

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASES IMOBILIZADAS EM  
FLUIDOS PRESSURIZADOS**

**ANDRESA CARLA FEHRMANN**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado 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**

**MARÇO DE 2005**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASES IMOBILIZADAS EM  
FLUIDOS PRESSURIZADOS

**ANDRESA CARLA FEHRMANN**

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado 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:

---

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.  
Orientador

---

Débora de Oliveira, D. Sc.  
Orientadora

---

Denise Maria Guimarães Freire, D. Sc.

---

Cláudio Dariva, D. Sc.

Erechim, 23 de março de 2005.

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.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Débora e ao Vladimir pela motivação, pelo incentivo e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao Dariva pela imensa ajuda.

As amigas Jô, Ieda, Claudia e Geci, pelas conversas, pelo ombro amigo, pelas festas e jantinhas.

Aos colegas: Cacá, Elton, Jonathan, Papa, e todo pessoal do Laboratório de Termodinâmica, pela ajuda e amizade.

À INTECNIAL pelo apoio financeiro.

Aos professores do Curso de Engenharia de Alimentos e do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos.

A todos os outros que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho

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

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASES IMOBILIZADAS EM FLUIDOS PRESSURIZADOS

Andresa Carla Feihmann

Março/2005

Orientadores: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

O uso de enzimas como catalisadores, especialmente as lipases, é uma importante área de pesquisa na modificação de óleos e gorduras e fabricação de produtos com alto valor agregado. O uso de fluidos comprimidos como meio de reação tem sido intensamente pesquisado devido às propriedades favoráveis de transporte destes fluidos, que podem acelerar a transferência de massa das reações enzimáticas, facilitar a separação e a recuperação de produtos e/ou reagentes. O dióxido de carbono, propano e n-butano aparecem como meios alternativos podendo substituir os solventes orgânicos líquidos. O presente trabalho investigou a influência da temperatura (35-75°C), tempo de exposição a alta pressão (1-6h), taxa de despressurização ((10-200[kgm<sup>-3</sup>min<sup>-1</sup>]) para CO<sub>2</sub> ou 2-50 bar/min para propano e n-butano), densidade reduzida (0,5-1,6) para CO<sub>2</sub> e pressão (30-250 bar) para propano e n-butano, na atividade de três lipases imobilizadas, duas comerciais - Lipozyme IM e Novozym 435 e a lipase de *Yarrowia lipolytica*. Para o CO<sub>2</sub> os resultados mostraram perda de atividade para as três enzimas. Em propano e n-butano as enzimas Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica* apresentaram perda de atividade inferior a 10% e a Novozym 435 apresentou aumento de atividade de até 21% em n-butano.

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

## ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF PROCESS VARIABLES ON LIPASE ACTIVITY IN COMPRESSED FLUIDS

Andresa Carla Feihmann

Março/2005

Advisors: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

The use of enzymes as catalysts, especially lipases is becoming important in many research areas such as the modification of oils and fats, in the production of high-value added products from thermo sensitive substrates, etc. The advantages of using compressed or near critical fluids over liquid organic solvents as reaction media has been a matter of intense research due to their favorable transport properties that can accelerate mass-transfer limited enzymatic reactions, ease of separation, recovery of products or reactants and reduction in side reactions. Among some interesting substances, carbon dioxide, propane and n-butane appear to be promising as alternative media to conventional organic solvents. In this sense, the present work investigates the influence of temperature (35-75°C), exposure times (1 to 6h), decompression rate, 10-200Kg.m<sup>-3</sup>.min<sup>-1</sup> for carbon dioxide and 2-50 bar.min<sup>-1</sup> for both propane and n-butane, reduced density, in the range of 0.5-1.6 for carbon dioxide and from 30 to 250 bar for propane and n-butane, on the activity of three immobilized lipases, two commercial ones - Lipozyme IM and Novozym 435, and a lipase from *Yarrowia lipolytica*. For carbon dioxide, results show activity losses for all the three enzymes. Conversely, in propane and n-butane media, the enzymes Lipozyme IM and a lipase from *Yarrowia lipolytica* presented an activity loss lower than 10% and for Novozym 435 an increase up to 21% was verified.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Introdução .....	4
2.2 Lipases.....	5
2.2.1 Características.....	5
2.2.2 Atividade enzimática.....	6
2.2.3 Enzimas imobilizadas.....	7
2.2.4 Aplicações.....	8
2.3 Fluidos pressurizados .....	10
2.4 Enzimas em fluidos pressurizados.....	12
2.4.1 Efeito da pressão nas enzimas.....	14
2.4.2 Efeito da água em fluidos pressurizados.....	15
2.4.3 Efeito do tipo de suporte.....	17
2.4.4 Efeito do solvente sobre as enzimas.....	18
2.4.5 Termoestabilidade de enzimas em fluidos pressurizados.....	21
2.5 Considerações Finais.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material .....	23
3.1.1 Enzimas.....	24

3.2 Métodos .....	26
3.2.1 Método para determinação da atividade enzimática de lipases.....	26
3.3 Procedimento experimental.....	28
3.4 Planejamento de experimentos e análise estatística .....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Testes preliminares.....	34
4.2 Atividade enzimática das lipases em CO <sub>2</sub> pressurizado .....	36
4.3 Atividade enzimática das lipases em propano pressurizado .....	46
4.4 Atividade enzimática das lipases em n-butano pressurizado .....	54
4.5 Determinação da influência do número de ciclos de pressurização/ despressurização na atividade da lipase Novozym 435.....	62
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	67
5.1 Conclusões .....	67
5.2 Sugestões para trabalhos futuros .....	68
REFERÊNCIAS.....	69

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 2.1 Esquema das principais reações enzimáticas de interesterificação.....	9
Figura 2.2 Diagrama de fases de um composto puro.....	11
Figura 3.1 Amostra da lipase Lipozyme IM.....	24
Figura 3.2 Amostra da lipase Novozym 435.....	25
Figura 3.3 Amostra da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	26
Figura 3.4 Foto do equipamento utilizado para medida de atividade.....	27
Figura 3.5 Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.....	29
Figura 3.6 Foto da unidade utilizada nos experimentos.....	30
Figura 3.7 Foto do reator utilizado nos experimentos.....	30
Figura 4.1 Atividade da enzima Lipozyme IM em estufa a 40°C.....	35
Figura 4.2 Perda de atividade experimental e calculada para a Lipozyme IM em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	39
Figura 4.3 Perda de atividade experimental e calculada para a Novozym 435 em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	41
Figura 4.4 Perda de atividade experimental e calculada para a lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	44
Figura 4.5 Mudança na atividade enzimática para as lipases submetidas a CO <sub>2</sub> pressurizado.....	44
Figura 4.6 Perda de atividade experimental e calculada para a Lipozyme IM em propano pressurizado.....	48
Figura 4.7 – Ganho de atividade experimental e calculada para a lipase Novozym 435 em propano pressurizado.....	50

Figura 4.8 Perda de atividade experimental e calculada para a lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> em propano pressurizado.....	52
Figura 4.9 Mudança na atividade enzimática para as lipases submetidas a propano pressurizado.....	53
Figura 4.10 Perda de atividade experimental e calculada para a Lipozyme IM em n-butano pressurizado.....	56
Figura 4.11 Ganho de atividade experimental e calculada para a Novozym 435 em n-butano pressurizado.....	59
Figura 4.12 Perda de atividade experimental e calculada para a lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> em n-butano pressurizado.....	61
Figura 4.13 Mudança na atividade enzimática para as lipases submetidas a n-butano pressurizado.....	61
Figura 4.14 Mudança na atividade enzimática da lipase Lipozyme IM em três solventes pressurizados.....	65
Figura 4.15 Mudança na atividade enzimática da lipase Novozym 435 em três solventes pressurizados.....	66
Figura 4.16 Mudança na atividade enzimática da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> em três solventes pressurizados.....	66

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3.1 Características dos solventes utilizadas.....	23
Tabela 3.2 Propriedades críticas dos solventes utilizados neste trabalho.....	23
Tabela 3.3 Intervalo de estudo das variáveis.....	32
Tabela 3.4 Matriz experimental empregada no estudo da atividade de lipases em CO <sub>2</sub> a alta pressão.....	33
Tabela 4.1 Estudo do melhor tempo de ativação da Lipozyme IM em estufa a 40C.....	35
Tabela 4.2 Perda de atividade enzimática da Lipozyme IM submetida a CO <sub>2</sub> pressurizado.....	37
Tabela 4.3 Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da Lipozyme IM em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	38
Tabela 4.4 Perda de atividade enzimática da Novozym 435 submetida a CO <sub>2</sub> pressurizado.....	40
Tabela 4.5 Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da Novozym 435 em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	41
Tabela 4.6 Perda de atividade enzimática da <i>Yarrowia lipolytica</i> submetida a CO <sub>2</sub> pressurizado.....	42
Tabela 4.7 Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	43
Tabela 4.8 Perda de atividade enzimática da Lipozyme IM submetida a propano pressurizado.....	47
Tabela 4.9 Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da Lipozyme IM em propano pressurizado.....	48

Tabela 4.10 Ganho de atividade enzimática da Novozym 435 submetida a propano pressurizado.....	49
Tabela 4.11 Resultados da regressão relacionados ao ganho de atividade da Novozym 435 em propano pressurizado.....	50
Tabela 4.12 Perda de atividade enzimática da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> submetida a propano pressurizado.....	51
Tabela 4.13 Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> em propano pressurizado.....	52
Tabela 4.14 Perda de atividade enzimática da Lipozyme IM submetida ao n-butano pressurizado.....	55
Tabela 4.15 Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da Lipozyme IM em n-butano pressurizado.....	56
Tabela 4.16 Ganho de atividade enzimática da Novozym 435 submetida a n-butano pressurizado.....	57
Tabela 4.17 Resultados da regressão relacionados ao ganho de atividade da Novozym 435 em n-butano pressurizado.....	58
Tabela 4.18 Perda de atividade enzimática da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> submetida a n-butano pressurizado.....	59
Tabela 4.19 Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> em n-butano pressurizado.....	60
Tabela 4.20 Atividade da Novozym 435 após sucessivos ciclos de pressurização/despressurização em propano e n-butano (T= 75°C; P= 250 bar; t= 1h e R= 2 bar/min).....	63
Tabela 4.21 Compilação geral dos resultados de maior perda ou ganho de atividade para cada solvente estudado.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

Cerca de dois terços da produção mundial de óleos e gorduras são destinados ao consumo humano e animal. A produção restante é usada em uma ampla variedade de aplicações industriais. Com base nestes aspectos, tem surgido um grande interesse na transformação biotecnológica de óleos e gorduras, visando a utilização destas matérias-primas na produção de compostos de alto valor agregado, de uso potencial na indústria farmacêutica, de alimentos e oleoquímica, entre outras. Entre os processos mais promissores para modificação de lipídios estão as reações de hidrólise, síntese de ésteres e transesterificação destes materiais na presença de catalisadores químicos (ácidos e bases) ou enzimáticos (KAUFMAN e RUEBUSCH, 1990).

Mais de 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente utilizam hidrolases (proteases, carbohidrolases e lipases), sendo que 5 -10% cabem às lipases (GANDHI, 1997). Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. As lipases são amplamente encontradas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. Estas enzimas apresentam grande versatilidade de propriedades tais como resistência a pH, termoestabilidade, resistência a solventes orgânicos, especificidade, regioseletividade e estereosseletividade (SHARMA *et al.*, 2001).

A crescente ênfase no uso de biocatalisadores devido as suas propriedades favoráveis, tais como condições amenas e ambientalmente compatíveis de reação e sua alta especificidade, têm resultado num aumento do uso de enzimas imobilizadas, pois as interações entre o suporte e a enzima podem alterar favoravelmente as propriedades físicas e químicas da enzima (BASRI *et al.*, 1996). Segundo CARVALHO *et al.* (2003) o interesse em utilizar estes biocatalisadores na modificação estrutural de óleos e gorduras tem recebido considerável atenção devido, principalmente, a sua especificidade em relação ao substrato.

O emprego de gases pressurizados como solventes, em particular o CO<sub>2</sub> ou fluidos em condições próximas ao seu ponto crítico, é bastante recente na área de biotecnologia. A catálise enzimática em CO<sub>2</sub> supercrítico apresenta interesse

particular para indústrias farmacêuticas e de alimentos, pois o CO<sub>2</sub> é um solvente atóxico, não inflamável e de baixo custo. Além disso, sua temperatura crítica (31,3°C) é suficientemente baixa para o processamento de materiais termolábeis e condiz com as temperaturas ótimas típicas para reações enzimáticas (SIVIK e GUNNLAUGSDOTTIR, 1995). Outras vantagens do uso de enzimas em fluidos pressurizados incluem: as solubilidades dos materiais são aumentadas relativamente à água, a termoestabilidade de biomoléculas em fluidos pressurizados é maior que na água e existe a possibilidade de reciclagem do solvente (KAMAT *et al.*, 1995).

Neste sentido, tornam-se necessários estudos mais rigorosos no que tange à utilização de solventes alternativos que possam oferecer condições mais amenas de trabalho. Destaca-se a utilização de propano e n-butano, quer seja como líquido comprimido ou no estado supercrítico, podendo estes serem substitutos de uma variedade de solventes orgânicos e do próprio dióxido de carbono empregado como solvente de sistemas reativos. Em sistemas com óleos vegetais, estes gases têm como principais vantagens as baixas pressões de transição encontradas, devido à maior solubilidade quando comparada àquela em CO<sub>2</sub> (LANZA, 2004).

Trabalhos pioneiros como os de RANDOLPH *et al.* (1985); HAMMOND *et al.* (1985) e NAKAMURA *et al.* (1985) mostraram a importância de estudar a atividade e a estabilidade de enzimas em meios alternativos. O que motivou a realização destes trabalhos foi o fato de que as enzimas podem reter sua atividade e estabilidade em meios não aquosos. Conseqüentemente, elas podem ser usadas para catalisar reações em solventes orgânicos e outros meios não convencionais.

Vários autores tentaram desvendar o mecanismo detalhado do comportamento das enzimas em solventes pressurizados, mas as conclusões foram contraditórias. Alguns declaram que as enzimas perdem sua atividade durante a reação por causa da pressurização, outros alegam que é o passo de despressurização o fator relevante na perda de atividade das enzimas (OLIVEIRA, 1999).

A maior parte dos autores, como OLIVEIRA e OLIVEIRA (2000 e 2001), avaliou o efeito da pressão na atividade enzimática através do estudo de um sistema reacional completo com substrato, produtos, enzima e solvente. Neste caso, a complexidade é muito grande, pois os substratos e solventes envolvidos no

processo, bem como as condições experimentais correspondentes podem também, de alguma forma, afetar a atividade das enzimas. Por outro lado, poucos autores como STEINBERGER *et al.* (1999); GAMSE e MARR (2000); HABULIN *et al.* (2004) e LANZA *et al.* (2004) avaliaram o efeito da pressão em sistemas contendo apenas enzima e solvente.

Conforme as perspectivas citadas anteriormente, e ciente de que o estado da arte revela flagrante lacuna referente a estudos relacionados à atividade de enzimas a altas pressões em sistemas contendo apenas enzima-solvente, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência das variáveis temperatura, tempo de exposição, taxa de despressurização e densidade reduzida ou pressão na atividade de lipases submetidas a altas pressões. Foram investigados os seguintes biocatalizadores: lipases imobilizadas comerciais Lipozyme IM e Novozym 435 (Novozymes Brasil/Araucária-PR) e a não-comercial de *Yarrowia lipolytica*, submetidas aos solventes CO<sub>2</sub>, propano e n-butano a altas pressões. Os resultados desta avaliação poderão se constituir em importante subsídio à utilização destes biocatalisadores na realização de reações de modificação de óleos e gorduras em fluidos comprimidos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta uma breve explanação sobre o contexto no qual o trabalho se insere bem como a relevância do mesmo. A seguir, é apresentada uma revisão sobre lipases, evidenciando as características deste tipo de enzima. Posteriormente, ressalta-se o estado da arte referente à aplicação de fluidos pressurizados como solventes em reações enzimáticas.

### 2.1 Introdução

Os lipídios são uma importante matéria-prima para as indústrias química, farmacêutica e de alimentos, com uma produção mundial de óleos e gorduras de aproximadamente 117 milhões de toneladas em 2001.

Um crescente interesse na modificação de óleos e gorduras tem sido verificado nos últimos anos. Esta tendência pode ser principalmente atribuída ao fato de que os oleoquímicos (substâncias derivadas das gorduras e dos óleos naturais) são obtidos de fontes renováveis, podendo, portanto, ser produzidos em muitos países. Além disso, a crescente disponibilidade de óleos e gorduras nos países desenvolvidos tem estimulado tanto a pesquisa fundamental quanto a aplicada, na direção da produção de produtos alternativos de alto valor agregado derivados de lipídios (MALCATA *et al.*, 1990).

Entre os processos mais promissores para modificação de lipídios estão as reações de hidrólise, síntese de ésteres e transesterificação destes materiais na presença de catalisadores químicos (ácidos e bases) ou enzimáticos (KAUFMAN e RUEBUSCH, 1990).

Ciente de que a literatura aberta evidencia a carência de estudos relacionados à atividade de enzimas a altas pressões em sistemas contendo apenas enzima-solvente, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes solventes pressurizados na atividade de lipases imobilizadas.

## 2.2 Lipases

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Antigamente, elas eram predominantemente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (FROST e MOSS, 1987). Atualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microrganismos devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção. Em geral, os microrganismos mais utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor*.

### 2.2.1 Características

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos (MACRAE e HAMMOND, 1985).

As lipases encontram-se largamente distribuídas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. Apresentam peso molecular entre 20.000-60.000 daltons. São glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente porque, além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento à partir do meio fermentativo são, geralmente, mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (CARVALHO *et al.*, 2003).

Estas enzimas são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. A maioria das lipases apresenta sua atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40°C. Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (MACRAE e HAMMOND, 1985).

