

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE LIPASES
EM PROPANO PRESSURIZADO**

LUIZ PAULO GOMES FRANKEN

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 2007

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE LIPASES EM
PROPANO PRESSURIZADO

LUIZ PAULO GOMES FRANKEN

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:

Débora de Oliveira, D. Sc.
Orientadora

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.
Orientador

Cláudio Dariva, D. Sc.
Orientador

Jorge Luiz Ninow, D. Sc.

Marco Di Luccio, D. Sc.

Erechim, março de 2007.

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 a Deus por ter me dado a oportunidade de estar aqui.

À Orientadora Débora pelo carinho e empenho dispensado e, principalmente, à motivação para que este trabalho fosse realizado.

Ao Orientador Vladimir pela motivação e troca de conhecimentos quando necessários.

Ao Orientador Dariva pelas informações compartilhadas.

À Colega Naiane que não mediu esforços na realização deste trabalho.

À Professora Helen que colaborou efetivamente na análise dos resultados obtidos.

Aos professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, pelas palavras de apoio e preocupação demonstradas.

Ao colega Juncimar pelo companheirismo nestes dois anos de estudos.

Aos colegas de curso pela participação e apoio nas horas difíceis.

A todos outros de uma forma em geral que me auxiliaram nas horas de estudo.

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 HIDROLÍTICA DE LIPASES EM PROPANO PRESSURIZADO

Luiz Paulo Gomes Franken

Março/2007

Orientadores: Débora de Oliveira
 José Vladimir de Oliveira
 Cláudio Dariva

Lipases microbianas (E.C. 3.1.1.3) têm sido largamente empregadas em uma série de aplicações. A utilização destas enzimas na forma imobilizada confere a estas vantagens em termos de controle do processo, aumento da estabilidade, produtos isentos de catalisador, etc. Além disso, as vantagens na utilização de fluidos comprimidos em substituição aos solventes orgânicos convencionais tem sido objeto de intensas pesquisas devido às propriedades favoráveis de transporte, facilidade na recuperação de produtos e redução de reações secundárias. Visando a condução de reações enzimáticas a altas pressões, a avaliação do comportamento da atividade enzimática é de fundamental importância uma vez que a perda de atividade pode conduzir a baixas taxas de reação. Entre algumas substâncias viáveis, o propano parece ser promissor como meio alternativo. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo investigar a influência da temperatura (35-55°C), pressão (30-200bar), taxa de descompressão (2-50 bar.min⁻¹) e tempo de exposição (0.5 a 3h) na atividade hidrolítica de três lipases (Amano PS, Amano AY30 e lipase de *Yarrowia lipolytica*) nas formas livre, ressuspensa e imobilizada. Visando verificar o efeito das variáveis na atividade enzimática, um planejamento experimental com 2 níveis foi empregado. O equipamento utilizado em todos os experimentos consiste basicamente de uma célula com três janelas de safira de 28mL, um transdutor de pressão e uma bomba de seringa. A lipase foi alimentada ao reator e a temperatura estabelecida no planejamento de experimentos foi monitorada. Em seguida, o sistema foi pressurizado e a pressão e temperatura foram mantidas constantes pelo tempo pré-determinado. A seguir, na taxa de descompressão pré-definida, o sistema foi despressurizado e a atividade hidrolítica foi medida. De uma forma geral, para as lipases livres e imobilizadas, foi observado um aumento na atividade residual. No caso das lipases ressuspensas, foi demonstrado que a cinética enzimática é sensível ao tratamento com propano pressurizado, conduzindo em alguns casos a ganhos inexpressivos e em outros a perdas significativas da atividade enzimática.

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

EVALUATION OF HYDROLYTIC ACTIVITY OF LIPASES IN PRESSURIZED PROPANE

Luiz Paulo Gomes Franken

Março/2007

Orientadores: Débora de Oliveira
 José Vladimir de Oliveira
 Cláudio Dariva

Microbial lipases (E.C. 3.1.1.3) have been increasingly employed in a broad range of applications. Its immobilization offers unique advantages in terms of better process control, enhanced stability, enzyme-free products, etc. In addition, the advantages of using compressed or near critical fluids over liquid organic solvents have been a matter of intense research due to their favorable transport properties, recovery of products or reactants and reduction in side reactions. To conduct such reactions at high pressures, the evaluation of enzyme behavior is of primary importance as the loss of enzyme activity may lead to undesirable poor reaction rates. Among some interesting substances, propane appears to be promising as alternative medium. In this sense, this work investigates the influence of temperature (35-55°C), pressure (30 to 200bar), decompression rates (2-50 bar.min⁻¹) and exposure times (0.5 to 3h) on the hydrolytic activity of three lipases (Amano PS, Amano AY30 and a lipase from *Yarrowia lipolytica*) free, re-suspended and immobilized. In order to verify the effect of process variables on the lipase activity, a semi-factorial experimental design with two levels was employed. The equipment used in all experiments consists basically of a 28mL view cell with three sapphire windows for visual observations, an absolute pressure transducer and a syringe pump. The lipase (approximately 1.0g) was fed into the cell and the temperature established in the experimental design was reached. Afterwards, the system was pressurized and maintained at constant temperature and pressure for a pre-established exposure time. Then, at the decompression rates defined, the system was depressurized and the lipase activity was measured. The residual activity was defined as the ratio of activity at the beginning and at the end of the treatment process. Generally, for free and immobilized lipases, it was observed an enhancement in residual lipase activity with values as high as ~300%. In the case of re-suspended enzyme, it is shown that enzyme kinetics is very sensitive to treatment variables with compressed propane leading in some cases to expressive gains and important activity losses.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
 1 INTRODUÇÃO	 01
 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 04
2.1 Introdução	04
2.2 Lipases	04
2.2.1. Atividade enzimática	05
2.2.2. Enzimas imobilizadas	06
2.3 Enzimas em fluidos pressurizados	07
2.4 Considerações Finais	13
 3 MATERIAIS E MÉTODOS	 14
3.1 Material.....	14
3.2 Métodos	15
3.2.1 Preparo das soluções enzimáticas para avaliação da atividade de hidrólise em propano pressurizado	15
3.2.2 Método para determinação da atividade de hidrólise das lipases	17
3.3 Processamento das lipases com propano pressurizado.....	18
3.3.1 Lipases liofilizadas e imobilizadas	19
3.3.2 Lipases em solução (ressuspendidas)	21
3.4 Planejamento de Experimentos e Análise Estatística	22
 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 26
4.1 Atividade hidrolítica da lipase PS Amano em propano pressurizado .	26
4.2 Atividade hidrolítica da lipase AY30 Amano em propano pressurizado.....	37

