valores de atividade enzimática obtidos nos pontos centrais.
- Pela análise estatística, pode-se observar que as variáveis que mais frequentemente afetaram o processo foram a pressão e a taxa de despressurização, como também a interação entre as mesmas.

5 Conclusões

- Os resultados aqui obtidos podem contribuir como base para a seleção das adequadas condições operacionais, de modo que estes catalisadores podem ser aplicados em reações de biotransformação.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos e dadas às observações constatadas durante a realização deste trabalho, as seguintes sugestões podem ser delineadas:

- Análise da mudança conformacional ocorrida nas enzimas após serem submetidas a altas pressões através de técnicas como Microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliação do comportamento da atividade das lipases frente ao processamento em outros fluidos pressurizados, como CO₂ e butano.
- Utilização dos resultados obtidos neste trabalho para definir regiões de operação para reações de esterificação em meio pressurizado usando estas lipases como catalisadores.
- Testar a especificidade destas lipases frente a diferentes ácidos graxos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J.M., OESTREICHER, E.G., ANTUNES, O.A.C., OLIVEIRA, J.V., OLIVEIRA, D., SOARES, C.M., DARIVA, C. **Effect of Treatment with Compressed CO₂ and Propane on D-Hydantoinase Activity.** Journal of Supercritical Fluids, v.46, 342-350, 2008.

ANESE, M.; NICOLI, M. C.; DALL'AGLIO, G; LERICI, C. **Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities.** J. Food Biochemistry, v.18, 285- 293, 1995.

ASAKA, M.; AOYAMA, Y.; NAKANISHI, R.; HAYASHI, R. **Purification of a Latent Form of Polyphenoloxidase from La France Pear Fruit and its Pressure-activation.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.58, 1486-1489,1994.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**, 2º ed. Zaragoza: Acribia, 1087p., 1997.

BRÍGIDA, A. I. S. **Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra de casca de coco verde como suporte.** Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, 2006.

BURKERT, J.F.M. **Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

BURKERT, J. F. M; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. **Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design.** Bioresource Technology, v.91, 77-84, 2004.

7 Referências Bibliográficas

CANO, M.P.; HERMANDEZ, A.; ANCOS, B. **High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products.** Journal of Food Science, v.62, 85-88,1997.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C, AGUIAR, C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, v.27, n.1, 146-156, 2004.

CHEFTEL, J.C. **Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation.** Food Science and Technology International, v.1, 75-90, 1995.

COX, P.M. **Ultracongelacion de alimentos: Guía de la teoría y práctica.** Zaragoza: Acribia, 459p, 1987.

DALLA ROSA, C. **Produção de ésteres etílicos a partir de óleos de soja utilizando lipase em propano.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2006.

DALLA ROSA, C.; MORANDIM M.; NINOW J.; OLIVEIRA D.; TREICHEL H.; OLIVEIRA J. **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane.** Journal of Supercritical Fluids, v.47, 49–53, 2008.

DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J. V. **The role organic solvent amount in the lipase-catalyzed biodiesel production.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.30, 76-78, 2010.

DALLA-VECCHIA R. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.** Química Nova, v.27, n.4, 623-630, 2004.

DZIEZAK, J.D. **Enzymes: catalyses for food processes.** Food technology, v. 45, 78- 85, 1991.

7 Referências Bibliográficas

EISENMENGER, M. J. e REYES-DE-CORCUERA, J. I. **High pressure enhancement of enzymes: a review.** Enzyme and Microbial Technology, v.45, 331-347, 2009.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 2000.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais.** Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.

FEIHRMANN, A.F. **Avaliação da atividade enzimática de lipase imobilizadas em fluidos pressurizadas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2005.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**, Zaragoza: Acribia, 1095p, 1993.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; CABRERA, Z.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports.** Enzyme and Microbial Technology, v. 41, 565-569, 2007.

FRANKEN L. P. G.; N. S. MARCON; TREICHEL H.; OLIVEIRA D.; FREIRE D. M. G.; DARIVA C.; DESTAIN J.; OLIVEIRAJ. V. **Effect of Treatment with Compressed Propane on Lipases Hydrolytic Activity.** Food and Bioprocess Technology, v.3, 511–520, 2010.

FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P B.; OESTREICHER, E G.; ANTUNES, O A C.; GIRARDI, J S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. **Evaluation os radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide.** Journal os Supercritical Fluids, v.38, 347-353, 2006.

7 Referências Bibliográficas

GARCIA-PALAZON, A.; SUTHANTHANGJAI, W.; KADJA, P.; ZABETAKIS, I. **The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry and strawberry.** Food Chemistry, v.88, 7-10, 2004.

GIEBAUF, A.; GAMSE, T. **A simple process for increasing the specific activity of porcine pancreatic lipase by supercritical carbon dioxide treatment.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.9, 57-64, 2000.

HABULIN, G.; KNEZ, K. **Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.76, 1260–1265, 2002.

HAN, S. J.; BACK, J. H.; YOON, M. Y.; SHIN, P. K.; CHEONG, C. S.; SUNG, M. H.; HONG, S. P.; CHUNG, I. Y.; HAN, Y. S.; **Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01.** Biochimie, v. 85(5), 501-510, 2003.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. **Industrial application of microbial lipases.** Enzyme and Microbial Technology, v.39, n.2, 235-251, 2006.

HENDRICKX, M.; LUDI KHUYZE, L.; VAN den BROECK, I.; WEEMAES, C. **Effects of High pressure on enzymes related to food quality (review)** Trends in Food Science & Technology, v.9, 97-203, 1998.

HEREMANS, K., GOOSSENS, K., SMELLER, L. **Pressure-Tuning Spectroscopy of Proteins: Fourier Transform Infrared Studies in the diamond Anvil Cell.** Oxford, 44p, 1996.

HUANG, S. H.; TSAI, S. W. **Kinetic resolution of (R,S)-ethyl 2-hydroxyl-4-phenylbutyrate via lipase-catalyzed hydrolysis and transesterification in isoctane.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.28, 65-69, 2004.

7 Referências Bibliográficas

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.16, 53 – 58, 2001.

KASCHE, V.; SCHLOTHAUER, R.; BRUNNER, G. **Enzyme denaturation in supercritical CO₂: stabilization effects of S-S Bonds during depressurization step.** Biotechnology Letters, v.10, 569-574, 1988.

KNEZ, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases.** Journal of Supercritical Fluids, v.14, 17-29, 1998.

KNEZ, Z.; HABULIM, H. **Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review.** Journal of Supercritical Fluids, v. 23, 29-42, 2001.

KONTKANEN, H.; TENKANEN, M.; FAGERSTRÖM, R.; REINIKAINEN, T.; **Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations.** Journal of Biotechnology, v.108, 51-59, 2004.

KUMAR, R.; MADRAS, S.; MADAK, J. **Enzimatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide.** Industrial Engeneering and Chemical Research, v.43, 1568-1573, 2004.

LANZA, M. **Comportamento de fases dos óleos de oliva, soja e mamona em n-butano e propano a alta pressão,** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.

LANZA M.; NDIAYE P. M.; TAVARES F. W.; OLIVEIRA D.; DARIVA C.; OLIVEIRA J. V. **Phase behavior of castor oil in compressed propane and n-butane,** Journal of Supercritical Fluids, v.34, 215-221, 2005.

7 Referências Bibliográficas

LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. **Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease.** *JAOCS*, v.79, 191-195, 2002.

LEHNINGER, A.L. **Mitochondria and calcium ion transport.** *Biochemical Journal*, v.119(2), 129-138, 1970.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** 2ªed., São Paulo. Editora Sarvier, 1995.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos.** Vol. 3, 1ª ed, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 594p., 2001.

LOZANO P.; DE DIEGO T.; CARRIE D.; VAULTIER M.; IBORRA J. L. **Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis.** *Biotechnology Letters*, v.23, 1529–33, 2001.

MAHADIK, N. D. et al. **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation.** *Process Biochemistry*, v.38, n.5, 715-721, 2002.

MAIA, M. M. D. et al. **Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation.** *Bioresource Technology*, v.76, n1, 23-27, 2001.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HIL, C. G.; AMUNDSON, C. H. **Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.67; 890-910, 1990.

MARIA, P. D.; MARTINEZ-ALZAMORA, F.; MORENO, S. P.; VALERO, F.; RUA, M. L.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; ALCÁNTARA, A. R. **Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, 283-288, 2002.