A especificidade é uma característica importante das lipases. De forma geral, quatro tipos de especificidades podem ser definidas. A primeira é a especificidade em relação à classe de lipídios. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo, tri-, di- ou monoglicerídeo, colesterol éster, metil éster, etc. A segunda é a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereoespecificidade, ou seja, algumas lipases catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereoisômeros (van DER PADT, 1993).

### 2.2.2 Atividade enzimática

Em proteínas, quatro níveis de estruturas podem ser distinguidas. A estrutura primária é definida como a seqüência de aminoácidos e pontes de sulfeto (se existirem), dando uma completa descrição das ligações covalentes da proteína. Já a estrutura secundária, refere-se às formas de cadeias polipeptídicas,  $\alpha$ -hélices (as ligações peptídicas assumem uma forma helicoidal) ou  $\beta$ -hélices (um segmento da cadeia polipeptídica interage com outra paralelamente por ligações de hidrogênio intra ou inter-molecular). A estrutura terciária pode ser descrita como uma estrutura secundária que apresenta configuração tridimensional devido às interações não-covalentes entre os aminoácidos das cadeias polipeptídicas; porém, é constituída por apenas uma unidade de cadeia polipeptídica. A estrutura quaternária refere-se ao arranjo espacial das sub-unidades, ligadas por ligações não-covalentes (HENDRIX *et al.*, 1998).

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 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 frequência das colisões entre o substrato e a enzima; de outro, a desnaturação da proteína enzimática. Esta desnaturação vai modificar a estrutura terciária e a 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.

### 2.2.3 Enzimas imobilizadas

Uma das grandes vantagens da catálise em meio não aquoso é que as enzimas são insolúveis em praticamente todos os solventes orgânicos. Contudo, quando enzimas livres estão suspensas em um solvente orgânico, elas tendem a agregar-se e prendem-se às paredes do reator, principalmente quando água é adicionada a este sistema para aumentar a atividade enzimática. Este problema pode ser solucionado através da imobilização de enzimas em suportes sólidos. A imobilização da enzima também pode minimizar o efeito desnaturante de muitos solventes orgânicos sobre a maioria das enzimas, através de um material hidrofílico, que permite a manutenção de um microambiente de alta atividade de água em torno das moléculas de enzima (ILLANES, 1994).

A imobilização geralmente aumenta a estabilidade térmica e química da lipase, podendo aumentar a resistência aos efeitos desnaturantes de vários solventes, permitindo um melhor controle do processo e da qualidade do produto (MALCATA *et al.*, 1990). A aplicação de enzimas imobilizadas como catalisadores de reações envolvendo triglicerídeos apresenta, desta forma, 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.

As enzimas imobilizadas suportam temperaturas mais elevadas. Segundo o fabricante (Novozymes Brasil/ Araucária-PR), em relação à temperatura para as enzimas comerciais Lipozyme IM e Novozym 435, os valores ótimos de atividade e estabilidade, em geral, situam-se na faixa de 30-70°C (NOVO NORDISK, 2001).

#### 2.2.4 Aplicações

O potencial de aplicação de lipases em processos biotecnológicos para a modificação de óleos e gorduras tem sido objeto de grande interesse nos meios acadêmico e industrial nos últimos anos (PRAZERES *et al.*, 1993). 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.

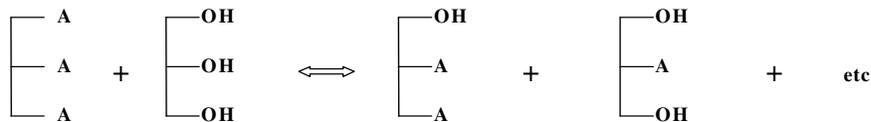
A reação de esterificação entre polióis e ácidos graxos livres é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise do glicerídeo correspondente. As velocidades relativas da reação direta (hidrólise) e inversa (esterificação) são usualmente controladas pela atividade de água da mistura reacional. Exemplos 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 (Figura 2.1). 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 hidrólise indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça totalmente ativa (MALCATA *et al.*, 1990).

#### Acidólise



#### Alcoólise (Glicerólise)



#### Transesterificação

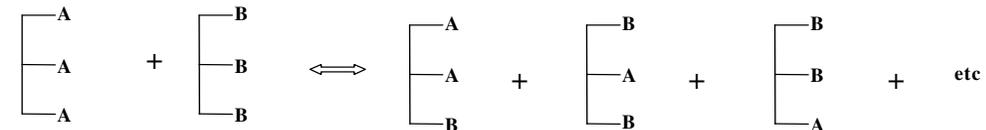


Figura 2.1 – Esquema das principais reações enzimáticas de interesterificação.

A distribuição dos triglicerídeos resultantes da interesterificação é controlada através da concentração relativa de espécies doadoras de grupo acil presentes, permitindo a predição da concentração de cada triglicerídeo no equilíbrio. As reações de interesterificação são utilizadas para alterar as propriedades físico-químicas de um óleo ou gordura de maneira desejada (MALCATA *et al.*, 1990).

A ação de lipases sobre ligações éster tem sido estudada e realizada em diferentes sistemas e contextos, com o intuito de explorar as vantagens deste

catalisador natural. Regioseletividade, estereoespecificidade, especificidade pelo substrato e baixo consumo de energia são algumas das características que fazem com que os processos catalisados por lipases se tornem mais atrativos do que os processos convencionais não enzimáticos (PRAZERES *et al.*, 1993).

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de otimizar os processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por lipases. Entre tais estudos, ressalta-se a utilização de meios não convencionais, imobilização da enzima, estudos cinéticos e de estabilidade da enzima, modificações químicas e desenvolvimento de bioreatores.

### **2.3 Fluidos pressurizados**

O emprego de solventes pressurizados, em particular o CO<sub>2</sub> supercrítico, é bastante recente na área de biotecnologia (SIVIK e GUNNLAUGSDOTTIR, 1995). A expressão “supercrítico” refere-se ao fato de que uma substância se encontra em uma condição de temperatura e pressão acima dos valores críticos. A temperatura crítica de uma substância é definida como a temperatura acima da qual uma substância pura não pode ser liquefeita, independentemente da pressão aplicada. Por conseguinte, a pressão crítica é definida como a pressão de vapor do gás na temperatura crítica. Isto é bem ilustrado na Figura 2.2 que claramente mostra a correspondência da região do fluido supercrítico com os estados sólido, líquido e gasoso. As curvas representam condições onde duas fases coexistem, e, no ponto triplo, as três fases coexistem. No ponto crítico, as fases gasosa e líquida tornam-se idênticas, isto é, só uma fase existe (ALMEIDA FILHO, 2003).

A aplicação de solventes em condições supercríticas é baseada na observação experimental da característica que muitos gases apresentam, de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (Mc HUGH e KRUKONIS, 1994). Nestas condições, passa-se diretamente

do estado gasoso ao estado supercrítico, onde as propriedades do fluido são intermediárias entre a do estado líquido e a do gasoso (HOYER, 1985). No caso do  $\text{CO}_2$ , o ponto crítico é alcançado sobre a curva líquido-gás à temperatura de  $31,3^\circ\text{C}$  e pressão aproximadamente igual a 73 atm.

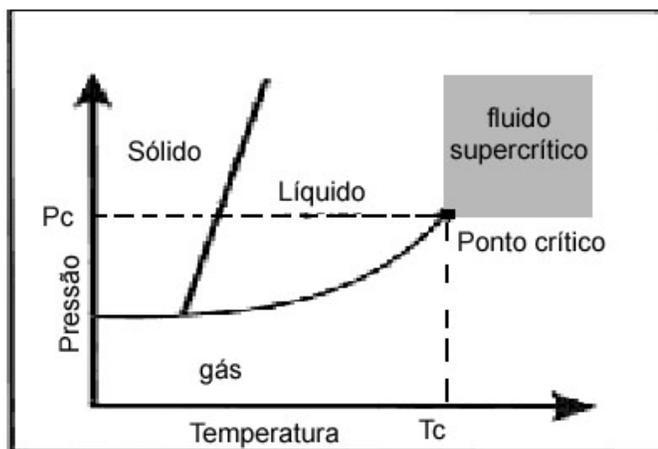


Figura 2.2- Diagrama de fases de um composto puro.

A combinação das propriedades das fases líquida e vapor, característica do estado supercrítico ocorre de uma forma extremamente vantajosa para a utilização dos fluidos supercríticos (FSC) como solventes. O FSC possui densidade próxima a do líquido, o que fortalece as suas propriedades de solvente. Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte bastante favoráveis ao processo. Todas estas propriedades singulares fazem dos FSC meios bastante interessantes para reações químicas e enzimáticas (OLIVEIRA, 1999).

A catálise enzimática em  $\text{CO}_2$  supercrítico apresenta interesse particular para indústrias farmacêuticas e de alimentos, pois o  $\text{CO}_2$  é um solvente atóxico, não inflamável e de baixo custo. Além disso, sua temperatura crítica ( $31,3^\circ\text{C}$ ) é suficientemente baixa para o processamento de materiais termolábeis e condiz com as temperaturas ótimas típicas para reações enzimáticas (SIVIK e GUNNLAUGSDOTTIR, 1995).

Existe uma infinidade de aplicações possíveis dos gases pressurizados e, possivelmente, um maior conhecimento das características e do comportamento dos solventes utilizados nestas operações, significaria aprimoramento destas aplicações.

## 2.4 Enzimas em fluidos pressurizados

A aplicação de enzimas em fluidos pressurizados, apesar de apresentar boas perspectivas, ainda não tem sido extensivamente estudada. Reações que representam especial interesse são as reações enzimáticas em condições supercríticas, abrindo a possibilidade da utilização dos fluidos supercríticos em uma nova área, a biotecnologia (OLIVEIRA, 1999).

Como trabalhos pioneiros nesta área, pode-se citar os de RANDOLPH *et al.* (1985); HAMMOND *et al.* (1985) e NAKAMURA *et al.* (1985), que a partir de 1985 começaram a estudar a atividade e estabilidade de enzimas em meio supercrítico. O que motivou a realização destes trabalhos foi o fato de que as enzimas podem reter sua atividade e estabilidade em meios não aquosos. Conseqüentemente, elas podem ser usadas para catalisar reações em solventes orgânicos e outros meios não convencionais.

Os fluidos supercríticos começaram então a ser examinados como meio potencial para a catálise enzimática. O uso de solventes não aquosos para reações enzimáticas são atrativos por várias razões. Uma enzima em um solvente não aquoso pode possuir interações solvente/enzima similares àquelas de seu meio nativo e, então, mostrar atividade maior quando comparada à água pura. Os substratos podem, também, ser mais solúveis em um solvente não aquoso, fazendo com que as taxas de reação sejam maiores neste tipo de solvente (OLIVEIRA, 1999).

Vários aspectos podem ser considerados para se compreender as contribuições que o uso de fluidos pressurizados pode trazer à biotecnologia, a sua aplicação em reações enzimáticas, o que justifica a realização de pesquisas no

sentido de dominar esse novo processo, em crescente nível de utilização na Europa, Japão e Estados Unidos, como apresentado a seguir (OLIVEIRA, 1999):

- Os métodos convencionais para a produção de compostos, via enzimática, na maioria das vezes, leva à formação de subprodutos indesejáveis que podem ser difíceis de serem separados e recuperados do produto. Quando este processo é realizado via fluido pressurizado, este problema é minimizado, uma vez que os solventes pressurizados, além de exibirem propriedades similares aos solventes orgânicos, ainda possuem a capacidade adicional de facilitar a separação dos produtos após a reação;

- A substituição de um solvente orgânico convencional, tal como o hexano, por um fluido supercrítico, resultará em taxas de transferência de massa maiores devido à maior difusividade nos fluidos supercríticos;

- O uso de fluidos supercríticos como solventes em reações enzimáticas, além das vantagens já citadas, permite, também, o controle das variáveis que conduzem a reação, regeneração do catalisador, controle da taxa de reação e controle da distribuição do produto.

Assim, como no processo de extração, os principais atrativos do uso de fluidos supercríticos como meios para reações enzimáticas incluem sua maior difusividade (RUSSEL e BECKMAN, 1991) e menor viscosidade que a dos solventes líquidos, suas propriedades de solvente dependentes da pressão e temperatura próximas do ponto crítico e a simplificação potencial das etapas de separação e recuperação.

Muitas reações têm sido estudadas nesta área, incluindo a oxidação de fenóis pela polifenol oxidase (HAMMOND *et al.*, 1985), a conversão de *p*-nitrofenilfosfato a *p*-nitrofenol por uma fosfatase alcalina (RANDOLPH *et al.*, 1988) e a síntese de precursores do aspartame pela termolisina (KAMIHIRA *et al.*, 1987). As classes de reações estudadas mais extensivamente em fluidos supercríticos, contudo, têm sido a esterificação e transesterificação catalisadas por lipases. Taxas de reação em CO<sub>2</sub> supercrítico e em solventes orgânicos (tipicamente, hexano) têm sido comparadas (PASTA *et al.*, 1989; MARTY *et al.*, 1990 e 1992; KAMAT *et al.*, 1992; OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2000 e 2001). Através da observação dos trabalhos apresentados na literatura relacionados ao emprego de fluidos supercríticos, pode-se salientar que a

realização de reações enzimáticas em condições supercríticas constituem uma nova oportunidade para a biotecnologia.

### 2.4.1 Efeito da pressão nas enzimas

Quando se utiliza fluidos pressurizados, a pressão encontra-se acima da pressão atmosférica, sendo o efeito intrínseco da pressão nas enzimas um importante parâmetro. Pode-se analisar o efeito da pressão na conformação da enzima (estabilidade) e nas propriedades físicas do fluido pressurizado. O uso de fluidos pressurizados está relacionado às altas pressões e esta variável pode, de alguma forma, afetar as enzimas.

PENNISTON (1971) observou que em sistemas aquosos, pressões abaixo de 1000 bar não apresentam efeito significativo na atividade enzimática. A atividade de enzimas monoméricas aumenta com o aumento da pressão enquanto enzimas multiméricas perdem atividade com o aumento da pressão. Os grupos de Blanch e Chark (RANDOLPH *et al.*, 1988), usando espectroscopia de ressonância magnética a alta pressão, não observaram qualquer mudança significativa na estrutura da colesterol oxidase em misturas de CO<sub>2</sub> –co-solvente a 35°C entre 1bar e 113 bar. AFFLECK *et al.* (1994) mostraram não haver mudança conformacional considerável na subtilisina a 700 bar em n-hexano. Em contraste, estudos recentes usando espectroscopia de fluorescência mostraram que a tripsina sofreu uma mudança conformacional em CO<sub>2</sub> supercrítico durante a despressurização. Contudo, nenhum dado de atividade foi reportado para determinar os efeitos de tais mudanças estruturais (OLIVEIRA, 1999).

A hipótese mais aceita com relação à perda de atividade enzimática em meio supercrítico sugere que a taxa de despressurização do CO<sub>2</sub> supercrítico e o conteúdo de água do solvente têm um efeito direto na taxa de desnaturação e que enzimas que contêm pontes de dissulfeto são menos propensas à desnaturação. TANAGUCHI *et al.* (1987) examinaram o efeito do CO<sub>2</sub> supercrítico em 9 enzimas comerciais à 35°C e 203 bar. Após 1 hora de exposição, os autores não observaram perda na atividade das enzimas. Além disso, nenhuma mudança significativa na

estabilidade foi observada após a adição de 0,1% de água e 3% de etanol. Contudo, a atividade da lipase foi reduzida em 20% quando tratada com 0,1% de água e 6% de etanol. Os autores também concluíram que a lipase associada com 50% (em peso) de água perdeu 2/3 de sua atividade original após exposição em CO<sub>2</sub> supercrítico. Em contrapartida, KASCHE *et al.* (1988) mostraram que a atividade de algumas enzimas foi adversamente afetada pela despressurização.

STEINBERGER *et al.* (1999) avaliaram o efeito isolado da despressurização em sistemas contendo CO<sub>2</sub>-esterase (EP10) e CO<sub>2</sub>-lipase (*Aspergillus niger*) a 35°C e 150 bar. Após a realização de ciclos consecutivos de pressurização/despressurização, a atividade residual das duas enzimas foi determinada. No final deste procedimento, a lipase manteve 92,2±9,3% de sua atividade, enquanto a esterase, 102,3±3,8%, mostrando que a despressurização, isoladamente, não afetou a atividade das enzimas estudadas.

#### 2.4.2 Efeito da água em fluidos pressurizados

Enzimas são inativas na completa ausência de água, mas a quantidade de água necessária para uma enzima ser cataliticamente ativa é surpreendentemente baixa (ZAKS e KLIBANOV, 1985). Em sistemas não aquosos, o teor de água necessário para manter uma enzima na forma cataliticamente ativa é geralmente equivalente à uma monocamada por molécula de enzima. Estas moléculas essenciais de água são ligadas por interações não-covalentes que mantêm a estrutura nativa da proteína. Se as moléculas de água em volta da enzima são perturbadas, a enzima geralmente perde sua atividade.

O meio não aquoso pode retirar a água associada à molécula da enzima e esta tendência depende do tipo de solvente (ZAKS e KLIBANOV, 1985). Solventes mais hidrofílicos apresentam uma tendência maior em retirar a água essencial para a molécula da enzima. Este fato é bem ilustrado pela reação de transesterificação entre metacrilatodemetila (MMA) e 2-etilhexanol catalisada por *Candida cylindracea* em vários solventes orgânicos (KAMAT *et al.*, 1992). A lipase mostrou atividade maior em solventes hidrofóbicos, tais como hexano, comparado com sua atividade

em um solvente hidrofílico, tal como éter butílico. Os autores concluíram que, quando do uso de éter butílico como solvente, a maioria da água disponível foi deslocada da enzima para o solvente.

Este princípio pode também ser aplicado à sistemas envolvendo fluidos supercríticos. Algumas lipases, por exemplo, aumentam sua atividade pela adição de água ao CO<sub>2</sub> supercrítico. A quantidade de água necessária para manter a atividade ótima, contudo, depende do tipo de suporte, no caso de enzimas imobilizadas, do tipo de reação e do solvente utilizado (OLIVEIRA, 1999).

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 cai. 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).