4.3 Atividade hidrolítica da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> em propano pressurizado	44
4.4 Considerações Finais	52
 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	57
5.1. Conclusões	57
5.2. Sugestões	58
 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
 7 ANEXOS	65
Anexo I Atividade residual das lipases PS e AY30 (Amano Inc.) e de <i>Yarrowia lipolytica</i> ressuspendidas em propano pressurizado em função da pressão e da temperatura	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Amostra das lipases utilizadas. (1) Lipases livres; (2) Lipases imobilizadas; (a) Amano AY30; (b) Amano PS e (c) lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>	17
Figura 3.2 – Diagrama esquemático do aparato experimental para o tratamento das lipases sólidas em propano pressurizado. A - reservatório de solvente; B - banho termostático; C – bomba seringa; D – reator de aço inoxidável; E – transdutor de pressão; F – indicador de pressão; G – válvula micrométrica.....	19
Figura 3.3 – Fotos da unidade experimental utilizada para avaliação da atividade de hidrólise de lipases liofilizadas e imobilizadas em propano pressurizado.....	20
Figura 3.4 – Diagrama esquemático do aparato para o tratamento de lipases ressuspendidas em propano pressurizado. A – reservatório de solvente; B – banho termostático; C – bomba seringa; D – transdutor e indicador de pressão; E – célula com janela de safira de volume variável; F – janelas de safira; G – válvula para amostragem; H – válvula micrométrica para despressurização, I - pistão.....	22
Figura 3.5 – Fotos da unidade experimental utilizada para avaliação da atividade de hidrólise de lipases ressuspendidas em propano pressurizado.....	23
Figura 4.1. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano PS liofilizada após tratamento em propano pressurizado.....	27
Figura 4.2. Atividade residual da lipase Amano PS ressuspendida em função do tempo de exposição ao propano pressurizado.....	30
Figura 4.3. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano PS ressuspendida após tratamento por 30 minutos em propano pressurizado.....	31
Figura 4.4. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano PS ressuspendida após tratamento por 180 minutos em propano pressurizado.....	32

Figura 4.5. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano PS imobilizada após tratamento em propano pressurizado.....	35
Figura 4.6. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano AY30 liofilizada após tratamento em propano pressurizado.....	39
Figura 4.7. Atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspensa em função do tempo de exposição ao propano pressurizado.....	40
Figura 4.8. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspensa após tratamento por 30 minutos em propano pressurizado.....	41
Figura 4.9. Superfície de resposta e curva de contorno da atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspensa após tratamento por 180 minutos em propano pressurizado.....	43
Figura 4.10. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> liofilizada após tratamento em propano pressurizado.....	46
Figura 4.11. Atividade residual da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> ressuspensa em função do tempo de exposição ao propano pressurizado.....	48
Figura 4.12. Superfície de resposta e curva de contorno da atividade residual da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> ressuspensa após tratamento por 30 minutos em propano....	50
Figura 4.13. Superfície de resposta e curva de contorno da atividade residual da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> ressuspensa após tratamento por 180 minutos em propano pressurizado.....	51
Figura 4.14. Compilação dos resultados de atividade residual em função da lipase liofilizada utilizada após processamento em propano pressurizado.....	53
Figura 4.15. Compilação dos resultados de atividade residual em função da lipase ressuspensa. Condição experimental de 35°C e 200bar.....	53

Figura 4.16. Compilação dos resultados de atividade residual em função da lipase ressuspendida. Condição experimental de 55°C e 200bar.....54

Figura 4.17. Compilação dos resultados de atividade enzimática em função da lipase ressuspendida para cada condição experimental. (a) após 30 minutos de exposição, (b) após 180 minutos de exposição.....55

Figura 4.18. Compilação dos resultados de atividade enzimática em função da forma de apresentação (imobilizada e liofilizada) da lipase Amano PS.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Preparo das soluções enzimáticas para avaliação da atividade de hidrólise em propano pressurizado.....	17
Tabela 3.2 – Intervalo de estudo das variáveis para os sistemas contendo lipases liofilizadas e imobilizadas e propano pressurizado.....	24
Tabela 3.3 – Intervalo de estudo das variáveis para os sistemas contendo lipases ressuspendidas e propano pressurizado.....	24
Tabela 3.4 – Matriz experimental (planejamento fatorial saturado) empregada no estudo da atividade das lipases liofilizadas e imobilizadas em propano pressurizado.....	24
Tabela 3.5 – Matriz experimental (planejamento fatorial completo) empregada no estudo da atividade das lipases ressuspendidas em propano pressurizado.....	25
Tabela 4.1. Atividade residual da lipase Amano PS liofilizada após tratamento com propano pressurizado.....	27
Tabela 4.2. Atividade residual da lipase Amano PS ressuspendida após tratamento com propano pressurizado em função do tempo de processamento.....	30
Tabela 4.3. Atividade residual da lipase Amano PS imobilizada após tratamento com propano pressurizado.....	34
Tabela 4.4. Atividade residual da lipase Amano AY30 liofilizada após tratamento com propano pressurizado.....	38
Tabela 4.5. Atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspendida após tratamento com propano pressurizado em função do tempo de processamento.....	40
Tabela 4.6. Análise de variância para a atividade residual em função da temperatura e da pressão para a lipase Amano AY30 após 180 minutos de processamento em propano pressurizado.....	42

Tabela 4.7. Atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* liofilizada após tratamento com propano pressurizado.....45

Tabela 4.8. Atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* ressuspensa após tratamento com propano pressurizado em função do tempo de processamento.....47

Tabela 4.9. Análise de variância para a atividade residual em função da temperatura e da pressão para a lipase de *Yarrowia lipolytica* após 30 minutos de processamento em propano pressurizado.....49

Tabela 4.10. Análise de variância para a atividade residual em função da temperatura e da pressão para a lipase de *Yarrowia lipolytica* após 180 minutos de processamento em propano pressurizado.....49

1. INTRODUÇÃO

A descoberta das enzimas data do século XVIII, quando se iniciaram os estudos sobre a digestão dos alimentos. Estas têm como uma das características principais a alta seletividade, o que permite seu uso em diversas áreas, como na medicina, na tecnologia de alimentos, na produção de fármacos, emulsificantes e biodiesel (LEHNINGER, 1995). Considerando as propriedades particulares das enzimas, o uso destas em síntese orgânica tem recebido muita atenção nos últimos anos (BEVILAQUA *et al.*, 2004; TORRE *et al.*, 2006; CHUA e SARMIDI, 2006; MARIA *et al.*, 2006).

Dentre os processos enzimáticos empregados atualmente, cerca de 95% dos mesmos 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 de triglicerídeos 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 ao pH, termoestabilidade, resistência a solventes orgânicos, especificidade, regioseletividade e estereosseletividade (SHARMA *et al.*, 2001).

Em geral, a utilização de lipases como biocatalisadores é acompanhada do emprego de solventes orgânicos líquidos para melhorar a estabilidade da mesma e permitir o adequado contato entre os substratos e o(s) centro(s) ativo(s) da enzima. Neste sentido, esforços consideráveis têm sido apresentados na literatura no sentido da realização de reações utilizando tecnologias limpas conduzidas em fluidos sub e supercríticos (KNEZ e HABULIN, 1998; KUMAR *et al.*, 2004; OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2000). O uso de fluidos comprimidos como solventes para reações químicas pode ser uma rota promissora no sentido de eliminar traços de solvente dos produtos reacionais. Adicionalmente, processos industriais em condições próximas ao ponto crítico podem ser vantajosos em termos do consumo de energia, facilidade de recuperação do produto e minimização da formação de produtos secundários. O dióxido de carbono supercrítico possui características especiais tais como

baixa toxicidade, temperaturas de trabalho compatíveis com o uso de enzimas e propriedades de transporte que podem acelerar taxas de reação limitadas difusionalmente (KNEZ e HABULIN, 1998).

Comparado a outros gases, o dióxido de carbono tem sido largamente estudado como meio solvente para reações enzimáticas. Contudo, várias desvantagens na utilização deste fluido podem estar relacionadas à não polaridade deste, o que implica em problemas de dissolução de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos. Além disso, as características hidrofílicas do dióxido de carbono podem afetar negativamente a atividade de enzimas (NAKAYA *et al.*, 2001).