7 Referências Bibliográficas

MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAICK, S.N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.10, 248–268, 2006.

NDIAYE, P. M., LANZA, M., TAVARES, F.W., DARIVA, C., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V. **Phase behavior of olive and soybean oils in compressed propane and n-butane.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 23, 405-415, 2006a.

NDIAYE, P. M.; FRANCESCHI, E.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; TAVARES, F. W.; OLIVEIRA, J. V. **Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures.** Journal of Supercritical Fluids, v.37, 29-37, 2006b.

NEGISHI, S.; SHIRASAWA, S.; ARAI, Y.; SUZUKI, J.; MUKATAKA, S. **Activation of powdered lipase by cluster water and the use of lipase powders for commercial esterification of food oils.** Enzyme and Microbial Technology, v.32, 66-70, 2003.

NOVO NORDISK. **Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions.** Relatório interno da Novo Nordisk, A-05948, 1992.

OLIVEIRA, D. e ALVES, T.L.M. **Enzymatic alcoholysis of palm and palm kernel oils.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.77-79, 835-844, 1999.

OLIVEIRA, D. e ALVES, T.L.M. **A Kinetic Study of Lipase Catalyzed Alcoholysis of Palm Kernel Oil.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.84-86, 59-68, 2000.

OLIVEIRA, D. **Estudo Comparativo da Produção Enzimática de Ésteres a partir de Óleos Vegetais em Solvente Orgânico e CO₂ Supercrítico.** Tese

7 Referências Bibliográficas

de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. **Kinetics of the enzymatic alcoholysis palm kernel oil in supercritical CO₂**. Industrial and Engineering Chemistry Research, v.39, 4450-4454, 2000.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO₂**. The Journal of Supercritical Fluids, v.19, 141-148, 2001.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA J. V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids**. Journal of Supercritical Fluids, v.38, 373–382, 2006a.

OLIVEIRA D.; FEHRMANN A. C.; DARIVA C.; CUNHA A. G.; BEVILAQUA J. V.; DESTAIN J.; OLIVEIRA J. V.; FREIRE D. M. G. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymati, v.39, 117-123, 2006b.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. **Lipases de Látex vegetal: propriedades e aplicações industriais**. Química Nova, v.29, n.1, 93-99, 2006.

PATEL, R.N. **Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals**. Enz. Microbial Technol, v. 31, 804-826, 2002.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth**. Process Biochemistry, v.38, 1077-1082, 2003.

PRIMO M. S.; CENI G. C.; MARCON N. S.; ANTUNES O. A. C.; OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J. V. *et al.* **Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves**. Journal of Supercritical Fluids, v.43, 283–290, 2007.

7 Referências Bibliográficas

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M. e POLING, B. E. **The Properties of Gases and Liquids**. McGraw-Hill Book Company, Fourth Edition, 1987.

SCRIBAN, E. **Biotecnologia**. Editora Malone: São Paulo. 498p., 1985.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. **Improvement in lipase catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, 97-103, 2003.

SUBRAMANIAM, B.; McHUGH, M. **Reactions in supercritical fluids – a review**. *Ing. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, v.25, 1-12, 1988.

TREICHEL H.; OLIVEIRA D.; MAZUTTI M.A.; DI LUCCIO M.; OLIVEIRA V.J. **A review on Microbial Lipases production**. *Food and Bioprocess Technology*, v.3, 182-196, 2010.

VILLENEUVE P., MUDERHWA J.M., GRAILLE J., HAAS M.M. **Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.9, 113-148, 2000.

WEEMAES, C.; LUDIKHUYZE, L.; BROECK, I; VAN DEN & HENDRICKX, M. **High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases**. *Journal of Food Science*, v.63(5), 873-877, 1998.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 444p., 1991.

YU, Z.; RIZVI, S.H. e ZOLLWEG, J.A. **Enzymatic esterification of fatty acid mixtures from milk fat and anhydrous milk fat with canola oil in supercritical carbon dioxide**. *Biotechnology Progress*, v.8, 421p, 1993.

7 Referências Bibliográficas

ZAKS, S.E.; KLIBANOV, A.M. **Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures?** Biochemistry, 5432p, 1986.