Neste sentido, existem duas maneiras de manter a hidratação da enzima em meio não aquoso. Água pode ser adicionada diretamente ao sistema reacional ou, alternativamente, sais hidratados podem ser adicionados como uma fonte indireta. De acordo com HALLING (1990), em meio não aquoso, a concentração de água é o parâmetro chave a ser considerado.

A adição de água à preparações enzimáticas sólidas pode aumentar a atividade enzimática através do aumento da polaridade e da flexibilidade do sítio ativo da enzima. No entanto, excesso de água facilita a agregação da enzima e pode provocar um decréscimo de sua atividade (YANG e RUSSEL, 1996).

As propriedades físico-químicas exibidas por uma enzima estão relacionadas direta ou indiretamente ao papel da água nas interações não covalentes (eletrostáticas, pontes de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas), as quais ajudam a manter a conformação cataliticamente ativa da enzima (ILLANES, 1994).

A hidratação dos grupos carregados e polares das moléculas da enzima parece ser um pré-requisito para a catálise enzimática. É possível que, na ausência de

água, esses grupos interajam produzindo uma conformação estrutural inativa. A função da água na manutenção da atividade enzimática em meio não aquoso parece estar relacionada com a sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com esses grupos funcionais protegendo, portanto, dieletricamente as interações eletrostáticas entre os grupos ionizados e neutralizando as interações dipolo-dipolo entre unidades peptídicas e grupos vizinhos polares da proteína (LANGONE, 1998).

A remoção de água ligada à proteína aumenta a força das ligações de hidrogênio intramoleculares e das pontes salinas, que estabilizam as proteínas nas suas conformações originais, conferindo-lhes rigidez estrutural. A desnaturação das enzimas através do calor requer ampla mobilidade conformacional, o que envolve água livre. Além disso, a eliminação da água do sistema dificulta a ocorrência de um número de reações químicas indesejáveis, as quais são promovidas através do aumento da temperatura, tais como, reações de hidrólise, de oxidação, de isomerização, entre outras, que promovem a inativação da proteína em soluções aquosas (YANG e RUSSEL, 1996).

### 2.4.3 Efeito do tipo de suporte

A natureza do suporte usado para imobilizar uma enzima tem um importante papel na determinação da partição da água entre enzima, solvente e suporte. Estudos usando enzimas imobilizadas em diferentes suportes têm mostrado grande variação nas concentrações ótimas de água. Por exemplo, lipase (*Candida cylindracea*) imobilizada em Celite 545, necessita de 1ml de água por g de enzima para atividade ótima na síntese de etil oleato a partir de etanol e ácido oléico. A lipase de *Mucor miehei* suportada em Duolite necessita 1% p/p de água para atividade ótima na reação entre trioléina e ácido esteárico, enquanto 0,1g de água por g de suporte foi necessária na esterificação do ácido oléico por etanol (YU *et al.*, 1993).

CARTA *et al.* (1995) estudaram reações de esterificação utilizando lipase de *Candida cylindracea* imobilizada em suporte de nylon em reatores contínuos e em batelada. Os autores verificaram que a enzima imobilizada foi efetiva na síntese de

etilpropionato, isoamilpropionato e isometilbutirato. Utilizando etanol dissolvido em n-hexano como substrato, a velocidade específica máxima de esterificação foi de 0,02 mol/h.g de proteína imobilizada, mas a enzima só se mostrou estável quando a concentração de substrato era inferior a 0,2 molar. Quando álcool isoamílico dissolvido em hexano foi utilizado como substrato, velocidades da ordem de 0,085 mol/h.g de proteína imobilizada foram observadas, além do que a enzima permaneceu estável em concentrações maiores de substrato.

MUSTRANTA *et al.* (1993) utilizaram lipases de *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* e *Pseudomonas fluorescens* imobilizadas em resina de troca iônica e terra diatomácea por adsorção, utilizando tampão ou hexano como solvente. As preparações enzimáticas foram empregadas na esterificação de ácido láurico com diferentes álcoois. Os autores observaram que todas as preparações de enzimas imobilizadas foram capazes de catalisar a síntese de metil, etil e amil lauratos.

ISO *et al.* (2001) compararam o desempenho da lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre e imobilizada na produção de ésteres, usando trioleína e óleo de girassol e propanol e butanol como substratos. Com o uso de propanol e enzima imobilizada a conversão chegou a 100% em 10 horas, enquanto que para a enzima livre obteve-se 90% em 25 horas, a temperatura foi mantida em 50°C. Os autores constataram que para o butanol, a reação teve maior conversão em um menor tempo com o uso de enzima imobilizada.

#### 2.4.4 Efeito do solvente sobre as enzimas

Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de investigar a importância dos solventes pressurizados na estabilidade das enzimas (CATONI *et al.*, 1996; CERNIA *et al.*, 1998; KNEZ e HABULIN, 2001; LANZA *et al.*, 2004; STEINBERGER *et al.*, 1999).

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 hidrogênio, iônica e hidrofóbica. A partição do substrato entre o sítio ativo e o solvente depende da hidrofobicidade do solvente e da enzima. 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).

Os critérios para determinação da hidrofobicidade de um solvente estão sujeitos a controvérsias. Um dos mais importantes indicadores de hidrofobicidade é a constante dielétrica (ILLANES, 1994). A constante dielétrica do solvente é responsável pelas interações específicas entre a enzima e o solvente. Admite-se que a diminuição da constante dielétrica do solvente permite o aumento das interações eletrostáticas entre os resíduos ionizáveis da molécula de enzima, o que pode causar uma redução da flexibilidade interna da proteína. Considerando que a mobilidade molecular é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma redução na sua flexibilidade é normalmente acompanhada por uma diminuição da atividade enzimática. A modificação do valor da constante dielétrica também altera o valor de pKa dos resíduos ionizáveis da superfície da proteína. Se essa modificação ocorrer no sítio ativo ou próximo a ele, pode haver a alteração da ligação e/ou da conversão dos substratos e, quando a mudança na constante dielétrica é drástica, a estrutura tridimensional da enzima pode ser afetada (MONOT, 1994).

A atividade enzimática é sensível ao pH, e em soluções aquosas a dependência da atividade com o pH reflete a ionização de vários resíduos de aminoácidos que têm um papel importante na catálise. Contudo, em meio não aquoso, a falta de uma fase aquosa definida torna difícil a definição do pH, e medidas diretas de pH não são factíveis (DORDICK, 1989). Em meio não aquoso, enzimas mudam sua atividade se o pH do meio micro-aquoso em volta dela for alterado. Presume-se que o CO<sub>2</sub> se dissolve na camada de hidratação associada com a enzima, podendo mudar o pH local e afetar a atividade enzimática.

Para a ativação da enzima é necessária a presença de pelo menos uma pequena monocamada de água. Em reações enzimáticas sob condições supercríticas a água divide-se entre a enzima e a mistura reacional. Em um sistema essencialmente não aquoso a água divide-se preferencialmente entre o solvente com o aumento da hidrofobicidade. Para KNEZ e HABULIN (2001), que utilizaram as lipases *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* e *porcine pancreas* em CO<sub>2</sub> supercrítico e propano a 300 bar e 40°C por 24 horas, a atividade das enzimas em propano foi maior do que em CO<sub>2</sub> supercrítico possivelmente devido às diferentes partições de água no solvente. Comparando sistemas sem a utilização de solventes com sistemas que utilizam propano como meio de reação, pôde-se observar uma taxa de reação 4 (para *porcine pancreas*) a 9 (*Rhizopus javanicus*) vezes maior do que em meios aquosos.

OLIVEIRA e OLIVEIRA (2001) estudaram a perda de atividade das enzimas Lipozyme IM e Novozym 435 submetidas a CO<sub>2</sub> supercrítico em um sistema reacional contendo óleo de dendê, enzima e etanol nas condições de temperatura entre 40-70°C e pressão de 73 a 200 bar. No caso da enzima Lipozyme IM muitas variáveis afetaram a perda de atividade, por outro lado, para a enzima Novozym 435 nenhuma variável, dentro das condições estudadas, afetou significativamente a perda de atividade enzimática. Os autores concluíram que a estabilidade de uma enzima em CO<sub>2</sub> supercrítico depende de sua estrutura e, por outro lado, de vários parâmetros relacionados à aplicação de CO<sub>2</sub> supercrítico. Para LANZA *et al.* (2004), a enzima Novozym 435 submetida ao CO<sub>2</sub> supercrítico na faixa de temperatura de 30 a 70°C, pressão de 70-250 bar, tempo de exposição de 1-3 horas e taxa de despressurização de 10-200[kgm<sup>-3</sup>min<sup>-1</sup>] em um sistema enzima/solvente, apresentou perda menor do que 15% na atividade enzimática. Os resultados obtidos mostraram que a temperatura e a densidade possuem grande influência na perda de atividade, já a taxa de descompressão apresentou uma pequena influência na perda de atividade.

Devido ao fato de as enzimas responderem diferentemente à modificações na superfície, os efeitos obtidos no uso de CO<sub>2</sub> supercrítico e de propano e n-butano

comprimidos como solventes em um sistema enzimático não podem ser aplicados a outros sistemas enzimáticos.

#### 2.4.5 Termoestabilidade de enzimas em fluidos pressurizados

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 (ZAKS e KLIBANOV,1986). Desta forma, é natural que a enzima exiba maior termoestabilidade em meio não aquoso. A estabilidade de enzimas em fluidos supercríticos tem sido estudada no intervalo de 35 a 60°C. A maioria dos trabalhos foi realizada em CO<sub>2</sub> supercrítico nas proximidades do ponto crítico, onde o fluido é altamente compressível. Embora as enzimas sejam estáveis a altas temperaturas em CO<sub>2</sub>, elas perdem atividade dependendo da taxa de despressurização e do conteúdo de água no sistema. Quanto maior o conteúdo de água mais significativa a perda de atividade.

Lipases (ZAKS e KLIBANOV,1985), F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase mitocondrial (GARZARAMOS *et al.*, 1989) e citocromo-oxidase (AYALA *et al.*, 1986) mantiveram-se ativas acima de 100°C em meio não aquoso, geralmente com atividade maior do que em água. Por exemplo, lipase a 100°C possui um tempo de meia vida de 12 horas em tributirina contendo 0,015% (v/v) de água, enquanto em meio aquoso este tempo é da ordem de segundos, à mesma temperatura (ZAKS e KLIBANOV, 1985).

CHULALAKSANANUKUL *et al.* (1993) estudaram a termoestabilidade de lipase (*Mucor miehei*) sob diferentes conteúdos de água, a 40, 60, 80 e 100°C. Concluíram que o conteúdo de água e a temperatura devem ser apropriadamente balanceados para obtenção da atividade e estabilidade ótimas da enzima. Em todas as temperaturas, a atividade enzimática diminui com o aumento do conteúdo de água, dentro da faixa estudada pelos autores. Uma dependência com a temperatura similar foi reportada por STEYTLER *et al.* (1991), os quais estudaram a atividade de

*Candida cylindracea* B para esterificação de ácido láurico com butanol em CO<sub>2</sub> supercrítico a 20, 40 e 60°C. A enzima apresentou atividade ótima a 40°C. Em geral, em fluidos supercríticos, as enzimas são estáveis e mostram atividade ótima em torno de 45°C.

## 2.5 Considerações Finais

Na revisão da literatura apresentada no decorrer deste capítulo, apresentou-se uma explanação sobre a aplicação de lipases em fluidos pressurizados e procurou-se relatar o estado da arte no qual o presente trabalho se insere.

Poucos trabalhos sobre a atividade de lipases submetidas a altas pressões em um sistema enzima-solvente estão disponíveis na literatura. Levando-se em conta este fato e também devido à grande disponibilidade de óleos e gorduras no Brasil e à relevância na obtenção de produtos de alto valor agregado a partir destes compostos, configurou-se a proposta deste trabalho, que tem como principal objetivo avaliar o comportamento da atividade enzimática de três lipases imobilizadas – duas comerciais: Lipozyme IM e Novozym 435 (Novozymes Brasil/ Araucária-PR) e uma obtida de *Yarrowia lipolytica* imobilizada em Accurel® MP 1000– em diferentes solventes pressurizados – CO<sub>2</sub>, propano e n-butano, visando estabelecer faixas de operação – temperatura, tempo de exposição, taxa de despressurização, densidade reduzida ou pressão – para utilização destas como catalisadores em reações de modificação de óleos vegetais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão listados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento das etapas do trabalho, o qual baseou-se na avaliação da atividade das lipases imobilizadas comerciais Lipozyme IM e Novozym 435 e da não-comercial de *Yarrowia lipolytica*, submetidas a diferentes fluidos pressurizados.

#### 3.1 Material

Foram utilizados neste trabalho: ácido láurico marca VETEC, acetona (99,5% de pureza), álcool etílico comercial (95% de pureza) e álcool n-propanol provenientes da QUIMEX.

Os solventes utilizados foram CO<sub>2</sub> de procedência da White Martins S.A., propano e n-butano, ambos de procedência da AGA. Na Tabela 3.1 encontram-se relacionados os solventes utilizados e a Tabela 3.2 apresenta as propriedades críticas dos mesmos.

Tabela 3.1 – Características dos solventes utilizados.

<b>Componentes</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
CO <sub>2</sub>	WHITE MARTINS S.A.	99,9% (fase líquida)
propano	AGA	99,5% (fase líquida)
n-butano	AGA	99,5% (fase líquida)

Tabela 3.2 – Propriedades críticas dos solventes utilizados neste trabalho.

<b>Solvente</b>	<b>Peso Molecular</b> <b>[g/gmol]</b>	<b>Pressão Crítica</b> <b>[bar]</b>	<b>Temperatura Crítica</b> <b>[°C]</b>	<b>Densidade Crítica</b> <b>[g/cm<sup>3</sup>]</b>
CO <sub>2</sub>	44,01	73,8	31,3	0,46
propano	44,09	42,49	96,67	0,22
n-butano	58,12	37,97	152,03	0,23

Fonte: Reid *et al.* (1987).

### 3.1.1 Enzimas

Duas lipases imobilizadas comerciais e uma não-comercial apresentadas na forma granulada, sem nenhum tratamento ou adição de outra substância, foram utilizadas na realização deste trabalho. As lipases comerciais foram gentilmente cedidas pela Novozymes Brasil/Araucária-PR e a não-comercial foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química da UFRJ/RJ.

As características específicas das três lipases imobilizadas são apresentadas a seguir:

**a) Lipozyme IM (*Rhizomucor miehei*):** lipase produzida por fermentação submersa e imobilizada em resina de troca aniônica. Apresenta especificidade nas posições 1,3 do triglicerídeo e pertence à classe de hidrolases triacilgliceróis (EC 3.1.1.3), com tamanho de partícula entre 0,2-0,6 mm, densidade entre 350-450 Kg/m<sup>3</sup> e conteúdo de água entre 2-3%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30-70°C. Na Figura 3.1 observa-se uma amostra da lipase Lipozyme IM.

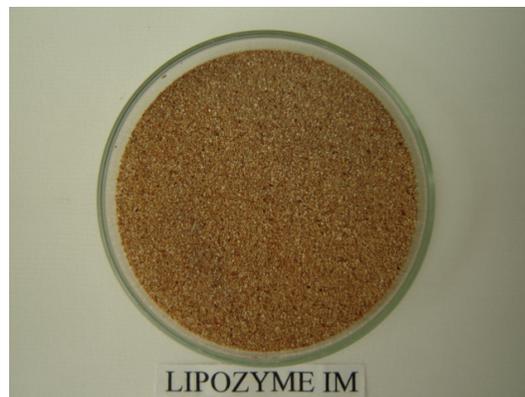


Figura 3.1 – Amostra da lipase Lipozyme IM.

**b) Novozym 435** (*Candida antarctica*): lipase produzida por fermentação submersa e imobilizada em resina acrílica macroporosa. A lipase atua não especificamente nas 3 posições do triglicerídeo. Apresenta tamanho de partícula entre 0,3-0,9 mm, densidade de aproximadamente 430 Kg/m<sup>3</sup> e conteúdo de água entre 1-2%. É uma lipase termoestável com uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 70-80°C. Na Figura 3.2 observa-se uma amostra da lipase Novozym 435.



Figura 3.2 – Amostra da lipase Novozym 435.

**c) Lipase imobilizada de *Yarrowia lipolytica***: Esta enzima foi produzida em um meio constituído (m/v) de 1% de glicose, 3% de extrato de soro de leite, 0,8% de sulfato de amônio, 1% de xarope de milho e 0,5% de óleo de oliva. Após 30 horas de fermentação o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante, seco por liofilização. O extrato enzimático foi solubilizado em tampão fosfato (0,05M pH 7,0) e imobilizado pelo método de absorção física em suporte hidrofóbico (Accurel® MP 1000). Na Figura 3.3 observa-se uma amostra da lipase de *Yarrowia lipolytica*.

Método utilizado na imobilização: O suporte (1,0g) foi embebido em etanol (10ml) por 30 minutos, posteriormente com 10 ml de uma solução etanol-água (1:1) e após 10 minutos essa solução foi substituída por água destilada que foi removida em seguida, logo após a sedimentação do material. O objetivo deste procedimento foi o deslocamento do ar existente nos interstícios do suporte para permitir o acesso de soluções contendo a enzima. A imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* foi

realizada pela adição de 50 ml da enzima a 1,0 g das resinas, com agitação magnética em temperatura de 5°C. Após o decorrimto do tempo estabelecido para a imobilização, procedeu-se a filtração e lavagem dos sólidos com água destilada para remoção da enzima não-aderida. Em seguida, o biocatalisador foi seco em dessecador, sob vácuo, por dois dias. Foram retiradas alíquotas do sobrenadante em intervalos de tempo pré-determinados para a avaliação da absorção de proteínas. O procedimento referente à produção e imobilização desta lipase foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química da UFRJ/RJ.