No entanto, o dióxido de carbono não é o único gás cujas propriedades possam ser adequadas à biocatálise. Por exemplo, a comparável constante dielétrica entre o propano e o dióxido de carbono (HABULIN e KNEZ, 2001) e o fato de que pressões de transição muito mais elevadas são geralmente encontradas em sistemas formados por compostos de alta massa molar (triglicerídeos, por exemplo) quando comparados ao uso do propano (LANZA *et al.*, 2005; NDIAYE *et al.*, 2006) suportam um firme propósito de que o propano possa ser também compatível como meio para reações catalisadas por enzimas.

Visando a realização de reações enzimáticas a altas pressões, de fundamental importância é a avaliação do comportamento das enzimas nestes fluidos, uma vez que a perda de atividade pode levar a baixas taxas de reação e formação de produtos secundários (KASCHE *et al.*, 1988). De fato, a estabilidade e atividade enzimáticas podem depender da enzima, das características do solvente, do conteúdo de água da enzima/suporte/meio reacional e das variáveis de processo envolvidas, significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema sob investigação.

Com base em alguns resultados da literatura (TANIGUCHI *et al.*, 1987; TEDJO *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 1992; ISHIKAWA *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2006a e 2006b; GIEBAUF e GAMSE, 2000; FRICKS *et al.*, 2006), que revelam que algumas enzimas aumentam suas atividades e outras diminuem/perdem suas atividades após tratamento com fluidos comprimidos, o uso destes solventes pode ser uma alternativa interessante não somente para

conduzir reações enzimáticas, mas também aumentar a atividade dos sistemas enzimáticos ou inativar/reduzir sua atividade. Uma breve investigação da literatura revela que, enquanto existe uma quantidade de dados relativamente grande relacionada à atividade e estabilidade de enzimas em dióxido de carbono, existe uma lacuna correspondente à informação experimental para outros solventes comprimidos, tais como propano.

Neste contexto, com base na literatura relacionada ao potencial de aplicação de lipases em reações de interesse, nas propriedades indesejáveis dos solventes orgânicos, nas pressões de transição relativamente elevadas quando da utilização de dióxido de carbono supercrítico como solvente, surgiu o interesse em investigar o comportamento da atividade de hidrólise de lipases em propano pressurizado. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo geral avaliar o efeito do processamento a alta pressão (propano pressurizado) sobre a atividade de lipases (livres - liofilizadas e ressuspensas - e imobilizadas) comerciais e não comerciais. Como objetivos específicos avaliou-se a influência das variáveis temperatura, tempo de exposição, taxa de despressurização e pressão na atividade de hidrólise de duas lipases comerciais (Amano AY30 e Amano PS) e uma não comercial obtida por fermentação submersa de *Yarrowia lipolytica*, submetidas ao tratamento com propano pressurizado. Os resultados desta avaliação poderão se constituir em importante contribuição à utilização destes biocatalisadores na realização de reações de interesse na área de fármacos e alimentos, principalmente.

O presente trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: o Capítulo 2 aborda uma revisão sucinta a respeito do tema investigado neste projeto de pesquisa. No Capítulo 3 são apresentados os materiais e os métodos empregados na presente investigação, bem como a metodologia adotada para obtenção das informações experimentais pertinentes. O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e discussão dos mesmos à luz do cenário disponível na literatura. Por fim, o Capítulo 5 explicita as conclusões referentes à execução de todo o projeto bem como sugere certos aspectos passíveis de investigação mais acurada e novas frentes no campo em questão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No capítulo a seguir será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no qual este trabalho está inserido, procurando evidenciar a relevância do tema sob investigação para a literatura científica. No transcorrer deste, será realizada primeiramente uma explanação sobre enzimas e suas características. A seguir, especial atenção será dada ao comportamento e variáveis que influem na atividade de enzimas em fluidos pressurizados, foco deste estudo.

2.1. Introdução

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 e ser alternativa para geração de renda e desenvolvimento sustentável. 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 podem ser citadas as reações de hidrólise e a síntese de ésteres na presença de catalisadores químicos (ácidos e bases) ou enzimáticos (KAUFMAN e RUEBUSCH, 1990).

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. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente uma vez que além das vantagens supracitadas, são, geralmente mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (CARVALHO *et al.*, 2003). Em geral, os microrganismos mais utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor*.

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). Apresentam peso molecular entre 20.000-60.000 daltons. São glicoproteínas, na qual a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo.

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 da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (MACRAE e HAMMOND, 1985).

2.2.1. Atividade enzimática

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

Cabe neste ponto salientar a especificidade que as lipases podem apresentar pelo substrato, podendo catalisar reações em meio aquoso (atividade de hidrólise) e em meio não aquoso (atividade de esterificação). 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).

2.2.2. Enzimas imobilizadas

Uma das grandes vantagens da catálise em meio não aquoso é que as enzimas são insolúveis em praticamente todos os solventes orgânicos e/ou fluidos pressurizados. Contudo, quando enzimas livres estão suspensas em solventes não aquosos, elas tendem a agregar-se e prendem-se às paredes do reator, principalmente quando água é adicionada a este sistema como substrato ou para aumentar a atividade enzimática. Este problema pode ser minimizado através da imobilização de enzimas em suportes sólidos. A imobilização da enzima pode também minimizar o efeito desnaturante de muitos destes solventes sobre a estrutura da proteína (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). Estas vantagens, além da possibilidade de reutilização do biocatalisador ao final do processo, têm determinado estudos envolvendo lipases imobilizadas.

No entanto, aliado ao custo da etapa de imobilização destas enzimas, tal processo também adiciona uma limitação adicional de transferência de massa, fazendo com que o contato dos substratos com os sítios ativos das enzimas sejam mais limitados do que quando a enzima se encontra na sua forma livre em suspensão. Neste sentido, alguns trabalhos na literatura apontam para o emprego de solventes alternativos, como os fluidos pressurizados em condições próximas ao ponto crítico, com vistas ao aumento das taxas de

transferência de massa da reação e considerando também as propriedades peculiares de tais fluidos no que tange à facilidade da separação de produtos/substratos, faixas operacionais e vantagens ambientais do emprego de tais fluidos. A próxima seção apresenta uma breve discussão sobre o emprego de enzimas em sistemas com fluidos pressurizados.

2.3. Enzimas em Fluidos pressurizados

A concepção de fluido supercrítico faz referência a um estado da matéria em que o composto se comporta como fluido, pois apresenta propriedades intermediárias entre a de um gás e de um líquido e também se refere ao fato de uma substância se encontrar em uma condição de temperatura e pressão acima dos valores críticos. No ponto crítico, as fases gasosa e líquida tornam-se idênticas, isto é, só uma fase existe (ALMEIDA FILHO, 2003).

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. Os FSC possuem densidades próximas a dos líquidos, 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 (OLIVEIRA, 1999).

A catálise enzimática em fluidos pressurizados apresenta interesse particular para as indústrias farmacêuticas e de alimentos, principalmente devido à facilidade de recuperação dos produtos, livres de solventes, ao final do processo. É importante salientar que em geral o solvente pode afetar fortemente a atividade da enzima através de sua interação com o suporte, no caso de enzimas imobilizadas, ou mesmo com radicais da própria enzima. Neste contexto, como etapa anterior à utilização de enzimas como catalisadores de reações em fluidos supercríticos, de fundamental importância é a avaliação de seu comportamento nestes solventes alternativos aos orgânicos convencionais (FEIHRMANN, 2005; PRIMO, 2006).

Como trabalhos pioneiros nesta área, podem ser citados os estudos de RANDOLPH *et al.* (1988); 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 é atrativo por várias razões. Uma enzima em um solvente não aquoso pode possuir interações solvente/enzima similares às aquelas 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. Com base nestes aspectos, os fluidos supercríticos começaram a ser considerados como meio potencial para catálise enzimática (OLIVEIRA, 1999).

Visando a realização de reações enzimáticas a altas pressões, primeiramente, é necessário conhecer as variáveis que podem afetar a catálise enzimática em fluidos pressurizados.

Pressão:

Uma pequena mudança na pressão é observada por uma mudança drástica na densidade nas proximidades do ponto crítico de uma substância, desta forma alterando as propriedades físico-químicas de um fluido supercrítico (Mc HUGH e KRUKONIS, 1998). Desde que as propriedades do solvente podem modular as propriedades da enzima suspensa neste, o efeito da pressão em reações de catálise enzimática em fluidos supercríticos é uma área potencial para o desenvolvimento de pesquisas.

Água:

Solventes mais hidrofílicos apresentam uma tendência maior em retirar a água essencial para molécula da enzima. Este princípio pode também ser aplicado a sistemas envolvendo fluidos supercríticos. Geralmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento do conteúdo de água adicionado ao fluido supercrítico, até que a mesma atinja um máximo. Além disso, acima do

conteúdo ótimo de água, as suspensões das enzimas formam agregados, resultando em uma redução do contato enzima-substrato, reduzindo assim, a eficiência da enzima. 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 e OLIVEIRA, 2000 e 2001).

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 a 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.

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. 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 a 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, dielectricamente 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).

Solvente:

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).

Temperatura:

A maioria das enzimas possui atividade bastante específica, capaz de catalisar só uma determinada reação e de fazê-la só em um tipo de meio ou substrato. Algumas enzimas são mais versáteis. Entretanto, todas as enzimas operam dentro de um limite estreito de temperatura e pH (COX, 1987). Grande parte das enzimas apresenta sua atividade ótima em uma faixa de 30 a 40°C, sendo que acima de 45°C pode ocorrer início da desnaturação (FENNEMA, 1993). Enquanto algumas enzimas perdem sua atividade catalítica a baixas temperaturas, outras suportam, ao menos durante um curto período de tempo, um intenso tratamento térmico (BELITZ e GROSCH, 1997).

Com base no conhecimento destes fatores, de fundamental importância é a avaliação do comportamento da atividade enzimática do catalisador de interesse no fluido pressurizado a ser empregado. Tal aspecto encerra prioridade como etapa anterior à consecução de reações neste meio alternativo, uma vez que resultados antagônicos podem ser encontrados na

literatura, principalmente em função do biocatalisador. De fato, a estabilidade e atividade enzimáticas podem depender da enzima, das características do fluido comprimido, do conteúdo de água da enzima/suporte/meio reacional e das variáveis de processo envolvidas, significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema sob investigação.

Por exemplo, com relação ao tratamento de enzimas em CO₂ comprimido, alguns trabalhos apresentados na literatura indicam que a atividade de α -amilase, glicose oxidase, lipase e catalase tratadas com CO₂ supercrítico (SCCO₂) mantêm acima de 90% de sua atividade inicial (TANIGUCHI *et al.*, 1987). Por outro lado, total inativação da lipoxigenase e peroxidase foi obtida no tratamento com SCCO₂ de soluções não tamponadas (TEDJO *et al.*, 2000). A atividade de polifenol oxidases (PPOs) foi reduzida significativamente após processamento com SCCO₂ (CHEN *et al.*, 1992). ISHIKAWA *et al.* (1996) reportaram que várias enzimas, tais como lipases, proteases alcalinas e glicoamilases, foram inativadas e suas estruturas de α -hélice foram decompostas após tratamento com SCCO₂. OLIVEIRA *et al.* (2006a e 2006b) reportaram que lipases imobilizadas apresentaram pequenas perdas de atividade no processamento com dióxido de carbono comprimido. Por outro lado, GIEBAUF e GAMSE (2000) reportaram um aumento na atividade lipásica acima de 860% após tratamento com SCCO₂ comparado às enzimas não processadas. FRICKS *et al.* (2006) encontraram que a atividade residual de peroxidase de rabanete pode ser aumentada ou reduzida dependendo da condição de processamento em CO₂.

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

Em estudos de processamento hidrostático, um dos poucos trabalhos apresentados na literatura referente à avaliação da atividade de enzimas ressuspendidas, realizado por SEYDERHELM *et al.* (1996), avaliou o efeito da alta pressão sobre algumas enzimas em tampão fosfato, sendo que a sensibilidade à pressão em ordem ascendente foi: lipoxigenase, lactoperoxidase, pectinesterase, lipase, fosfatase, catalase, polifenoloxidase e peroxidase. Os autores observaram também que o aumento da temperatura induziu a uma maior inativação dessas enzimas.

2.4. Considerações Finais

Tendo como base os aspectos apresentados no decorrer deste capítulo no que se refere ao potencial de aplicação de lipases em fluidos pressurizados para reações de interesse industrial, pôde-se verificar que, para este biocatalisador em específico, poucos trabalhos concernentes ao comportamento desta enzima em fluidos pressurizados (mais especificamente, propano) estão disponíveis na literatura. Levando em consideração este fato e o grande interesse na realização de reações de hidrólise enzimática para produção de compostos de alto valor agregado (fármacos obtidos por resolução enzimática de misturas racêmicas, por exemplo), configurou-se a proposta deste trabalho, que tem como principal objetivo avaliar o comportamento da atividade hidrolítica de três lipases, duas comerciais (Amano PS e Amano AY30) e uma não comercial (obtida por fermentação submersa de *Yarrowia lipolytica*) em propano pressurizado, visando estabelecer faixas de operação – temperatura, pressão, taxa de despressurização e tempo de exposição - para utilização destas como catalisadores em reações de hidrólise de interesse. Outro aspecto importante que o presente trabalho vem a contribuir é na avaliação da atividade das lipases nas formas livre (liofilizada e ressuspendida em solução tampão) e imobilizada, aspecto este ainda não explorado na literatura relacionada a lipases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente capítulo serão listados os materiais e métodos utilizados para avaliar o efeito do processamento com propano pressurizado na atividade de lipases (livres – liofilizadas e ressuspensas - e imobilizadas) comerciais e não comerciais.

3.1 Material

Foram utilizados os seguintes reagentes na etapa de determinação da atividade de hidrólise das lipases: goma arábica (Synth), tampão fosfato de sódio (Synth), acetona (99,5% de pureza - Quimex), álcool etílico comercial (95% de pureza - Quimex), hidróxido de sódio (Quimex) e óleo de oliva (Arisco).

O solvente utilizado foi o propano (99,5% de pureza em fase líquida) procedente da AGA. As propriedades críticas do solvente (massa molar 44,09g/gmol) são: pressão crítica 72,5bar; temperatura crítica 96,7°C e densidade crítica 0,22g/cm³ (REID *et al.*, 1987).