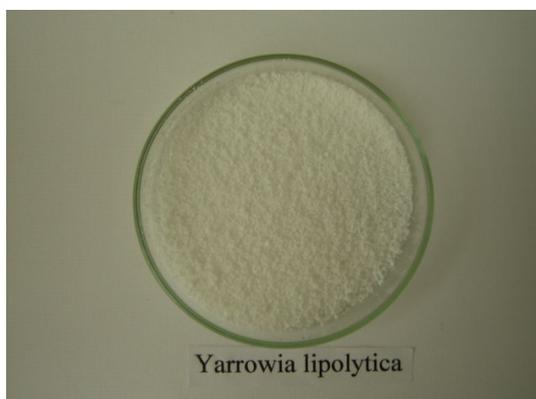


Figura 3.3 – Amostra da lipase de *Yarrowia lipolytica*.

Cabe ressaltar que as três enzimas foram armazenadas em refrigerador a 4°C e no dia anterior ao seu uso, eram colocadas em dessecador.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Método para determinação da atividade enzimática de lipases

A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e glicerol com razão molar ácido-álcool de 3:1 à temperatura de 60°C, com a enzima a 5% (p/p) mantida sob agitação por 40

minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto, de 20mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (Figura 3.4). Alíquotas de 150 $\mu$ L, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e de extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 $\mu$ mol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas (OLIVEIRA, (1999) modificado).



Figura 3.4 - Foto do equipamento utilizado para medida de atividade.

A atividade enzimática foi calculada através da equação a seguir:

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{[(V_{\text{NaOH}}^0) - (V_{\text{NaOH}}^{40})] \times N}{t \times m_a} \times 10^3 \quad (1)$$

onde: N = normalidade da solução de NaOH;

$V_{\text{NaOH}}^0$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (ml);

$V_{\text{NaOH}}^{40}$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40' minutos de reação (ml);

ma = massa de preparação enzimática utilizada na reação (g);

t = tempo de reação (min) e

1U = 1  $\mu\text{mol}$  de ácido /min.

A perda ou ganho de atividade foi calculada através da equação abaixo:

$$\text{Perda ou ganho (\%)} = \frac{\text{Atividade (U/g) após a pressurização}}{\text{Atividade (U/g) antes da pressurização}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.3 Procedimento experimental

O equipamento utilizado em todos os experimentos para avaliação da atividade enzimática em fluidos pressurizados consiste basicamente de um reator de aço inoxidável de 30ml, acoplado a um banho termostático (Quimis) para controle da temperatura, uma bomba de alta pressão (ISCO 260D) acoplada a um banho termostático a 7°C, um cilindro de solvente e um transdutor de pressão (Smar LD301) equipado com um indicador (Smar HT201), conforme apresentado esquematicamente na Figura 3.5. Aproximadamente 1g de lipase (ativada em estufa por 1 hora a 40°C) foi adicionada ao reator, pressurizando-se posteriormente o sistema e mantendo-o à pressão e temperatura constantes pelo tempo pré-estabelecido no planejamento experimental. O sistema foi despressurizado manualmente através de uma válvula micrométrica tipo agulha (Hope) envolvida por

uma fita de aquecimento (Fisaton, modelo 5) a fim de evitar o congelamento durante a despressurização. A amostra de enzima foi retirada do reator e então a atividade enzimática da lipase foi determinada pela metodologia apresentada na seção 3.2.2. Antes de submeter a enzima à condição experimental pré-estabelecida, a atividade era determinada possibilitando a avaliação do ganho ou da perda de atividade enzimática na referida condição, em função da temperatura, tempo de exposição, taxa de despressurização, densidade reduzida ou pressão do sistema. Uma vista geral da unidade e do reator utilizados nos experimentos pode ser verificada nas Figuras 3.6 e 3.7.

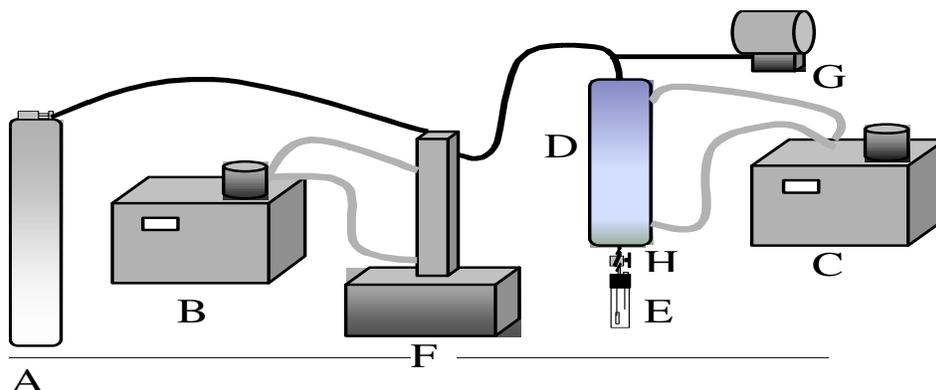


Figura 3.5 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado. (A) cilindro de gás, (B) e (C) banhos termostáticos, (D) reator, (E) válvula micrométrica, (F) bomba de alta pressão, (G) transdutor de pressão.



Figura 3.6 – Foto da unidade utilizada nos experimentos.



Figura 3.7 – Foto do reator utilizado nos experimentos.

### 3.4 Planejamento de experimentos e análise estatística

Com o objetivo de determinar as melhores condições de atividade das lipases a alta pressão, como também possibilitar a avaliação dos efeitos independentes das variáveis do processo, um planejamento experimental fatorial saturado com 2 níveis e 4 variáveis foi realizado para cada solvente e enzima. As variáveis estudadas foram temperatura, tempo de exposição da enzima ao solvente pressurizado, taxa de despressurização do sistema e densidade reduzida para o CO<sub>2</sub> e pressão no caso do propano e n-butano.

O intervalo de estudo das variáveis foi escolhido de modo a abranger a escala geralmente utilizada em reações de transesterificação. Os valores de pressão para o sistema CO<sub>2</sub> foram obtidos através da correlação pela equação de estado de ANGUS *et al.* (1976). As propriedades físicas dos fluidos supercríticos (FSC) variam grandemente com as condições de estado destes fluidos, que é caracterizada pelo comportamento PVT (pressão, volume e temperatura) do sistema. As equações de estado representam mais adequadamente este comportamento em sistemas com FSC e permitem a determinação dos valores de densidade do solvente e/ou mistura soluto/solvente para as diferentes composições obtidas. No presente trabalho adotou-se para o CO<sub>2</sub> a faixa de densidade reduzida de 0,5 a 1,6, tendo sido a pressão estimada através da equação de ANGUS *et al.* (1976). Para solventes líquidos comprimidos, como o caso do propano e n-butano, na faixa investigada a equação HBT (REID *et al.*, 1987) fornece resultados mais precisos e foi empregada para monitorar a densidade. Para esses solventes, uma grande diferença de pressão não ocasiona alteração sensível na densidade. Dentro da faixa experimental investigada, não ocorre alteração significativa na densidade e por este motivo não utilizou-se a equação HBT para calcular a pressão dos solventes propano e n-butano.

A Tabela 3.3 apresenta o intervalo de estudo das variáveis para determinação da atividade enzimática das lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e de *Yarrowia lipolytica* submetidas ao CO<sub>2</sub>. O mesmo intervalo de estudo das variáveis foi utilizado para os outros dois solventes, apenas houve a substituição da variável densidade reduzida pela pressão, no caso do propano (30-250 bar) e n-butano (10-250 bar).

Tabela 3.3 - Intervalo de estudo das variáveis.

Variável	Intervalo de estudo
Temperatura (T) [°C]	35-75
Tempo de exposição (t) [h]	1-6
Taxa de despressurização CO <sub>2</sub> (R) [kgm <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> ]	10-200
Taxa de despressurização propano (R) [bar/min]	2-50
Taxa de despressurização n-butano (R) [bar/min]	2-50
Densidade reduzida CO <sub>2</sub> (DR)	0,5-1,6
Pressão propano (P) [bar]	30-250
Pressão n-butano (P) [bar]	10-250

Para cada um dos três solventes foi construída uma matriz experimental para o planejamento fatorial. Para o solvente CO<sub>2</sub> a Tabela 3.4 apresenta a matriz experimental para as três enzimas estudadas. Para os outros dois solventes a mesma matriz experimental foi construída substituindo-se a variável densidade reduzida pela pressão. Para as enzimas Lipozyme IM e Novozym 435 os experimentos foram realizados randomicamente e com réplica de cada ponto e para a lipase de *Yarrowia lipolytica* foram realizadas réplicas apenas no ponto central. O erro experimental para cada condição foi obtido através da média e desvio padrão. A perda ou ganho de atividade foi depois modelada empiricamente de forma a determinar a influência das principais variáveis no processo e a interação entre as mesmas.

Visando obter uma comparação direta do efeito de cada variável, as variáveis independentes foram normalizadas no intervalo de -1 a +1, de acordo com a equação abaixo:

$$x_i = [2(X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})] - 1 \quad (3)$$

onde  $x_i$  é o valor normalizado da variável X na condição i;  $X_i$  é o valor real e  $X_{\min}$  e  $X_{\max}$  representam o limite inferior e superior, respectivamente. O nível -1 representa o limite inferior, enquanto o nível +1 representa o limite superior de cada variável.

Tabela 3.4. Matriz experimental empregada no estudo da atividade de lipases em CO<sub>2</sub> a alta pressão.

Experimento	T [°C]	t [h]	R [kgm <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> ]	Densidade Reduzida (DR)
1	35(-1)	1(-1)	10(-1)	0,5(-1)
2	35(-1)	1(-1)	200(+1)	1,6(+1)
3	35(-1)	6(+1)	10(-1)	1,6(+1)
4	35(-1)	6(+1)	200(+1)	0,5(-1)
5	75(+1)	1(-1)	10(-1)	1,6(+1)
6	75(+1)	1(-1)	200(+1)	0,5(-1)
7	75(+1)	6(+1)	10(-1)	0,5(-1)
8	75(+1)	6(+1)	200(+1)	1,6(+1)
9	55(0)	3,5(0)	105(0)	1,05(0)

Com o objetivo de verificar a significância dos parâmetros, o teste t de Student foi aplicado, adotando um nível de confiança de 95%. O teste t é um teste biparamétrico: número de graus de liberdade (número de experimentos – número de parâmetros) e confiança estipulada. De posse destes valores e consultando a tabela de Student (PINTO *et al.*, 1987), obtém-se o valor de t. O valor da variação é encontrado pela multiplicação do valor de t pelo erro da media (desvio padrão do parametro dividido pela raiz do numero de experimentos). Para verificar se o parâmetro é significativo ou não, o seguinte teste deve ser realizado:

- Se o parâmetro for positivo, faça a operação (parâmetro – t), caso obtenha um valor negativo o parâmetro não pode ser considerado significativo.
- Se o parâmetro for negativo, faça (parâmetro + t), se o valor obtido for positivo, o parâmetro não é significativo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a atividade das lipases imobilizadas estudadas submetidas a fluidos pressurizados.

### 4.1 Testes preliminares

A enzima, antes de ser utilizada, foi ativada em estufa a 40°C segundo OLIVEIRA (1999). Para determinação do melhor tempo de ativação da enzima em estufa alguns testes foram realizados. Somado a isso, realizaram-se testes para definir qual o melhor substrato a ser utilizado na reação padrão para medida da atividade enzimática de lipases. Nestes testes a enzima utilizada foi a Lipozyme IM e os procedimentos são descritos a seguir.

#### a) Definição do tempo de ativação da Lipozyme IM em estufa

Para determinação do tempo ideal de ativação de forma a obter a maior atividade enzimática, foram testados os tempos de 0,5h; 1h; 1,5h e 3h. A enzima era colocada em estufa a 40°C e após os tempos de estudo era medida a atividade. Os resultados apresentados na Figura 4.1 indicam que o tempo de exposição em estufa à 40°C que levou à uma maior atividade enzimática foi de 1 hora de exposição, como pode ser melhor verificado na Tabela 4.1, e por este motivo este tempo foi adotado em todos os experimentos.

O resultado obtido para a enzima Lipozyme IM foi adotado para as outras duas enzimas estudadas.

#### b) Escolha do substrato utilizado para a medida de atividade enzimática de lipases

O método padrão utilizado para a medida de atividade enzimática da lipase Lipozyme IM consiste na reação de esterificação entre o ácido láurico e glicerol e

para a enzima Novozym 435 consiste na reação entre o ácido láurico e propanol (NOVO NORDISK, 2001). No entanto, durante os testes preliminares percebeu-se uma grande dificuldade no momento de retirar amostras para análise, quando da utilização do glicerol como substrato, pois este apresenta baixa solubilidade no meio reacional. Desse modo, testou-se a substituição do glicerol pelo propanol. O propanol apresentou-se melhor por separar-se mais da enzima e por este motivo ele foi escolhido como substrato, substituindo o glicerol na determinação da atividade da Lipozyme IM.

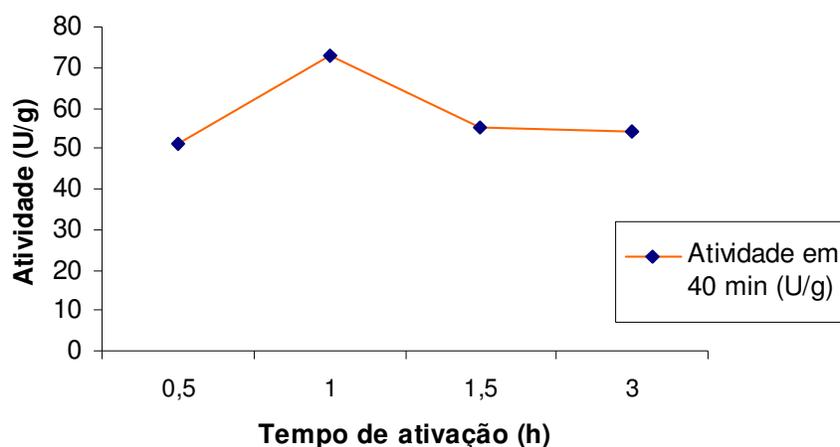


Figura 4.1 - Atividade da enzima Lipozyme IM em estufa a 40°C.

Tabela 4.1 - Estudo do melhor tempo de ativação da Lipozyme IM em estufa a 40°C.

Tempo de ativação (h)	Atividade em 40 min (U/g)
0,5	51±0,3
<b>1</b>	<b>73±0,5</b>
1,5	55±0,3
3	54±0,1

O procedimento padrão adotado para a enzima Lipozyme IM foi utilizado para as outras duas enzimas estudadas.

#### 4.2 Atividade enzimática das lipases em CO<sub>2</sub> pressurizado

Nesta etapa são demonstrados e discutidos os resultados obtidos para atividade enzimática das lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e da lipase de *Yarrowia lipolytica*, submetidas ao CO<sub>2</sub> pressurizado. Para as enzimas Lipozyme IM e Novozym 435 os experimentos foram realizados randomicamente e com réplica de cada ponto e para a lipase de *Yarrowia lipolytica* foram realizadas réplicas apenas no ponto central.

##### Enzima: LIPOZYME IM

Os resultados obtidos para a atividade enzimática da Lipozyme IM submetida a CO<sub>2</sub> pressurizado são apresentados na Tabela 4.2. Verifica-se que em todas as condições experimentais houve perda de atividade enzimática quando a enzima Lipozyme IM foi submetida ao CO<sub>2</sub> pressurizado. Verifica-se que a maior perda ( $13,7 \pm 2,5\%$ ) ocorreu no experimento 4, nas condições de menor temperatura (35°C) e densidade reduzida (0,5) e nas condições de maior tempo de exposição (6h) e taxa de despressurização ( $200[\text{kgm}^{-3}\text{min}^{-1}]$ ). Semelhantes resultados são apresentados pelos experimentos 7 e 8 mas nas condições de maior temperatura (75°C) e tempo de exposição (6h) e em diferentes taxas de despressurização (10 e  $200[\text{kgm}^{-3}\text{min}^{-1}]$ ), respectivamente.

Tabela 4.2 – Perda de atividade enzimática da Lipozyme IM submetida ao CO<sub>2</sub> pressurizado.

Experimento	T [°C]	t [h]	R [kgm <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> ]	DR	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Perda de Atividade [%]
1	35(-1)	1(-1)	10(-1)	0,5(-1) 71,5*	92 71	91 71	0,5±0,1
2	35(-1)	1(-1)	200(+1)	1,6(+1) 110,4	94 106	94 105	0,4±0,1
3	35(-1)	6(+1)	10(-1)	1,6(+1) 110,4	91 100	82 90	10,4±0,1
4	35(-1)	6(+1)	200(+1)	0,5(-1) 71,5	83 97	73 82	13,7±2,5
5	75(+1)	1(-1)	10(-1)	1,6(+1) 276,4	110 102	101 91	9,4±1,9
6	75(+1)	1(-1)	200(+1)	0,5(-1) 100	92 94	91 93	1,0±0,1
7	75(+1)	6(+1)	10(-1)	0,5(-1) 100	93 107	80 95	12,5±1,8
8	75(+1)	6(+1)	200(+1)	1,6(+1) 276,4	109 93	95 83	11,7±1,2
9	55(0)	3,5(0)	105(0)	1,05(0) 117,9	117 109	107 98	9,3±0,4

\* Pressão de trabalho (bar) selecionada na bomba de seringa. A pressão foi estimada pela equação de Angus *et al.* (1976).

### Influência das variáveis

Uma vez determinada a atividade da enzima antes e após ser submetida ao solvente pressurizado, um modelo empírico foi construído, com o objetivo de representar os dados experimentais e verificar a significância das variáveis, bem como avaliar possíveis interações entre elas. A estimativa dos parâmetros foi efetuada pelo software comercial Statistica 5.0, adotando-se um nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 4.3. O mesmo procedimento foi aplicado a todos os sistemas estudados.