Duas lipases comerciais (Amano Inc.) e uma não comercial (gentilmente cedida pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química da UFRJ/RJ) na forma granulada livre (lipases liofilizadas) foram utilizadas na realização deste trabalho. As características específicas das três lipases liofilizadas são apresentadas a seguir:

- a) Amano AY30: Lipase obtida por fermentação submersa de *Candida rugosa*, não possui atuação específica em nenhuma posição do triglicerídeo e apresenta temperatura ótima de operação em torno de 60°C.
- b) Amano PS: Lipase obtida por fermentação submersa de *Burkholderia cepacia*, não atua especificamente em nenhuma posição do triglicerídeo e apresenta faixa ótima de temperatura entre 50 e 60°C.
- c) *Yarrowia lipolytica*: Obtida por fermentação submersa de *Yarrowia lipolytica* em meio constituído (m/v) de 1% de glicose, 3% de extrato de soro de leite, 0,8% de sulfato de sódio, 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. Esta lipase apresenta temperatura ótima em torno de 40°C e estudos acerca da especificidade em relação à posição do triglicerídio ainda não foram realizados.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo das soluções enzimáticas para avaliação da atividade de hidrólise em propano pressurizado

Esta seção tem por objetivo descrever o preparo das soluções enzimáticas (lipase livre liofilizada, lipase livre ressuspensa e lipase imobilizada) para posterior avaliação da atividade em propano pressurizado.

a. Lipases liofilizadas: Para a realização do tratamento com propano pressurizado utilizando as lipases livres liofilizadas, 0,5g da amostra foram submetidas às condições definidas no planejamento experimental. Para a avaliação da atividade hidrolítica antes e após o processamento, 0,1g desta amostra foi solubilizada em 10mL de tampão fosfato pH 7,0. Desta solução, 1mL foi retirado para determinação da atividade enzimática, cujo procedimento será descrito posteriormente.

b. Lipases ressuspensas: Na avaliação da atividade de hidrólise para as lipases livres na forma ressuspensa, foram preparadas soluções em diferentes concentrações, das quais era retirado 1mL para determinação da atividade enzimática. As concentrações utilizadas para cada enzima, definidas em função da atividade hidrolítica inicial, foram: Amano PS e Amano AY30 – 0,083% (m/v) e lipase de *Yarrowia lipolytica* – 2% (m/v). Aproximadamente 5mL destas soluções foram submetidas ao tratamento com propano pressurizado nas condições definidas no planejamento de experimentos.

c. Lipases imobilizadas: As três lipases utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram imobilizadas por adsorção no suporte polimérico comercial Accurel EP100. A metodologia empregada, detalhada no trabalho de OLIVEIRA *et al.* (2006), consiste basicamente em embeber o suporte (1,0g) em etanol (10mL) por 30 minutos, posteriormente em 10mL de uma solução etanol-água (1:1) e após 10 minutos esta solução é substituída por água destilada, que é

removida em seguida 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. Aos suportes previamente preparados adicionou-se 50mL de uma solução enzimática contendo 3g de enzima, a qual foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 5°C (banho de gelo) por 2 horas. Depois de decorrido este tempo, 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. As lipases imobilizadas por este procedimento foram armazenadas em geladeira até o momento da medida da atividade de hidrólise, para a qual foram utilizadas 0,1g de enzima imobilizada em cada análise.

A Tabela 3.1 apresenta uma compilação acerca das informações para o preparo de cada solução enzimática.

Tabela 3.1 – Preparo das soluções enzimáticas para avaliação da atividade de hidrólise em propano pressurizado.

Lipase/Forma	Livre	Ressuspendida	Imobilizada
Amano PS		Solução 0,083% (m/v) em tampão 1mL de amostra	
Amano AY30	0,1g em 10mL de tampão 1mL da amostra	Solução 0,083% (m/v) em tampão 1mL de amostra	0,1g de enzima
<i>Yarrowia lipolytica</i>		Solução 2% (m/v) em tampão 2mL de amostra	

A Figura 3.1 apresenta as três lipases utilizadas nas formas livre e imobilizada.

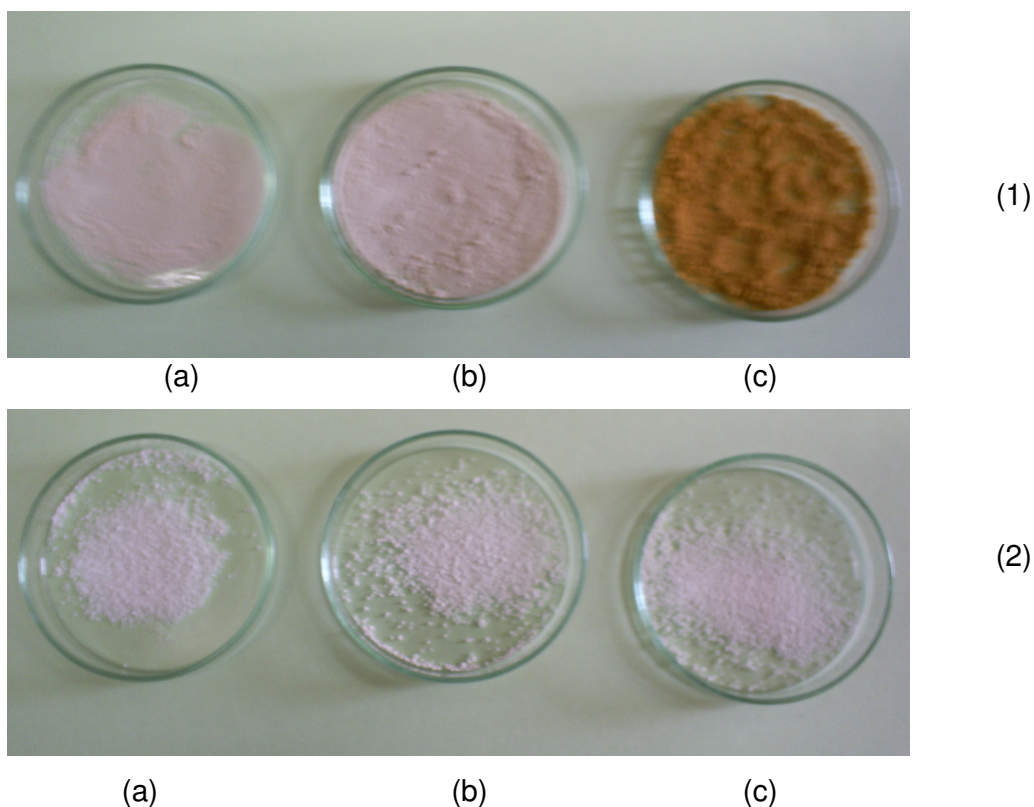


Figura 3.1 – Amostra das lipases utilizadas. (1) Lipases livres; (2) Lipases imobilizadas; (a) Amano AY30; (b) Amano PS e (c) lipase de *Yarrowia lipolytica*.

3.2.2 Método para determinação da atividade de hidrólise das lipases

Utilizou-se como substrato para dosagens da atividade lipásica, óleo de oliva (5%*m/v*) emulsificado por três minutos com goma arábica (10%*m/v*) em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0. A 19mL desta emulsão contidos em erlenmeyers de 125mL, foram adicionados 1mL (enzimas livres liofilizadas ou ressuspendida) ou 0,1g (lipase imobilizada) dos preparados enzimáticos. Após incubação por 15 minutos à 37°C e 150rpm, a reação foi interrompida e os ácidos graxos extraídos pela adição de 20mL de uma solução de acetona/etanol (1:1*v/v*). Os ácidos graxos foram, então, titulados com uma solução de NaOH (0,05N) até pH 11.

Os brancos reacionais, sem adição da enzima, foram preparados procedendo-se à incubação em agitador orbital e adicionando-se imediatamente acetona/etanol, fazendo-se após, a titulação. As dosagens de atividade foram feitas em duplicata e a média aritmética dos valores encontrados foi utilizada para o cálculo da atividade lipásica.

Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1mmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima que pode ser determinada através das Equações 3.1 (para lipases imobilizadas) e 3.2 (para lipases liofilizadas e ressuspendidas) (LEAL, 2000).

$$A(U / g) = \frac{(Va - Vb).N.10^3}{t.m} \quad (3.1)$$

$$A(U / mL) = \frac{(Va - Vb).N.10^3}{t.Vc} \quad (3.2)$$

Onde:

A = Atividade enzimática;

Va = Volume da amostra titulada (mL);

Vb = Volume do branco titulado (mL);

Vc = Volume da amostra usada na reação (mL);

m = Massa de amostra usada na reação (g);

t = Tempo de reação (minutos);

N = Normalidade da solução de NaOH.

Após o processamento em propano pressurizado, nas condições pré-estabelecidas no planejamento experimental, foi calculada a atividade residual, de acordo com a Equação 3.3.

$$Atividade\ residual(\%) = \frac{Atividade\ após\ pressurização}{Atividade\ antes\ da\ pressurização} . 100 \quad (3.3)$$

3.3 Processamento das Lipases com Propano Pressurizado

O procedimento experimental utilizado para avaliação do comportamento da atividade hidrolítica de lipases em propano pressurizado será relatado

conforme a forma de apresentação das enzimas: sólida (lipases liofilizadas e imobilizadas) e em solução (lipases ressuspendidas).

3.3.1 Lipases liofilizadas e imobilizadas

Os experimentos envolvendo os extratos enzimáticos liofilizados ou imobilizados foram realizados em uma unidade laboratorial similar à empregada por FRICKS *et al.* (2006), a qual consiste basicamente de um reservatório de solvente (propano), dois banhos termostáticos, uma bomba de seringa (ISCO 260D), um reator de aço inoxidável com volume interno de 3mL, um transdutor de pressão absoluto (Smar, LD301) equipado com programador portátil (Smar, HT201) com precisão de $\pm 0,37$ bar, como esquematicamente apresentado na Figura 3.2. A Figura 3.3 apresenta uma fotografia da unidade experimental utilizada para avaliação da atividade hidrolítica de lipases liofilizadas ou imobilizadas.

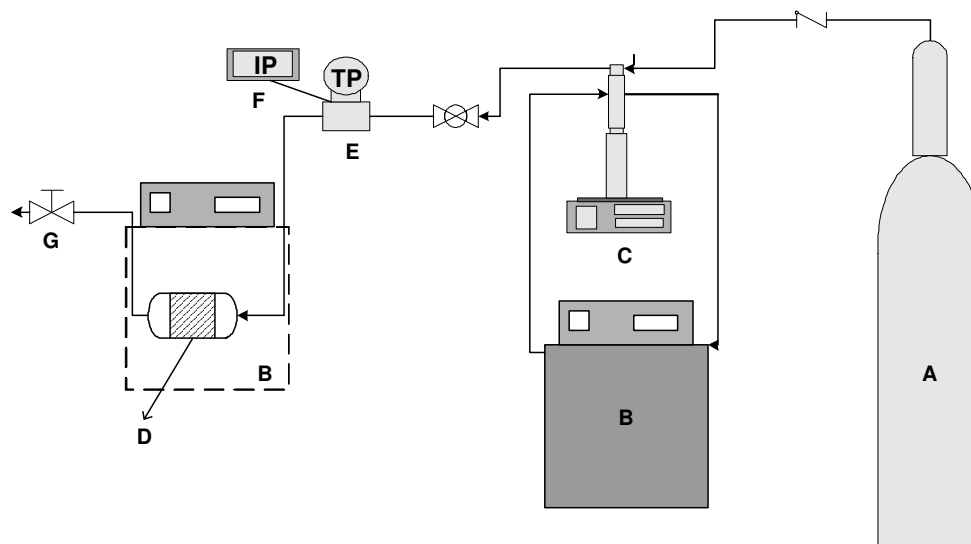


Figura 3.2 – Diagrama esquemático do aparato experimental para o tratamento das lipases sólidas em propano pressurizado. A - reservatório de solvente; B - banho termostático; C – bomba seringa; D – reator de aço inoxidável; E – transdutor de pressão; F – indicador de pressão; G – válvula micrométrica.

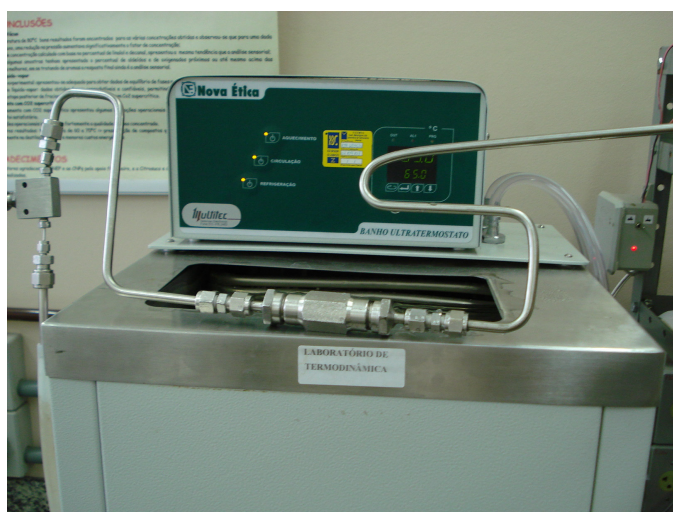


Figura 3.3 – Fotos da unidade experimental utilizada para avaliação da atividade de hidrólise de lipases liofilizadas e imobilizadas em propano pressurizado.

Inicialmente o banho termostático era ajustado para operar na temperatura estabelecida pelo planejamento de experimentos. Quando a temperatura estava estabilizada, as preparações enzimáticas liofilizadas (0,5g) e imobilizadas (0,1g) eram carregadas ao reator. Após este procedimento, o sistema era alimentado e pressurizado com propano até a pressão referente à condição experimental, mantendo uma taxa de pressurização constante de 10bar/min. O sistema era mantido nestas condições durante o tempo estabelecido no planejamento experimental. Então, o sistema era despressurizado a uma taxa pré-definida pela abertura da válvula micrométrica.

A atividade hidrolítica de cada lipase (Amano PS, Amano AY30 e *Yarrowia lipolytica*) em cada forma (liofilizada e imobilizada) era determinada antes (atividade inicial) e após (atividade final) o tratamento em propano pressurizado. A atividade residual foi determinada de acordo com o exposto na Equação 3.3.

3.3.2 Lipases em solução (ressuspendidas)

O principal objetivo desta etapa foi investigar o efeito do processamento a alta pressão com solvente comprimido na atividade de lipases dissolvidas em solução, uma vez que várias reações enzimáticas são conduzidas com o biocatalisador nesta forma. Uma modificação no aparato experimental apresentado na Figura 3.2 foi realizada para permitir amostragem da solução enzimática do sistema reacional. A principal modificação residiu na inserção de uma célula de volume variável dotada de janela de safira, a qual contém um pistão móvel que permite o controle da pressão dentro do reator. Desta forma, amostras da solução enzimática podem ser retiradas sem perturbar a pressão do sistema, tornando possível avaliar o comportamento da atividade lipásica em função do tempo de processamento, mantendo constantes a pressão e a temperatura do sistema.