Tabela 4.3 – Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da Lipozyme IM em CO<sub>2</sub> pressurizado.

$$\text{Perda de atividade} = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot t + a_3 \cdot R + a_4 \cdot T \cdot t + a_5 \cdot T \cdot DR + a_6 \cdot t \cdot DR + a_7 \cdot \text{quadrático}$$

**R= 0,997**

Variável	Parâmetro	
Independente	9,5 (1,18*)	Significativo
Temperatura (T)	1,2 (0,42)	Não Significativo
Tempo de exposição (t)	4,5 (0,42)	Significativo
Taxa de despressurização (R)	-0,7 (0,42)	Não Significativo
Temperatura (T) x Tempo de exposição (t)	-1,0 (0,42)	Não Significativo
Temperatura (T) x Densidade reduzida (DR)	1,5 (0,42)	Não Significativo
Tempo de exposição (t) x Densidade reduzida (DR)	-1,5 (0,42)	Não Significativo
Termo quadrático	-2,0 (1,26)	Não Significativo

\* incerteza paramétrica ( $\sigma$ )

Para este sistema, o tempo de exposição da enzima ao fluido pressurizado foi a única variável significativa que ocasionou perda de atividade na Lipozyme IM em CO<sub>2</sub> a altas pressões. Como mostrado na Tabela 4.3, o efeito foi significativo positivo o que demonstra que quanto maior o tempo de exposição da enzima ao solvente pressurizado maior é a perda de atividade enzimática.

Conforme apresenta a Figura 4.2, o modelo empregado correlacionou bem os dados experimentais.

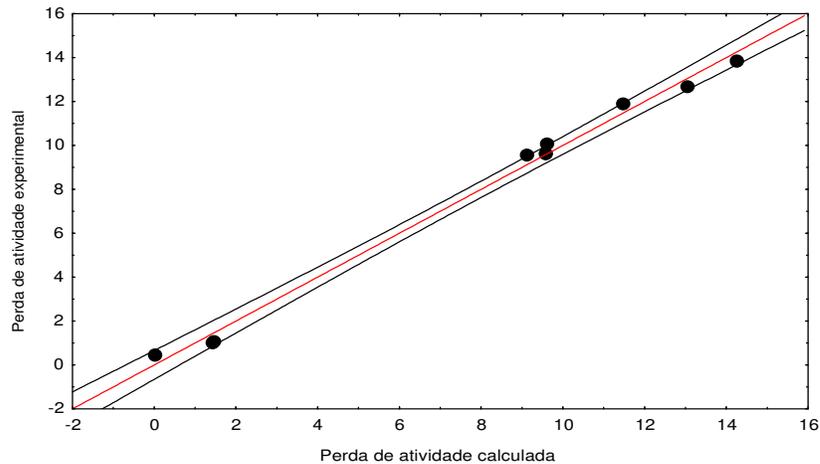


Figura 4.2 – Perda de atividade experimental e calculada para a Lipozyme IM em CO<sub>2</sub> pressurizado.

#### Enzima: NOVOZYM 435

Através da Tabela 4.4 observam-se os resultados obtidos para a atividade enzimática da Novozym 435 submetida ao CO<sub>2</sub> pressurizado. Pode-se observar que todos os experimentos apresentaram a mesma tendência de perda, como no caso da Lipozyme IM. As maiores perdas de atividade ocorreram no experimento 8, que apresentou perda de  $8,9 \pm 0,9\%$  e no experimento 7, que apresentou perda de  $8,3 \pm 0,9\%$ . Estes dois experimentos apresentavam condições de maior temperatura (75°C) e tempo de exposição (6h), porém diferentes taxas de decompressão (200 e 10[kg m<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>], respectivamente) e densidade reduzida (1,6 e 0,5, respectivamente).

Tabela 4.4 – Perda de atividade enzimática da Novozym 435 submetida ao CO<sub>2</sub> pressurizado.

Experimento	T [°C]	t [h]	R [kg/m <sup>3</sup> /min]	DR	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Perda de Atividade [%]
1	35(-1)	1(-1)	10(-1)	0,5(-1) 71,5*	873 821	861 810	1,3 ± 0,1
2	35(-1)	1(-1)	200(+1)	1,6(+1) 110,4	907 870	880 852	2,5 ± 0,6
3	35(-1)	6(+1)	10(-1)	1,6(+1) 110,4	839 926	781 860	7,0 ± 0,1
4	35(-1)	6(+1)	200(+1)	0,5(-1) 71,5	874 937	820 874	6,4 ± 0,4
5	75(+1)	1(-1)	10(-1)	1,6(+1) 276,4	817 860	771 823	4,9 ± 0,9
6	75(+1)	1(-1)	200(+1)	0,5(-1) 100	875 812	830 774	4,9 ± 0,3
7	75(+1)	6(+1)	10(-1)	0,5(-1) 100	847 890	771 822	8,3 ± 0,9
8	75(+1)	6(+1)	200(+1)	1,6(+1) 276,4	917 870	829 798	8,9 ± 0,9
9	55(0)	3,5(0)	105(0)	1,05(0) 117,9	835 890	808 862	3,1 ± 0,1

\* Pressão de trabalho (bar) selecionada na bomba de seringa. A pressão foi estimada pela equação de Angus *et al.* (1976).

A Tabela 4.5 apresenta os resultados da regressão relacionados à perda de atividade para o sistema Novozym 435 em CO<sub>2</sub> pressurizado. Com relação à atividade da enzima Novozym 435 em CO<sub>2</sub> pressurizado, a variável tempo de exposição, como no caso da enzima Lipozyme IM, também foi a única variável significativa que afetou a perda de atividade enzimática dentro do intervalo de estudo. Conclui-se que, um tempo maior de exposição da enzima ao CO<sub>2</sub> conduz a uma maior perda de atividade enzimática.

Tabela 4.5 – Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da Novozym 435 em CO<sub>2</sub> pressurizado.

**Perda de atividade = a0 + a1\*T + a2\*t + a3\*R + a4\*DR + a5\*quadrático**

**R= 0,999**

Variável	Parâmetro	
Independente	1,7 (0,09*)	Significativo
Temperatura (T)	0,7 (0,03)	Não Significativo
Tempo de exposição (t)	1,0 (0,03)	Significativo
Taxa de despressurização (R)	0,1 (0,03)	Não Significativo
Densidade reduzida (DR)	0,1 (0,03)	Não Significativo
Termo quadrático	0,9 (0,09)	Não Significativo

\* incerteza paramétrica (σ)

A Figura 4.3 apresenta o confronto entre os dados experimentais e gerados pelo modelo empírico para o sistema Novozym 435 em CO<sub>2</sub> pressurizado, podendo-se observar um bom ajuste entre os mesmos.

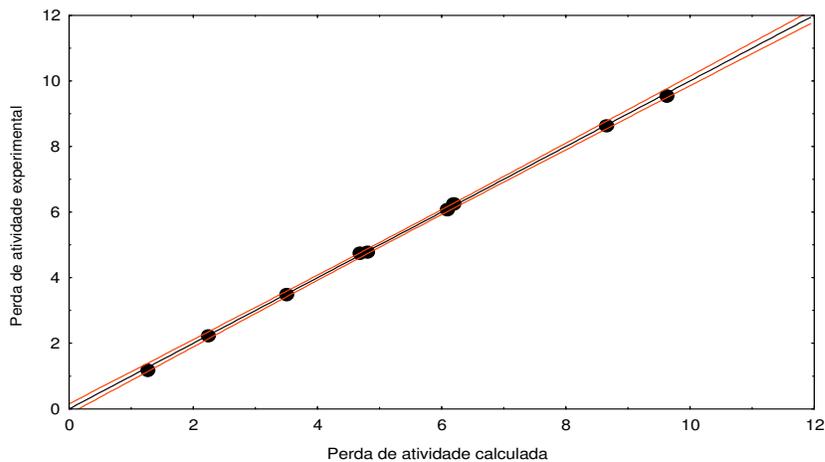


Figura 4.3 – Perda de atividade experimental e calculada para a Novozym 435 em CO<sub>2</sub> pressurizado.

**Enzima: *Yarrowia lipolytica***

A Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática da lipase de *Yarrowia lipolytica* submetida ao CO<sub>2</sub> pressurizado.

Tabela 4.6 – Perda de atividade enzimática da *Yarrowia lipolytica* submetida ao CO<sub>2</sub> pressurizado.

Experimento	T [°C]	t [h]	R [kgm <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> ]	DR	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Perda de Atividade [%]
1	35(-1)	1(-1)	10(-1)	0,5(-1) 71,5*	342	307	10,2
2	35(-1)	1(-1)	200(+1)	1,6(+1) 110,4	338	297	12,1
3	35(-1)	6(1)	10(-1)	1,6(+1) 110,4	390	306	21,5
4	35(-1)	6(1)	200(+1)	0,5(-1) 71,5	385	322	16,3
5	75(+1)	1(-1)	10(-1)	1,6(+1) 276,4	390	346	11,2
6	75(+1)	1(-1)	200(+1)	0,5(-1) 100	387	342	11,6
7	75(+1)	6(1)	10(-1)	0,5(-1) 100	360	257	28,6
8	75(+1)	6(1)	200(+1)	1,6(+1) 276,4	382	288	24,6
9	55(0)	3,5(0)	105(0)	1,05(0) 117,9	370 383	324 338	12,1**

\* Pressão de trabalho (bar) selecionada na bomba de seringa. A pressão foi estimada pela equação de Angus *et al.* (1976).

\*\* desvio padrão: ± 0,4

De acordo com esta tabela, verifica-se que em todos os experimentos a enzima apresentou perda de atividade, sendo que o maior valor ocorreu no experimento 7 (28,6%), nas condições de maior temperatura (75°C) e tempo de exposição (6h) e menores taxa de despressurização (10[kgm<sup>-3</sup>min<sup>-1</sup>]) e densidade reduzida (0,5). Cabe observar que neste solvente a enzima de *Yarrowia lipolytica* apresentou uma perda elevada de atividade enzimática, se comparada com as outras duas lipases estudadas.

A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos na regressão relacionados à perda de atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* no sistema CO<sub>2</sub> pressurizado.

Tabela 4.7 – Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* em CO<sub>2</sub> pressurizado.

<b>Perda de atividade = a<sub>0</sub> + a<sub>1</sub>*T + a<sub>2</sub>*t + a<sub>3</sub>*R + a<sub>4</sub>*T*DR + a<sub>5</sub>*DR*R + a<sub>6</sub>*quadrático</b>		
<b>R= 0,999</b>		
<b>Variável</b>	<b>Parâmetro</b>	
Independente	12,0 (0,59*)	Significativo
Temperatura (T)	1,9 (0,21)	Significativo
Tempo de exposição (t)	5,7 (0,21)	Significativo
Taxa de despressurização (R)	-0,8 (0,21)	Significativo
Temperatura (T) x Densidade reduzida (DR)	-1,3 (0,21)	Significativo
Densidade reduzida (DR) x Taxa de despressurização (R)	1,8 (0,21)	Significativo
Termo quadrático	5,0 (0,63)	Significativo

\* incerteza paramétrica ( $\sigma$ )

Com relação à atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* em CO<sub>2</sub> pressurizado, como mostra a Tabela 4.7, todas as variáveis afetaram a perda de atividade enzimática. Nota-se que o tempo de exposição apresentou-se mais significativo sugerindo que um maior tempo de exposição da enzima ao solvente pressurizado, ocasionaria uma maior perda de atividade.

A perda de atividade enzimática experimental e obtida pelo modelo para este sistema é representada pela Figura 4.4, onde pode-se observar, novamente, um bom ajuste entre os experimentos e o modelo.

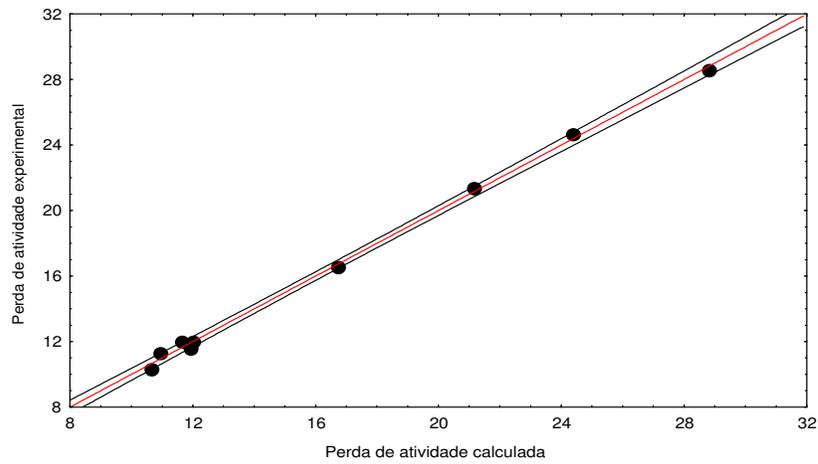


Figura 4.4 – Perda de atividade experimental e calculada para a lipase de *Yarrowia lipolytica* em CO<sub>2</sub> pressurizado.

A Figura 4.5 mostra a mudança na atividade enzimática para as lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e de *Yarrowia lipolytica* submetidas a CO<sub>2</sub> pressurizado.

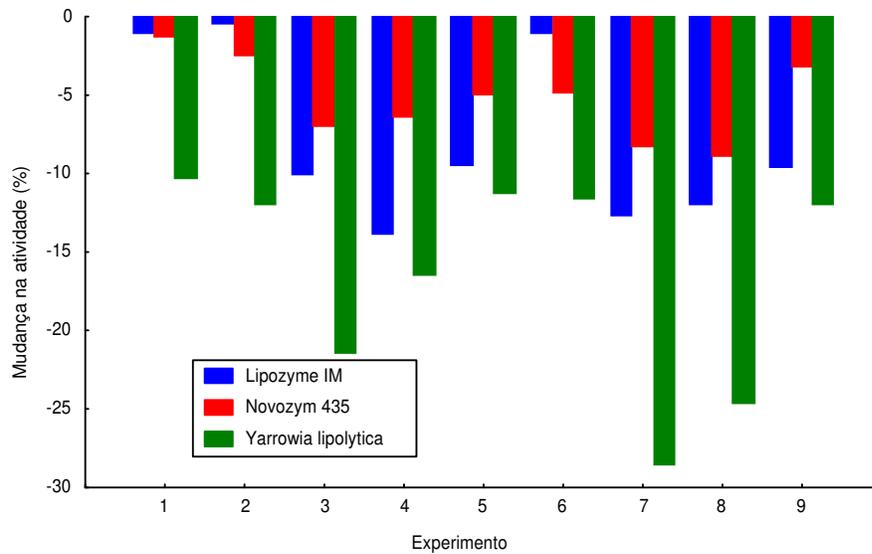


Figura 4.5 – Mudança na atividade enzimática para as lipases submetidas a CO<sub>2</sub> pressurizado.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 4.5 verifica-se que, quando submetidas a CO<sub>2</sub> pressurizado, as lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e de *Yarrowia lipolytica*, em um sistema contendo apenas enzima/solvente, apresentaram perda de atividade enzimática. Estes resultados estão de acordo com os reportados por outros autores como KAO *et al.* (1997) que observaram perda de aproximadamente 15% de atividade para a lipase de *Candida rugosa* exposta a CO<sub>2</sub> supercrítico na pressão de 680 atm. Já outros autores como MARTY *et al.* (1992) reportaram que algumas enzimas, quando submetidas a CO<sub>2</sub>, mantiveram suas atividades.

Uma das hipóteses mais aceitas no que diz respeito à perda de atividade em CO<sub>2</sub>, como sugere KAMAT *et al.* (1995), é de que o CO<sub>2</sub>, sendo um solvente hidrofílico, possui a capacidade de retirar a água essencial para a manutenção da atividade da enzima causando a desnaturação da mesma através de uma mudança conformacional levando, conseqüentemente, à uma perda de atividade. Possivelmente, então, as enzimas estudadas neste trabalho podem ter apresentado perda de atividade por esse motivo, pois para KNEZ e HABULIN (2001) solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, como o caso do CO<sub>2</sub>, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática.

Cada enzima apresentou diferentes porcentagens de perda de atividade enzimática em um mesmo solvente, sendo que a lipase de *Yarrowia lipolytica* apresentou perda de até 28,6%. Também apresenta relevância o tipo de suporte utilizado na imobilização. 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. De acordo com DALLA VECHIA *et al.* (2004) a imobilização em suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade enzimática, devido a mudanças conformacionais. A enzima Lipozyme IM é uma lipase imobilizada em resina macroporosa de troca aniônica com características hidrofóbicas (NOVO NORDISK, 2001). Esta apresentou perda de atividade em CO<sub>2</sub> a altas pressões o que supõem

que não houve uma boa interação entre enzima /suporte/ solvente. A enzima Novozym 435 é uma lipase imobilizada em resina acrílica macroporosa com características hidrofóbicas (NOVO NORDISK, 2001). A Novozym 435 apresentou perda de atividade em CO<sub>2</sub> a altas pressões e também pode-se supor que não houve uma boa interação entre enzima /suporte/ solvente. A lipase de *Yarrowia lipolytica* foi imobilizada pelo método de absorção física em suporte hidrofóbico (Accurel® MP 1000). Esta apresentou perda significativa de atividade e também supõem-se que não houve uma boa interação entre enzima /suporte/ solvente.

### 4.3 Atividade enzimática das lipases em propano pressurizado

Nesta etapa são apresentados e discutidos os resultados obtidos para a atividade enzimática das lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e da lipase de *Yarrowia lipolytica*, submetidas ao propano pressurizado. Para as enzimas Lipozyme IM e Novozym 435 os experimentos foram realizados randomicamente e com réplica de cada ponto e para a lipase de *Yarrowia lipolytica* foram realizadas réplicas apenas no ponto central.

#### Enzima: LIPOZYME IM

Na Tabela 4.8 pode-se observar a perda de atividade enzimática da Lipozyme IM submetida ao propano pressurizado. Observa-se que em todos os experimentos a enzima mostrou perda de atividade, sendo que a maior perda ocorreu no experimento 7 ( $8,9 \pm 0,2\%$ ), nas condições de maior temperatura, pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização. Cabe observar que a enzima Lipozyme IM apresentou perda de atividade como ocorreu quando a mesma foi submetida ao CO<sub>2</sub>.

Tabela 4.8 – Perda de atividade enzimática da Lipozyme IM submetida ao propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	P [bar]	t [h]	R [bar/min]	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Perda de atividade [%]
1	35(-1)	30(-1)	1(-1)	2(-1)	97 99	95 97	2,0 ± 0,1
2	35(-1)	250(+1)	1(-1)	50(+1)	87 85	84 82	3,4 ± 0,6
3	35(-1)	250(+1)	6(+1)	2(-1)	83 87	81 86	1,7 ± 0,5
4	35(-1)	30(-1)	6(+1)	50(+1)	83 89	81 87	2,3 ± 0,6
5	75(+1)	250(+1)	1(-1)	2(-1)	87 88	86 87	1,1 ± 0,1
6	75(+1)	30(-1)	1(-1)	50(+1)	89 83	86 81	2,8 ± 0,9
7	75(+1)	30(-1)	6(+1)	2(-1)	89 89	81 81	8,9 ± 0,2
8	75(+1)	250(+1)	6(+1)	50(+1)	83 87	79 83	4,7 ± 0,7
9	55(0)	140(0)	3,5(0)	26(0)	87 82	81 77	6,5 ± 0,7

Na Tabela 4.9 verifica-se os valores obtidos na regressão da perda de atividade da Lipozyme IM no sistema utilizando propano pressurizado. Pode-se observar que as variáveis significativas na perda de atividade da Lipozyme IM submetida a propano pressurizado são a temperatura, a pressão e o tempo de exposição. Além do efeito isolado destas variáveis, as interações entre temperatura - pressão, pressão - tempo de exposição e pressão - taxa de despressurização também apresentaram importantes efeitos na perda de atividade. As variáveis mais significativas foram a temperatura e o tempo de exposição, isto demonstra que uma maior temperatura juntamente com um maior tempo de exposição, conduz à uma maior perda de atividade da enzima.

Tabela 4.9 – Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da Lipozyme IM em propano pressurizado.

$$\text{Perda de atividade} = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot P + a_3 \cdot t + a_4 \cdot T \cdot P + a_5 \cdot P \cdot t + a_6 \cdot P \cdot R + a_7 \cdot \text{quadrático}$$

$$R = 0,999$$

Variável	Parâmetro	
Independente	6,5 (0,18*)	Significativo
Temperatura (T)	1,0 (0,06)	Significativo
Pressão (P)	-0,7 (0,06)	Significativo
Tempo de exposição (t)	1,1 (0,06)	Significativo
Temperatura (T) x Pressão (P)	-0,7 (0,06)	Significativo
Pressão (P) x Tempo de exposição (t)	-0,5 (0,06)	Significativo
Pressão (P) x Taxa de despressurização (R)	1,4 (0,06)	Significativo
Termo quadrático	-3,3 (0,19)	Não Significativo

\* incerteza paramétrica ( $\sigma$ )

O modelo empregado ajustou-se bem aos dados experimentais de perda de atividade, conforme mostra a Figura 4.6.

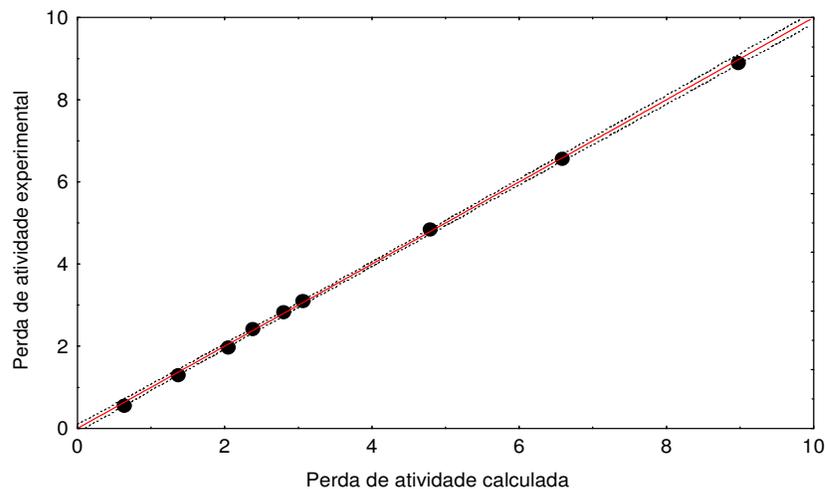


Figura 4.6 – Perda de atividade experimental e calculada para a Lipozyme IM em propano.

**Enzima: NOVOZYM 435**

A Tabela 4.10 apresenta os valores do ganho de atividade enzimática para a Novozym 435 em propano pressurizado. De acordo com estes resultados a enzima Novozym 435 em propano a altas pressões apresentou um aumento de atividade nos 9 experimentos realizados. O maior ganho de atividade ocorreu no experimento 8 ( $14,0 \pm 0,5\%$ ), relacionado às condições de limite superior de temperatura, pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização.

Tabela 4.10 – Ganho de atividade enzimática da Novozym 435 submetida ao propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	P [bar]	t [h]	R [bar/min]	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Ganho de atividade [%]
1	35(-1)	30(-1)	1(-1)	2(-1)	883 897	899 913	$1,7 \pm 0,1$
2	35(-1)	250(+1)	1(-1)	50(+1)	831 873	848 891	$2,0 \pm 0,4$
3	35(-1)	250(+1)	6(+1)	2(-1)	891 863	928 898	$4,1 \pm 0,9$
4	35(-1)	30(-1)	6(+1)	50(+1)	865 850	898 883	$3,8 \pm 0,1$
5	75(+1)	250(+1)	1(-1)	2(-1)	818 825	898 899	$9,3 \pm 0,5$
6	75(+1)	30(-1)	1(-1)	50(+1)	879 831	968 917	$10,2 \pm 0,1$
7	75(+1)	30(-1)	6(+1)	2(-1)	866 851	958 939	$10,4 \pm 0,1$
8	75(+1)	250(+1)	6(+1)	50(+1)	813 878	931 998	$14,0 \pm 0,5$
9	55(0)	140(0)	3,5(0)	26(0)	838 852	918 943	$10,1 \pm 0,7$

A Tabela 4.11 apresenta os resultados da regressão relacionados ao ganho de atividade da Novozym 435 em propano pressurizado. Com relação à atividade da

enzima Novozym 435 em propano pressurizado, a variável que mais fortemente afetou o ganho de atividade foi a temperatura, seguida do tempo de exposição. Este fato sugere que, quanto maiores forem os valores destas variáveis, maior será o ganho de atividade.

Tabela 4.11 – Resultados da regressão relacionados ao ganho de atividade da Novozym 435 em propano pressurizado.

**Ganho de atividade =  $a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot t + a_3 \cdot R + a_4 \cdot P \cdot t + a_5 \cdot$  quadrático**

**R= 0,993**

Variável	Parâmetro	
Independente	10,0 (0,82*)	Significativo
Temperatura (T)	4,0 (0,29)	Significativo
Tempo de exposição (t)	1,1 (0,29)	Significativo
Taxa de despressurização (R)	0,5 (0,29)	Não Significativo
Pressão (P) x Tempo de exposição (t)	0,5 (0,29)	Não Significativo
Termo quadrático	-3,0 (0,87)	Não Significativo

\* incerteza paramétrica ( $\sigma$ )

O ganho de atividade enzimática experimental e obtido pelo modelo para este sistema são representados pela Figura 4.7, onde pode-se observar um bom ajuste entre os dados.

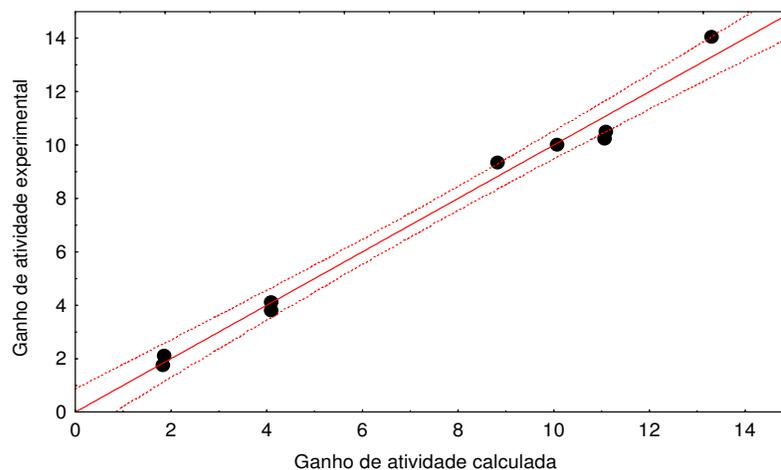


Figura 4.7 – Ganho de atividade experimental e calculada para a lipase Novozym 435 em propano.

**Enzima: *Yarrowia lipolytica***

Através da Tabela 4.12 observam-se os resultados obtidos para a atividade enzimática da lipase de *Yarrowia lipolytica* submetida ao propano pressurizado.

Tabela 4.12 – Perda de atividade enzimática da lipase de *Yarrowia lipolytica* submetida ao propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	P [bar]	t [h]	R [bar/min]	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Perda de atividade [%]
1	35(-1)	30(-1)	1(-1)	2(-1)	336	336	0
2	35(-1)	250(+1)	1(-1)	50(+1)	315	312	0,9
3	35(-1)	250(+1)	6(+1)	2(-1)	322	319	0,9
4	35(-1)	30(-1)	6(+1)	50(+1)	331	329	0,6
5	75(+1)	250(+1)	1(-1)	2(-1)	350	345	1,4
6	75(+1)	30(-1)	1(-1)	50(+1)	331	329	0,6
7	75(+1)	30(-1)	6(+1)	2(-1)	325	320	1,5
8	75(+1)	250(+1)	6(+1)	50(+1)	391	387	1,0
9	55(0)	140(0)	3,5(0)	26(0)	389 364	385 358	1,3*

\* desvio padrão:  $\pm 0,3$

Em todas as condições experimentais houve perda de atividade enzimática, quando a lipase de *Yarrowia lipolytica* foi submetida ao propano pressurizado. Verifica-se que, em todos os experimentos a perda enzimática foi insignificante (perda máxima de 1,5% no experimento 7), independente das condições das variáveis.

Verifica-se na Tabela 4.13 os resultados da regressão da perda de atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* em propano pressurizado.

Tabela 4.13 – Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* em propano pressurizado.

$$\text{Perda de atividade} = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot P + a_3 \cdot t + a_4 \cdot R + a_5 \cdot T \cdot R + a_6 \cdot t \cdot R + a_7 \cdot \text{quadrático}$$

**R= 0,999**

Variável	Parâmetro	
Independente	1,2 (0,05*)	Significativo
Temperatura (T)	0,2 (0,02)	Não significativo
Pressão (P)	0,1 (0,02)	Significativo
Tempo de exposição (t)	0,1 (0,02)	Significativo
Taxa de despressurização (R)	-0,1 (0,02)	Significativo
Temperatura (T) x Taxa de despressurização (R)	-0,2 (0,02)	Significativo
Tempo de exposição (t) x Taxa de despressurização (R)	-0,1 (0,02)	Significativo
Termo quadrático	-0,3 (0,05)	Significativo

\* incerteza paramétrica ( $\sigma$ )

Os efeitos mostraram-se muito pequenos, o que implica dizer que as variáveis estudadas não afetam significativamente a perda de atividade neste sistema. A perda de atividade enzimática experimental e obtida pelo modelo para este sistema é representada pela Figura 4.8, onde pode-se observar um bom ajuste entre os dados.

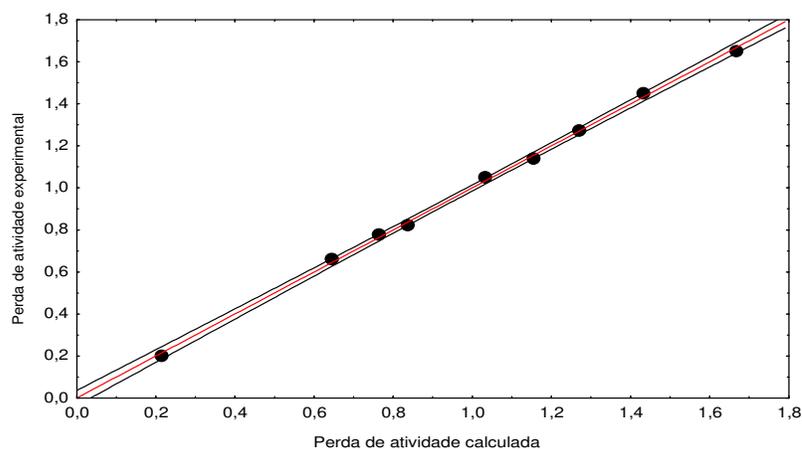


Figura 4.8 – Perda de atividade experimental e calculada para a lipase de *Yarrowia lipolytica* em propano pressurizado.

A Figura 4.9 apresenta a mudança na atividade enzimática para as lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e de *Yarrowia lipolytica* submetidas a propano pressurizado. De acordo com os resultados verifica-se que, quando submetidas ao propano pressurizado, as lipases Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica* apresentaram perda de atividade enzimática, mas a perda foi inferior a 10%. Contrariamente, a lipase Novozym 435 apresentou ganho de atividade.

KNEZ e HABULIN (2001) que utilizaram as lipases *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* e *porcine pancreas* em CO<sub>2</sub> supercrítico e propano a 300 bar e 40°C por 24 horas, mostraram que a atividade das enzimas em propano foi maior que em CO<sub>2</sub> supercrítico. Confirma-se assim, a suposta relevância da constante dielétrica no comportamento da atividade das enzimas a altas pressões. O propano possui uma baixa constante dielétrica (1,7) e estudos indicam que baixas constantes dielétricas favorecem a abertura do sítio ativo da enzima, provocando uma maior atividade catalítica.

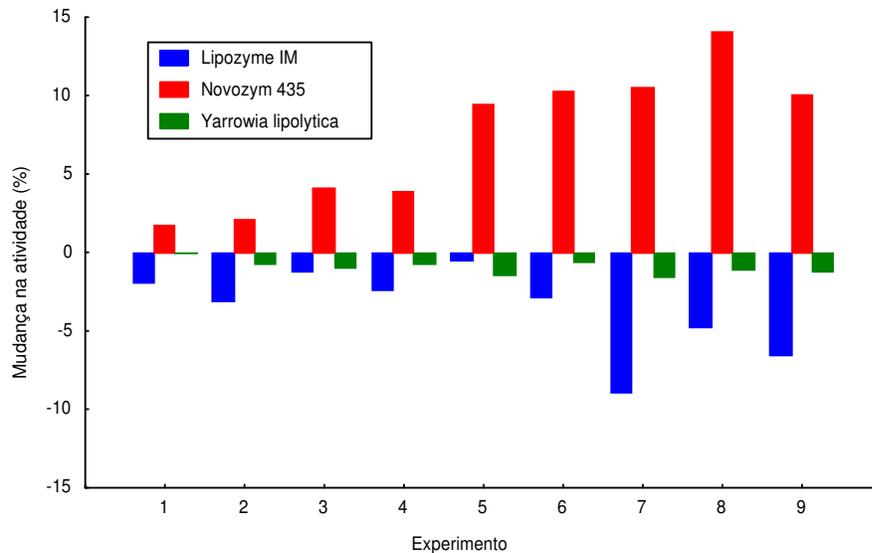


Figura 4.9 – Mudança na atividade enzimática para as lipases submetidas ao propano pressurizado.

Como no caso do CO<sub>2</sub>, as enzimas Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica*, ambas imobilizadas em suportes hidrofóbicos, apresentaram perda de atividade e supõem-se que isto ocorreu devido a má interação entre enzima /suporte/ solvente. O aumento de atividade apresentado pela enzima Novozym 435, imobilizada em suporte hidrofóbico, supostamente pode ser explicado pela boa interação enzima/solvente. Além disso a Novozym 435 é uma lipase termoestável que apresenta maior atividade a altas temperaturas.

#### 4.4 Atividade enzimática das lipases em n-butano pressurizado

Nesta etapa são demonstrados e discutidos os resultados obtidos para atividade enzimática das lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e da lipase de *Yarrowia lipolytica*, submetidas ao n-butano pressurizado. Para as enzimas Lipozyme IM e Novozym 435 os experimentos foram realizados randomicamente e com réplica de cada ponto e para a lipase de *Yarrowia lipolytica* foram realizadas réplicas apenas no ponto central.

##### Enzima: LIPOZYME IM

A Tabela 4.14 apresenta os valores de perda de atividade da enzima Lipozyme IM submetida ao n-butano pressurizado. Pode ser verificado que os 9 experimentos apresentaram perda de atividade quando a enzima Lipozyme IM foi exposta a n-butano a altas pressões. As maiores perdas de atividade foram obtidas nos experimentos 4, que apresentou perda de  $3,0 \pm 1,4\%$ , experimento 7, que mostrou  $3,6 \pm 0,8\%$  de perda como também no experimento 8, que apresentou perda de  $3,2 \pm 0,1\%$  de atividade. Comparando-se a perda de atividade da enzima Lipozyme IM quando submetida aos solventes CO<sub>2</sub>, propano e n-butano, verifica-se que ocorreu uma perda menor de atividade enzimática em propano e n-butano pressurizados.

Tabela 4.14 – Perda de atividade enzimática da Lipozyme IM submetida ao n-butano pressurizado.

Experimento	T [°C]	P [bar]	t [h]	R (bar/min)	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Perda de Atividade [%]
1	35(-1)	10(-1)	1(-1)	2(-1)	98 97	98 97	0
2	35(-1)	250(+1)	1(-1)	50(+1)	98 112	98 112	0
3	35(-1)	250(+1)	6(+1)	2(-1)	87 96	86 96	0,5 ± 0,1
4	35(-1)	10(-1)	6(+1)	50(+1)	150 97	147 93	3,0 ± 1,4
5	75(+1)	250(+1)	1(-1)	2(-1)	90 103	89 101	1,5 ± 0,5
6	75(+1)	10(-1)	1(-1)	50(+1)	98 83	97 83	0,5 ± 0,1
7	75(+1)	10(-1)	6(+1)	2(-1)	87 153	83 149	3,6 ± 0,8
8	75(+1)	250(+1)	6(+1)	50(+1)	95 153	92 148	3,2 ± 0,1
9	55(0)	130(0)	3,5(0)	26(0)	81 90	80 88	1,7 ± 0,5

Na Tabela 4.15 são apresentados os resultados da regressão da perda de atividade da Lipozyme IM em n-butano pressurizado. Os efeitos mostraram-se muito pequenos, o que significa dizer que, as variáveis dentro do intervalo de estudo, não afetam significativamente a perda de atividade neste sistema.