Basicamente, o aparato consiste de um reservatório de solvente, uma célula com duas janelas de safira para observação visual de 28mL (volume máximo), um transdutor absoluto de pressão (Smar LD 301), com precisão de $\pm 0,37$ bar, um programador portátil (Smar, HT 201) para a aquisição de dados de pressão e uma bomba de seringa. O aparato experimental é esquematicamente apresentado na Figura 3.4. A Figura 3.5 apresenta uma vista da unidade experimental utilizada para avaliação da atividade hidrolítica de lipases ressuspendidas.

A preparação enzimática liofilizada era solubilizada em tampão fostato de sódio pH 7,0, conforme descrito anteriormente. Tipicamente, cerca de 5mL da solução era carregada à célula que, em seguida era alimentada com propano com o auxílio da bomba de seringa até atingir uma razão mássica solvente:solução enzimática em torno de 2:1. A temperatura, controlada por um banho ultra-termostático (0,1°C), era então estabilizada e o sistema pressurizado na condição estabelecida pelo planejamento experimental, a uma

taxa constante de 10bar/min, através do movimento do pistão interno da célula. Alíquotas da solução enzimática eram amostradas periodicamente durante 3 horas através de um *peek-tubing* introduzido no interior da célula.

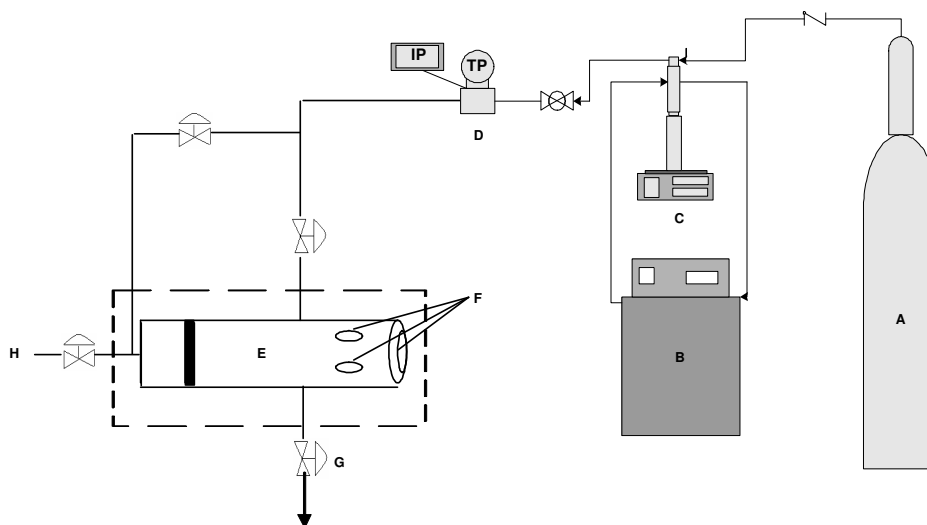


Figura 3.4 – Diagrama esquemático do aparato para o tratamento de lipases ressuspensas em propano pressurizado. A – reservatório de solvente; B – banho termostático; C – bomba seringa; D – transdutor e indicador de pressão; E – célula com janela de safira de volume variável; F – janelas de safira; G – válvula para amostragem; H – válvula micrométrica para despressurização, I - pistão.

Após a amostragem, a célula era despressurizada a uma taxa fixa de descompressão (5bar/min). A atividade hidrolítica de cada lipase (Amano PS, Amano AY30 e *Yarrowia lipolytica*) ressuspensa era determinada antes (atividade inicial) e após (atividade final) o tratamento em propano pressurizado. A atividade residual em cada condição experimental era determinada de acordo com a Equação 3.3.

3.4 Planejamento de Experimentos e Análise Estatística

Objetivando avaliar os efeitos das variáveis do processo (temperatura, pressão, taxa de despressurização e tempo de exposição) sobre a atividade das lipases liofilizadas e imobilizadas após o tratamento em propano pressurizado, foi adotado um planejamento experimental fatorial fracionário com 2 níveis para as 4 variáveis. Para as enzimas ressuspensas, empregou-

se um planejamento fatorial completo com 2 níveis e 2 variáveis (temperatura e pressão). Neste caso específico, dados cinéticos foram obtidos em cada condição experimental para cada lipase.



Figura 3.5 – Fotos da unidade experimental utilizada para avaliação da atividade de hidrólise de lipases ressuspensas em propano pressurizado.

As Tabelas 3.2 e 3.3 apresentam o intervalo de estudo das variáveis para as lipases na forma sólida (liofilizadas e imobilizadas) e em solução (ressuspensas), respectivamente. Estes intervalos foram selecionados de modo a abranger a escala normalmente utilizada para sistemas reacionais

contendo lipases, a faixa de atuação ótima para cada lipase e as limitações dos equipamentos disponíveis.

Tabela 3.2 – Intervalo de estudo das variáveis para o estudo do processamento de lipases liofilizadas e imobilizadas em propano pressurizado.

Variável	Intervalo de estudo
Temperatura (T) [°C]	35-55
Tempo de exposição (t) [horas]	0,5-3,0
Taxa de despressurização (R) [bar/min]	2-50
Pressão (P) [bar]	30-200

Tabela 3.3 – Intervalo de estudo das variáveis para o estudo do processamento de lipases ressuspendidas em propano pressurizado.

Variável	Intervalo de estudo
Temperatura (T) [°C]	35-55
Pressão (P) [bar]	30-200

Considerando os intervalos de estudo supracitados e os planos experimentais adotados, as Tabelas 3.4 e 3.5 apresentam as matrizes para as lipases liofilizadas e imobilizadas e ressuspendidas, respectivamente.

Tabela 3.4 – Matriz experimental (planejamento fatorial saturado) empregada no estudo da atividade de lipases liofilizadas e imobilizadas em propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	t [horas]	R [bar/min]	P [bar]
1	35 (-1)	0,5 (-1)	2 (-1)	30 (-1)
2	35 (-1)	0,5(-1)	50 (+1)	200 (+1)
3	35 (-1)	3 (+1)	2 (-1)	200 (+1)
4	35 (-1)	3 (+1)	50 (+1)	30 (-1)
5	55 (+1)	0,5 (-1)	2 (-1)	200 (+1)
6	55 (+1)	0,5 (-1)	50 (+1)	30 (-1)
7	55 (+1)	3 (+1)	2 (-1)	30 (-1)
8	55 (+1)	3 (+1)	50 (+1)	200 (+1)
9	45 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)

Tabela 3.5 – Matriz experimental (planejamento fatorial completo) empregada no estudo da atividade de lipases ressuspendidas em propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	P [bar]
1	35	30
2	35	200
3	55	30
4	55	200
5	45	115

Os experimentos foram realizados aleatoriamente e com réplica do ponto central para cada sistema avaliado. O erro experimental para cada condição foi obtido através da média e do desvio padrão. Ao final dos experimentos, os resultados obtidos foram analisados no programa Statistica 6.1[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

4.1 Atividade hidrolítica da lipase PS Amano em propano pressurizado

Nesta etapa são apresentados e discutidos os resultados obtidos na avaliação da atividade hidrolítica da lipase Amano PS nas formas livre (liofilizada e ressuspendida) e imobilizada após tratamento em propano pressurizado. Os experimentos foram realizados aleatoriamente, com réplica do ponto central.

Lipase Amano PS liofilizada

Os resultados obtidos para a lipase Amano PS na forma livre (liofilizada) após processamento em propano pressurizado são apresentados na Tabela 4.1.