Tabela 4.15 – Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da Lipozyme IM em n-butano pressurizado.

$$\text{Perda de atividade} = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot t + a_3 \cdot T \cdot P + a_4 \cdot P \cdot t$$

**R= 0,965**

Variável	Parâmetro	
Independente	1,5 (0,17*)	Significativo
Temperatura (T)	0,5 (0,18)	Significativo
Tempo de exposição (t)	0,9 (0,18)	Significativo
Temperatura (T) x Pressão (P)	0,5 (0,18)	Significativo
Pressão (P) x Tempo de exposição (t)	- 0,5 (0,18)	Significativo

\* incerteza paramétrica ( $\sigma$ )

O modelo empregado ajustou-se bem aos dados experimentais de perda de atividade, conforme mostra a Figura 4.10.

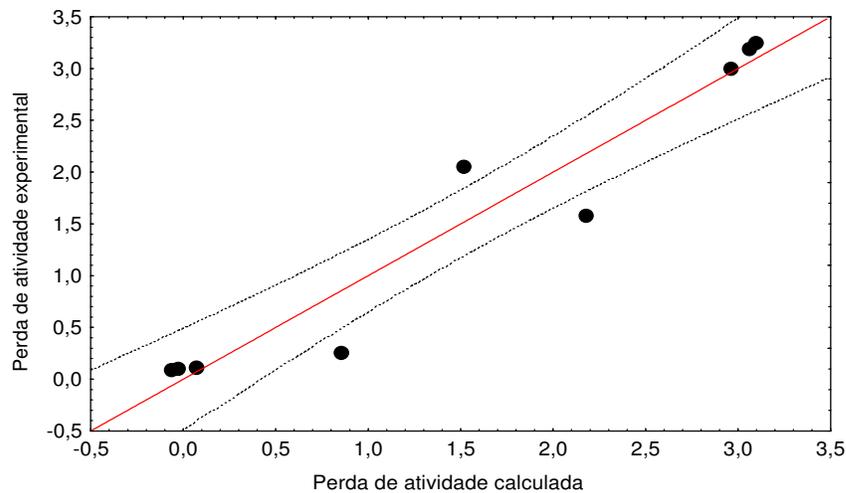


Figura 4.10 – Perda de atividade experimental e calculada para a Lipozyme IM em n-butano pressurizado.

**Enzima: NOVOZYM 435**

Os resultados obtidos para a atividade enzimática da Novozym 435 submetida ao n-butano pressurizado são apresentados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Ganho de atividade enzimática da Novozym 435 submetida ao n-butano pressurizado.

Experimento	T [°C]	P [bar]	t [h]	R [bar/min]	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Ganho de atividade [%]
1	35(-1)	10(-1)	1(-1)	2(-1)	871 835	880 857	1,8 ± 1,1
2	35(-1)	250(+1)	1(-1)	50(+1)	763 875	792 901	3,3 ± 0,5
3	35(-1)	250(+1)	6(+1)	2(-1)	891 850	951 900	6,3 ± 0,6
4	35(-1)	10(-1)	6(+1)	50(+1)	813 891	850 931	4,5 ± 0,1
5	75(+1)	250(+1)	1(-1)	2(-1)	851 778	985 893	15,2 ± 0,6
6	75(+1)	10(-1)	1(-1)	50(+1)	811 803	890 888	10,1 ± 0,5
7	75(+1)	10(-1)	6(+1)	2(-1)	801 793	899 881	11,6 ± 0,7
8	75(+1)	250(+1)	6(+1)	50(+1)	803 785	993 938	21,5 ± 2,9
9	55(0)	130(0)	3,5(0)	26(0)	808 835	882 925	9,9 ± 1,1

Pode ser observado que todos os experimentos demonstraram aumento de atividade da enzima Novozym 435 quando o solvente utilizado foi n-butano a altas pressões. O maior ganho de atividade ocorreu no experimento 8 (21,5±2,9%) para as condições de maior temperatura, pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização.

Na Tabela 4.17 verifica-se os resultados da regressão para o ganho de atividade da lipase Novozym 435 no sistema n-butano pressurizado.

Tabela 4.17 – Resultados da regressão relacionados ao ganho de atividade da Novozym 435 em n-butano pressurizado.

<b>Ganho de atividade = <math>a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot P + a_3 \cdot t + a_4 \cdot t \cdot P</math></b>		
<b>R= 0,989</b>		
<b>Variável</b>	<b>Parâmetro</b>	
Independente	9,4 (0,42*)	Significativo
Temperatura (T)	5,3 (0,45)	Significativo
Pressão (P)	2,3 (0,45)	Significativo
Tempo de exposição (t)	1,6 (0,45)	Significativo
Tempo de exposição (t) x Pressão (P)	1,4 (0,45)	Significativo

\* incerteza paramétrica ( $\sigma$ )

Verifica-se que as variáveis temperatura, pressão, tempo de exposição e a interação tempo de exposição - pressão mostraram-se significativas a nível de 95%. A variável temperatura foi a que mais afetou positivamente o ganho de atividade enzimática da Novozym 435 submetida a n-butano pressurizado. Conclui-se então que, quanto maior a temperatura, maior será o ganho de atividade enzimática.

O ganho de atividade enzimática experimental e obtido pelo modelo para este sistema são representados pela Figura 4.11, onde pode-se observar um bom ajuste entre os dados.

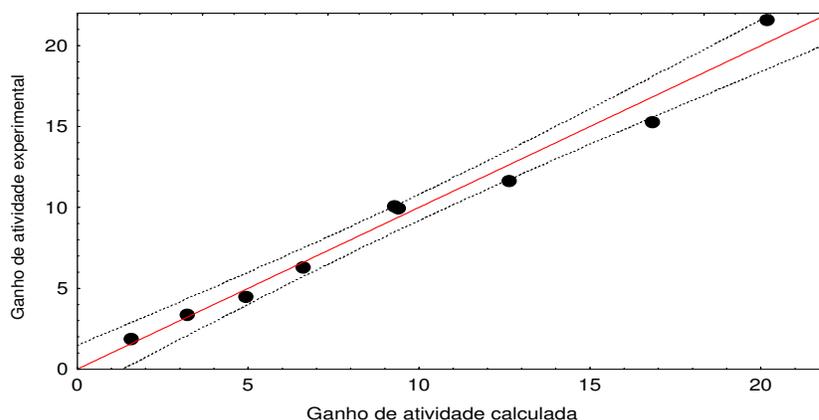


Figura 4.11 – Ganho de atividade experimental e calculada para a Novozym 435 em n-butano pressurizado.

**Enzima: *Yarrowia lipolytica***

A Tabela 4.18 apresenta os valores de perda de atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* submetida ao n-butano pressurizado.

Tabela 4.18 – Perda de atividade enzimática da lipase de *Yarrowia lipolytica* submetida ao n-butano pressurizado.

Experimento	T [°C]	P [bar]	t [h]	R (bar/min)	Atividade Inicial (U/g)	Atividade Final (U/g)	Perda de Atividade [%]
1	35(-1)	10(-1)	1(-1)	2(-1)	322	319	0,9
2	35(-1)	250(+1)	1(-1)	50(+1)	339	334	1,4
3	35(-1)	250(+1)	6(+1)	2(-1)	390	387	0,7
4	35(-1)	10(-1)	6(+1)	50(+1)	330	328	0,6
5	75(+1)	250(+1)	1(-1)	2(-1)	395	392	0,7
6	75(+1)	10(-1)	1(-1)	50(+1)	355	351	1,1
7	75(+1)	10(-1)	6(+1)	2(-1)	364	360	1,0
8	75(+1)	250(+1)	6(+1)	50(+1)	349	347	0,5
9	55(0)	130(0)	3,5(0)	26(0)	317 318	314 316	0,7 *

\* desvio padrão: ± 0,1

O que pode ser observado na Tabela 4.18 é que todos os experimentos apresentaram perda de atividade enzimática. Observa-se também que a perda foi muito pequena em todos os experimentos (perda inferior a 1,5%), independente das condições experimentais.

Verifica-se na Tabela 4.19 os valores obtidos para a regressão relacionados a perda de atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* em n-butano pressurizado.

Tabela 4.19 – Resultados da regressão relacionados à perda de atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* em n-butano pressurizado.

<b>Perda de atividade = a0 + a1*T+ a2*t +a3*R + a4*T*P + a5*quadrático</b>		
<b>R= 0,986</b>		
<b>Variável</b>	<b>Parâmetro</b>	
Independente	0,6 (0,05*)	Significativo
Temperatura (T)	0,1(0,02)	Não significativo
Tempo de exposição (t)	-0,1(0,02)	Significativo
Taxa de despressurização (R)	-0,1(0,02)	Significativo
Temperatura (T) x Pressão (P)	-0,1(0,02)	Significativo
Termo quadrático	0,1 (0,06)	Significativo

\* incerteza paramétrica ( $\sigma$ )

Os efeitos mostraram-se muito pequenos, o que significa dizer que, na faixa estudada, as variáveis não afetam a perda de atividade neste sistema. O modelo empregado ajustou-se bem aos dados experimentais de perda de atividade, conforme mostra a Figura 4.12.

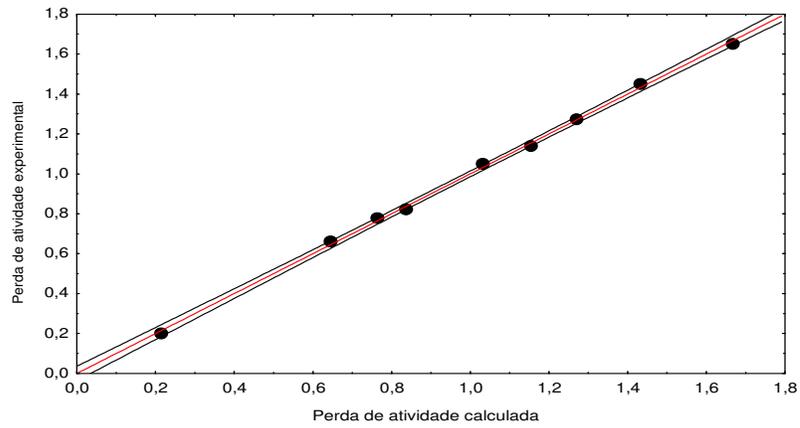


Figura 4.12 – Perda de atividade experimental e calculada para a lipase de *Yarrowia lipolytica* em n-butano pressurizado.

A Figura 4.13 apresenta a mudança na atividade enzimática para as lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e de *Yarrowia lipolytica* submetidas a n-butano pressurizado.

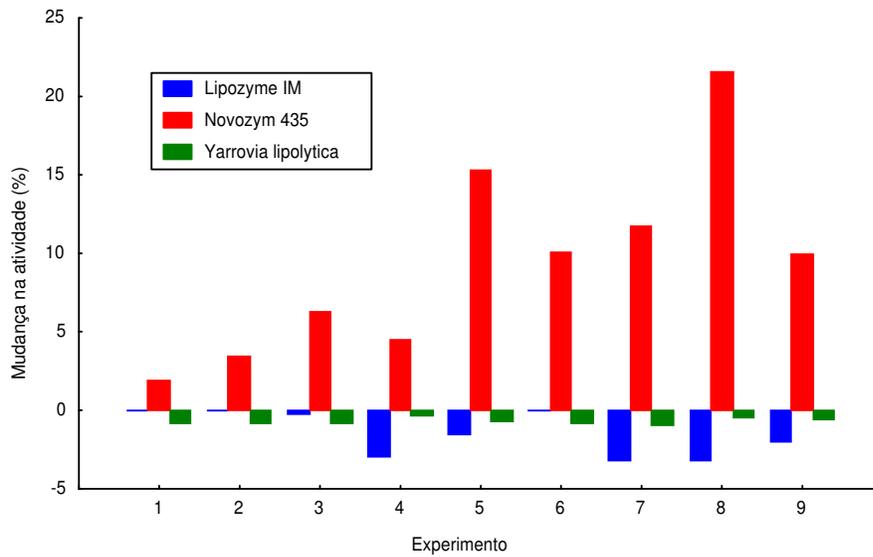


Figura 4.13 – Mudança na atividade enzimática para as lipases submetidas a n-butano pressurizado.

Através da Figura 4.13 observa-se que as enzimas Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica* obtiveram perda de atividade enzimática quando submetidas a n-butano pressurizado, diferentemente da Novozym 435 que apresentou ganho de atividade.

Supõe-se que estes resultados estejam relacionados ao fato do n-butano ser um solvente mais hidrofóbico do que o CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, não possuir a capacidade de retirar água da enzima, evitando uma grande inativação. O n-butano, por apresentar uma baixa constante dielétrica, preserva a conformação da enzima sob altas pressões, diminuindo os possíveis efeitos de desnaturação que levam à uma diminuição da atividade enzimática. Em trabalhos realizados por KNEZ e HABULIN (2001) e KNEZ *et al.* (1998) a lipase imobilizada de *R. miehei* não apresentou perda de atividade quando exposta a n-butano na pressão de 100 bar, 35°C de temperatura e tempo de 24 horas.

Quanto à importância das características do suporte utilizado na imobilização da enzima, as mesmas conclusões para o sistema com propano podem aqui ser colocadas.

#### **4.5 Determinação da influência do número de ciclos de pressurização/despressurização na atividade da lipase Novozym 435**

Após concluir o estudo da atividade enzimática de lipases submetidas à altas pressões realizou-se dois experimentos a fim de determinar qual seria a influência de vários ciclos de pressurização/despressurização na atividade de enzimas. A enzima escolhida foi a lipase comercial Novozym 435 por ter apresentado melhor atividade nos experimentos anteriores e os solventes foram o CO<sub>2</sub>, propano e n-butano. A condição escolhida para os experimentos foi a 5 para os três solventes (conforme Tabelas 4.4, 4.10 e 4.16), pois esta condição levou a um aumento de atividade enzimática significativo na condição de uma hora de exposição da lipase aos solventes propano e n-butano pressurizados. Os experimentos foram realizados de forma idêntica aos anteriores, a enzima foi adicionada ao reator e procedeu-se os mesmos passos conforme o item 3.3. Após a depressurização retirou-se uma

amostra com a qual foi realizada a medida de atividade e o sistema foi novamente pressurizado nas mesmas condições anteriores, assim sucessivamente até completar 5 ciclos de pressurização/ despressurização. Após cada despressurização uma amostra era retirada e realizava-se a medida de atividade.

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho são apresentados na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 – Atividade da Novozym 435 após sucessivos ciclos de pressurização/despressurização em CO<sub>2</sub>, propano e n-butano (T= 75°C; t= 1h, P= 276,4 bar (CO<sub>2</sub>) e 250 bar (propano e n-butano); e R= 10 kg/m<sup>3</sup>/min (CO<sub>2</sub>) e 2 bar/min (propano e n-butano)).

<b>Solvente</b>	<b>Nº de ciclos</b>	<b>Atividade inicial (U/g)</b>	<b>Atividade final (U/g)</b>	<b>Perda ou ganho de atividade (%)</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	1		847	-4,0
	2		828	-6,2
	3	883	817	-7,4
	4		806	-8,7
	5		790	- 10,5
<b>propano</b>	1		950	+9,0
	2		951	+9,1
	3	871	951	+9,1
	4		952	+9,2
	5		953	+9,4
<b>n-butano</b>	1		980	+16,1
	2		980	+16,1
	3	844	981	+16,2
	4		981	+16,2
	5		982	+16,3

Após o término dos experimentos conclui-se que a atividade da lipase Novozym 435 apresentou perda de 10% de atividade quando submetida a CO<sub>2</sub> pressurizado após 5 ciclos de pressurização/despressurização e manteve-se praticamente inalterada no caso dos solventes propano e n-butano pressurizados. Em relação aos efeitos dos passos de pressurização /despressurização na atividade enzimática, a literatura apresenta diferentes resultados dependendo da enzima, do solvente e da faixa de temperatura, pressão e tempo de exposição investigadas. STEINBERGER *et al.* (1999) relataram que após 15 passos de depressurização a atividade da esterase (EP10) e da lipase (*Aspergillus niger*) a 35°C e 150 bar em CO<sub>2</sub>, manteve-se quase inalterada. HABULIN *et al.* (2004) submeteram a proteinase de *Carica papaya* por 1 hora a 300 bar e 50°C e após 30 passos de depressurização ocorreu perda de até 50% da atividade enzimática.

Com a finalidade de utilizar-se estas enzimas estudadas na catálise de reações de modificação de óleos vegetais, os resultados obtidos são relevantes. A Tabela 4.21 apresenta uma compilação geral dos resultados de maior perda ou ganho de atividade para cada solvente estudado.

Tabela 4.21 - Compilação geral dos resultados de maior perda ou ganho de atividade para cada solvente estudado.

Enzima	Solvente	Maior perda ou ganho de atividade (%)
Lipozyme IM	CO <sub>2</sub>	- 13,7
	propano	- 8,9
	n-butano	- 3,6
Novozym 435	CO <sub>2</sub>	- 8,9
	propano	+ 14,0
	n-butano	+ 21,5
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CO <sub>2</sub>	- 28,6
	propano	- 1,5
	n-butano	- 1,4

- perda de atividade      + ganho de atividade

A enzima Novozym 435 mostrou ser a melhor opção para este fim, pois foi a única a obter ganho de atividade em dois solventes, já as lipases Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica* obtiveram perda de atividade nos três solventes. Nas Figuras 4.14, 4.15 e 4.16 esses resultados podem ser melhor visualizados.

Quando da utilização dos solventes pressurizados pode-se concluir que o CO<sub>2</sub> é o solvente que acarreta maior perda de atividade enzimática, diferentemente do propano e n-butano que se mostraram solventes apropriados na utilização em reações enzimáticas a altas pressões.

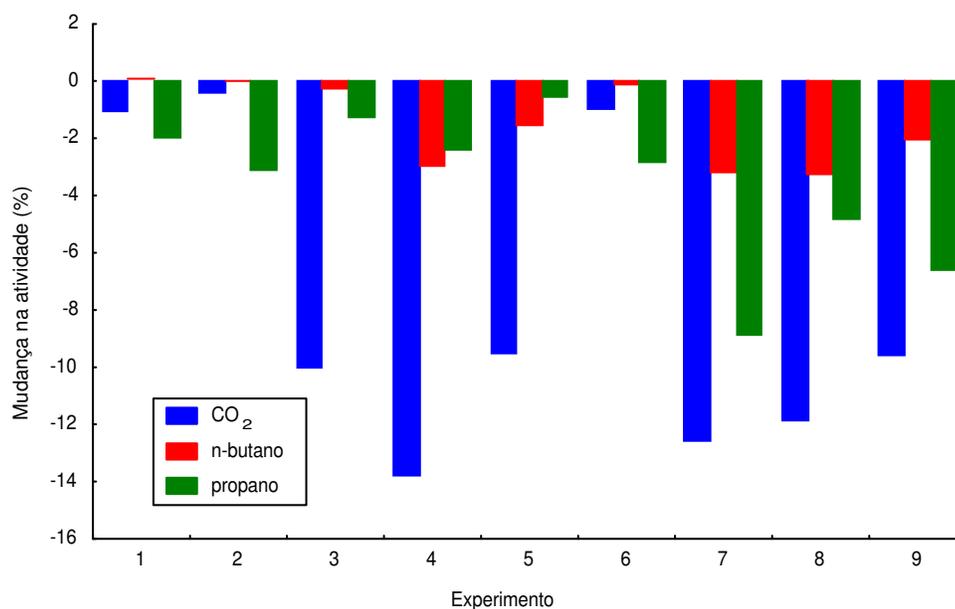


Figura 4.14 – Mudança na atividade enzimática da lipase Lipozyme IM em três solventes pressurizados.

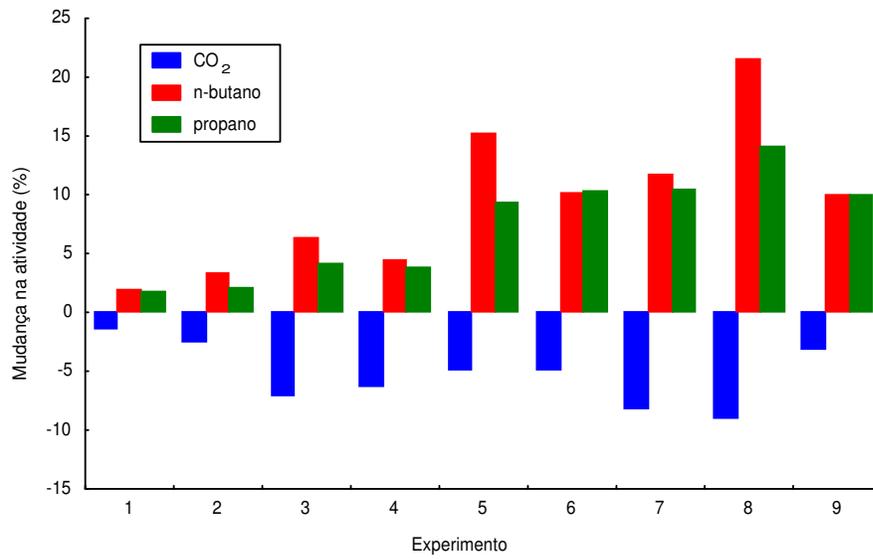


Figura 4.15 – Mudança na atividade enzimática da lipase Novozym 435 em três solventes pressurizados.

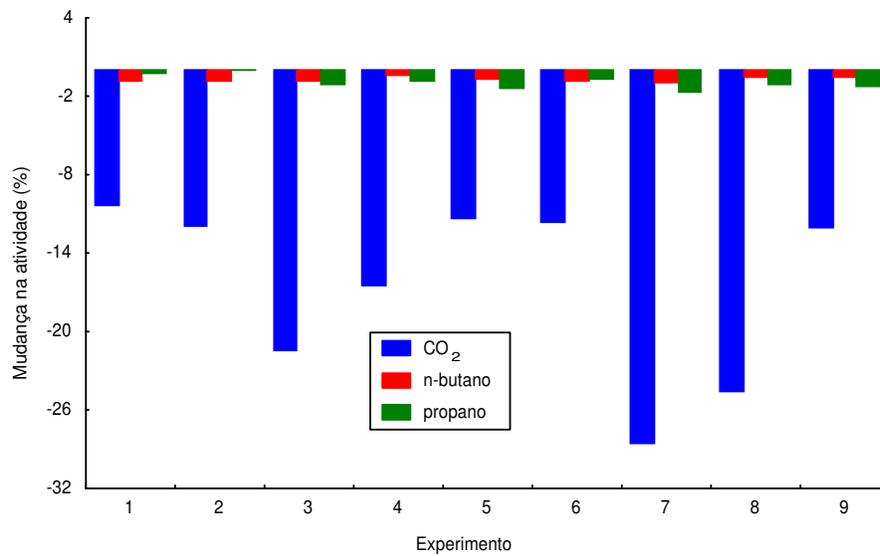


Figura 4.16 – Mudança na atividade enzimática da lipase de *Yarrowia lipolytica* em três solventes pressurizados.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A seguir são apresentadas algumas conclusões a respeito dos diferentes resultados obtidos no estudo da atividade das lipases submetidas a altas pressões bem como sugestões para trabalhos futuros.

### 5.1 Conclusões

A atividade das enzimas Lipozyme IM, Novozym 435 e da lipase de *Yarrowia lipolytica* submetidas aos solventes CO<sub>2</sub>, propano e n-butano a altas pressões foi estudada. O uso do planejamento de experimentos para a atividade das enzimas mostrou ser uma ferramenta interessante para a investigação da influência das variáveis de processo no comportamento das lipases. Modelos empíricos foram construídos para representar os dados experimentais e permitir a determinação das variáveis de processo que mais afetam a estabilidade das lipases estudadas.

A realização do presente trabalho permite, de maneira geral, concluir que:

- As enzimas podem apresentar diferentes comportamentos dependendo do solvente pressurizado utilizado, mesmo quando submetidas às mesmas condições experimentais.
- A enzima Novozym 435 foi a única lipase a obter ganho de atividade em dois solventes.
- As lipases Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica* obtiveram perda de atividade nos três solventes.
- Quando da utilização dos solventes pressurizados pode-se concluir que o CO<sub>2</sub> é o solvente que acarreta maior perda de atividade enzimática, diferentemente do n-butano e propano que se mostraram solventes apropriados na utilização em reações enzimáticas a altas pressões.

## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser apontadas:

- 1) Análise da mudança conformacional ocorrida nas enzimas após serem submetidas a altas pressões através de técnicas como: MEV (Microscopia eletrônica de varredura) e Análise de Infra-vermelho.
- 2) Determinação do teor de água das lipases, visando correlacionar os resultados obtidos com as características dos solventes utilizados.
- 3) Utilização dos resultados obtidos neste trabalho para definir regiões de operação para reações de modificação de óleos e gorduras utilizando lipases imobilizadas como catalisadores.

## REFERÊNCIAS

AFFLECK, R.A.; CLARK, D.S.; KAMAT, S.V. e RUSSEL, A.J. "High pressure EPR studies of protein mobility in reversed micelles". **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, pp. 342, 1994.

ALMEIDA FILHO, C. "Estudo Experimental e Teórico de Coeficientes de Difusão Binários Envolvendo Componentes de Óleos Essenciais em Dióxido de Carbono Supercrítico". Tese de D. Sc., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil, pp. 124, 2003.

ANGUS, S., ARMSTRONG, B., e REUCK, K. M. de. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State**, 1976.

AYALA, G.; TUENA de GOMEZ-PUYOU, A. e DARSZON, A. "Thermoestability of membrane enzymes in organic solvents". **FEBS Letters**, v. 203, n.1, pp.41, 1986.

BASRI, M.; YUNUS, W. Z. W.; YOONG, W. S.; AMPON, K.; RAZAK, C. N. A. e SALLEH, A. B. "Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters". **Journal of Chemical, Technology and Biotechnology**, v. 66, pp. 169-173, 1996.

CARTA, G.; GAINER, J. L. e ZAIDI, A. "Fatty acid esterification using nylon immobilized lipase". **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, pp. 601-605, 1995.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T. e SILVA, D.M. "Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados". **Química Nova**, v. 26, n. 1., pp. 75-80, 2003.

CATONI, E.; CERNIA, E. e PALOCCI, C. "Different aspects of "solvent engineering" in lipase biocatalysed esterifications". **Journal of Molecular Catalysis**, v. 105, pp. 79-86, 1996.

CERNIA, E.; PALLOCI, C. e SORO, S. " The role of the reaction medium in lipase-catalysed esterifications and transesterifications". **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, pp. 157-168, 1998.

CHULALAKSANANUKUL, W., CONDORET, J. S. e COMBES, D. "Geranyl acetate synthesis by lipase catalized transesterification in supercritical carbon dioxide". **Enzyme Microbiology Technology**, v. 15, pp. 691, 1993.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.da G. e SOLDI, V. " Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros". **Química Nova**, v. 27, pp. 623-630, 2004.

DORDICK, J. S. "Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents". **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 11, pp. 194-211, 1989.

FROST, G. M. e MOSS, D. A. "Production of enzymes by fermentation". In: J. F. Kennedy (ed), **Biotechnology Enzyme Technology**, v. 7, VCH Publishers, 1987.

GAMSE, T.; e MARR, R. "Investigation of Influence Parameters on Enzyme Stability during Treatment with Supercritical Carbon Dioxide (SC-CO<sub>2</sub>)". In: **Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Supercritical Fluids**, Atlanta/USA, 2000.

GANDHI, N. N. "Applications of lipase". **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 74, n. 6, pp. 621-634, 1997.

GARZA-RAMOS, G.; DARSZONA, A.; TUENA de GOMEZ-PUYOU, M e GOMEZ-PUYOU, A. "Catalysis and thermostability of mitochondrial F1-ATPase in toluene-phospholipid-low water system". **Biochemistry**, v.28, pp. 3177, 1989.

HABULIN, M.; PRIMOZIC, M. e KNEZ, Z. "Stability of proteinase form *Carica papaya* latex in dense gases". **Journal of Supercritical Fluids**, n.33, pp. 27-34, 2004.

HALLING, P. J. "Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: predictions of effects on equilibrium position". **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 7, pp. 691-701, 1990.

HAMMOND, D.A.; KAREL, M. e KLIBANOV, A.M. "Enzymatic reactions in supercritical gases". **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.11, pp. 393, 1985.

HENDRICKX, M., LUDI KHUYZE, L., VAN Den BROECK e WEEMAES, C. "Effects of high pressure on enzymes related to food quality". **Trends in Food Science & Technology**, pp. 197-203, 1998.

HOYER, G.G. "Extraction with supercritical fluids: why, how and so what". **Chemtech**, July, 1985.

ILLANES, A. "**Biotecnología de enzimas**". Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.

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

KAMAT, S.V.; BECKMAN, E. J. e RUSSEL, A.J. "Enzyme activity in supercritical fluids". **Critical Reviews in Biotechnology**, v.15, pp.41-71, 1995.

KAMAT, S.V.; BARRERA, J.; BECKMAN, E.J. e RUSSEL, A.J. "Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids". **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, pp.158, 1992.

KAMIHIRA, M.; TANIGUCHI, M. e KOBAYASHI, T. "Synthesis of aspartame precursor by enzymatic reaction in supercritical dioxide carbon". **Agricultural Biological Chemistry**, v.51, pp.3427, 1987.

KAO, F.J.; EKHORUTOMWEN, A.S. e SAWAN, S.P. "Residual stability of lipase from *Candida rugosa* in hexane, supercritical CO<sub>2</sub>, and supercritical SF<sub>6</sub>". **Biotechnology Techniques**, v.11, pp. 849-852, 1997.

KASCHE, V.; SCHOLOTHAUES, R e BRUNNER, G. "Enzyme denaturation in supercritical CO<sub>2</sub>: stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step". **Biotechnonology Letters**, v.10, n.8, pp.569, 1988.

KAUFMAN, A. J. e RUEBUSCH, P. J. "Oleochemicals: A world overview". In: **Proceedings of World Conference. on Oleochemica**, Kuala Lumpur, Malaysia, 1990.

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

KNEZ, Z. e HABULIN, M. "Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review". **Journal of Supercritical Fluids**, v.23, pp. 29-42, 2001.

LANGONE, M. A. P. "**Síntese de triglicerídeos catalisada por lipase**". Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998.

LANZA, M.; PRIAMO, W. L.; OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C. e OLIVEIRA, D. "The effect of temperature, pressure, exposure time and depressurization rate on lipase activity in SCCO<sub>2</sub>". **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113-116, pp.181-187, 2004.

LANZA, M. “**Comportamento de fases dos óleos de oliva, soja e mamona em n-butano e propano a alta pressão**“. Tese de M. Sc., Universidade Regional Integrada – Erechim-RS, Brasil, 2004.

MACRAE, A. R. e HAMMOND, R. C. “Present and future applications of lipases”. **Biotechnology and Genetic Reviews**, v. 3, Intercept Ltd., 1985.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G. e AMUNDSON, C. H. “Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - A review”. **Journal of the American Oil Chemist Society**, v.67, pp.890-910, 1990.

MARTY, A.; CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; WILLEMOT, R. M. e DURAND, G. “Comparison of lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane”. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 1, pp. 11-16, 1990.

MARTY, A.; CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S. e WILLEMOT, R. M. “Kinetics of lipase-catalysed esterification in supercritical CO<sub>2</sub>”. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, pp. 273-280, 1992.

McHUGH, M. e KRUKONIS, V. *Supercritical Fluid Extraction*, Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.

MONOT, F. “La catalyze enzymatique in milieu organique”. **Revue de L’institut Français du Pétrole**, v. 49, n. 2, pp. 187-208, 1994.

MUSTRANTA, A.; FORSSELL, P. e POUTANEN, K. “Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems”. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 15, pp. 133-139, 1993.

NAKAMURA, K., CHI, Y.M.; YAMADA, Y e YANO, T. “Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide”. **Chemical Engineering Community**, v.45, pp. 207, 1985.

NOVO NORDISK. **Manual técnico das enzimas Lipozyme IM e Novozym 435**. 2001.

OLIVEIRA, D. “**Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO<sub>2</sub> supercrítico**”. Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro- COPPE, RJ, Brasil, 1999.

OLIVEIRA, D e OLIVEIRA, J. V. “Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in SC-CO<sub>2</sub>”. **Industrial & Engineering Chemical Research**, Estados Unidos, v. 39, pp. 4450-4454, 2000.

OLIVEIRA, D e OLIVEIRA, J. V. “Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SC-CO<sub>2</sub>”. **Journal of Supercritical Fluids**, Estados Unidos, v. 19, pp. 141-148, 2001.

PASTA, P.; MAZZOLA, G.; CARREA, G. e RIVA,S. “Subtilisina catalysed transesterification in supercritical dioxide carbon”. **Biotechnology Letters**, v.2, pp.643, 1989.

PENNISTON, J.T., Arch. Biochem. Biophys., v.142, pp.322, 1971, citado por: KAMAT, S.V.; BECKMAN, E. J. e RUSSEL, A.J. “Enzyme activity in supercritical fluids”. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.15, pp.41-71, 1995.

PINTO, J. C.; NORONHA, F. B.; MONTEIRO, J. L.; LOBÃO, M. W. e SANTOS, T. J. “**ESTIMA: um pacote computacional para estimação de parâmetros e projetos de experimentos**”. PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1987.

PRAZERES, D. M. F.; GARCIA, F. A. P. e CABRAL, J. M. S. “Na ultrafiltration membrane reactor for the lipolysis of olive oil in reversed micellar media”. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, pp. 761-770, 1993.

RANDOLPH, T.W.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, C.R. e WILKE, C.R. "Enzymatic Catalysis in a Supercritical Fluid". **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 5, pp. 325-328, 1985.

RANDOLPH, T.W.; CLARK, D.S.; BLANCH, H.W. e PRAUSNITZ, J.M. "Cholesterol aggregation and interaction with cholesterol oxidase in supercritical carbon dioxide", In: **Proceedings of National Academy Science**, USA, v. 85, pp. 2979, 1988.

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

RUSSEL, A.J. e BECKMAN, E.J. "Should the high diffusivity of a supercritical fluid increase the rate of an enzyme-catalysed reaction". **Enzyme Microbiology and Technology**, v.13, pp.1007, 1991.

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

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

SIVIK, B. e GUNNLAUGSDOTTIR, H. "Lipase catalysed alcoholysis of cod liver oil in supercritical carbon dioxide". **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.72, pp. 399-405, 1995.

STEINBERGER, D.; GAMSE, T. e MARR, R. "Enzyme Inactivation and Prepurification Effects of Supercritical Carbon Dioxide". In: **Proceedings of Fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications**, pp. 339-346, Itália, 1999.

STEYTLER, D.C.; MOULSON, P.S. e REYNOLDS, J. "Biotransformation in near critical carbon dioxide". **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, pp. 221, 1991.

TANAGUCHI, M.; KAMIHIRA, M. e KOBAYASHI, T. "Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity", **Agricultural Biological Chemistry**, v.51, n.2, pp. 593-596, 1987.

van DER PADT, A. "**Enzymatic acylglycerol síntesis in membrane reactor**". Ph.D. dissertation, Landbouwwuniversiteit te Wageningen, Holanda, 1993.

YANG, Z. e RUSSEL, A. J. "Fundamentals of non-aqueous enzymology". In: Koskinen, A. M. D. e Klibanov, A. M. (eds), **Enzymatic Reactions in Organic Media**, 1ª ed., London, Blackie Academic & Professional, 1996.

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, pp. 421, 1993.

ZAKS, A. e KLIBANOV, A. M. "Enzyme catalyzed processes in organic solvents". **Proceedings of National Academy Science**, v. 82, pp. 3192, 1985.

ZAKS, A e KLIBANOV, A.M. "Why does ribonuclease irreversibly inactive at high temperatures?". **Biochemistry**, pp. 5432, 1986.