Pela análise desta tabela pode-se verificar que houve um aumento da atividade hidrolítica após tratamento com propano pressurizado na maioria das condições experimentais avaliadas. Cabe mencionar a boa reprodutibilidade dos dados obtidos, que pode ser evidenciada pelos valores de atividade residual referentes aos experimentos 9 e 10 (réplicas do ponto central). O maior incremento em relação à atividade inicial ocorreu no experimento 2 (347,33%) nas condições de menor temperatura (35°C), menor tempo de exposição (0,5 horas), taxa de despressurização rápida (50bar/min) e maior pressão (200bar). Perda expressiva de atividade ocorreu no experimento 5 (84%), cabendo mencionar que a temperatura (65°C) e taxa de despressurização lenta (2bar/min) empregadas nesta condição experimental, as quais diferem do experimento 2, parecem afetar negativamente a atividade enzimática.

Tabela 4.1. Atividade residual da lipase Amano PS liofilizada após tratamento com propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	t [horas]	R [bar/min]	P [bar]	Atividade Residual* (%)
1	35 (-1)	0,5 (-1)	2 (-1)	30 (-1)	71,96
2	35 (-1)	0,5(-1)	50 (+1)	200 (+1)	347,33
3	35 (-1)	3 (+1)	2 (-1)	200 (+1)	222,22
4	35 (-1)	3 (+1)	50 (+1)	30 (-1)	98,25
5	65 (+1)	0,5 (-1)	2 (-1)	200 (+1)	16,00
6	65 (+1)	0,5 (-1)	50 (+1)	30 (-1)	189,01
7	65 (+1)	3 (+1)	2 (-1)	30 (-1)	170,37
8	65 (+1)	3 (+1)	50 (+1)	200 (+1)	127,75
9	50 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	156,35
10	50 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	154,74

* Atividade inicial de hidrólise=88,4U/mL.

T=temperatura, t=tempo de exposição, R=taxa de despressurização e P=pressão.

Uma vez determinada a atividade residual para cada condição experimental definida no planejamento de experimentos, os dados foram tratados estatisticamente e obteve-se o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.1.

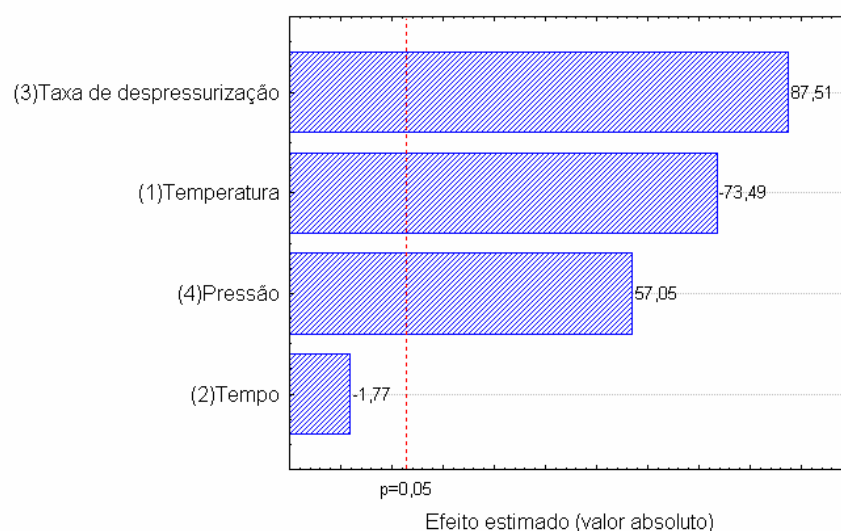


Figura 4.1. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano PS liofilizada após tratamento em propano pressurizado.

Observa-se que a taxa de despressurização apresentou o efeito mais significativo ($p < 0,05$), demonstrando que maiores atividades residuais são obtidas quando da despressurização rápida do sistema. Alguns trabalhos apresentados na literatura (KNEZ e HABULIN, 2002) sugerem que a etapa de despressurização influencia a atividade da enzima após processamento em fluidos pressurizados. Cabe novamente mencionar que cada sistema precisa ser investigado, uma vez que os resultados são função, principalmente, das características da enzima e do solvente e das possíveis interações entre os mesmos. Por outro lado, dentro da faixa estudada, a temperatura apresentou efeito significativo negativo sugerindo que um aumento da temperatura diminua a atividade residual do sistema. A literatura, no entanto, aponta como ótima para a atividade da lipase PS Amano temperaturas na faixa de 50-60°C. Possíveis aumentos na estabilidade térmica da enzima podem ser alcançados na etapa de imobilização, resultados que serão apresentados a seguir. Dentro da faixa avaliada, pôde-se observar também que a pressão afetou positivamente a atividade de hidrólise da lipase PS Amano. Neste sistema, dentro dos limites investigados, conclui-se que a temperatura afetou negativamente a atividade da enzima, efeito contraditório ao apresentado em relação à pressão e à taxa de despressurização, variáveis comumente citadas como nocivas à atividade enzimática.

Fazendo referência aos trabalhos apontados na literatura com relação ao comportamento da atividade enzimática em fluidos pressurizados cumpre mencionar que grande parte destes refere-se à aplicação de dióxido de carbono como solvente. Os resultados obtidos na maioria destes casos remetem a perdas na atividade das enzimas, devido principalmente ao caráter hidrofílico do CO₂, o qual poderia, durante o processamento a altas pressões, remover a água essencial à manutenção da atividade enzimática. Trabalhos que corroboram tal afirmação podem ser citados: PRIMO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2006a,b. Cabe mencionar que em alguns trabalhos ocorreu um incremento na atividade enzimática após processamento em CO₂ pressurizado (FRICKS *et al.*, 2006). Neste cenário, os efeitos do tratamento com CO₂ pressurizado na atividade de

enzimas obtidas a partir de diferentes fontes são variáveis, dependendo da magnitude da pressão, temperatura e tempo de exposição, entre outros fatores.

Por outro lado, alguns trabalhos apresentados na literatura relatam que o uso de solventes com baixa constante dielétrica, tais como o propano, poderiam manter ou aumentar a atividade e estabilidade enzimáticas (KNEZ e HABULIN, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006a,b; FRICKS *et al.*, 2006). Cabe salientar que a maioria destes trabalhos refere-se à verificação da atividade de enzimas imobilizadas, justificando a consecução da presente etapa deste trabalho, relacionada à análise do comportamento de enzimas livres em propano. Neste sentido, num dos poucos trabalhos apresentados na literatura referente à atividade de extratos enzimáticos livres em propano, ANDRADE *et al.* (2007) verificaram que, no caso específico da enzima D-hidantoinase, os resultados obtidos quando do processamento em CO₂ e propano não apresentaram diferença significativa na atividade do extrato enzimático sólido. Uma vez que as propriedades do solvente afetam diretamente a interação específica com as enzimas, diferentes efeitos são obtidos dependendo da enzima estudada (KASCHE *et al.*, 1988; FRICKS *et al.*, 2006). Como mencionado anteriormente, no caso específico dos resultados apresentados neste trabalho pôde-se verificar que o emprego de propano pressurizado como solvente, na maioria das condições avaliadas, conduziu a um aumento da atividade residual da lipase Amano PS liofilizada.

Lipase Amano PS ressuspendida

Os resultados obtidos para a lipase Amano PS na forma livre (ressuspendida) após processamento em propano pressurizado são apresentados na Tabela 4.2.

Cabe salientar que nesta etapa foi avaliada a atividade hidrolítica em função do tempo de processamento. No entanto, visando uma comparação mais direta com os dados obtidos anteriormente para a lipase liofilizada, a análise estatística foi realizada apenas para os tempos de 0,5 e 3 horas de

processamento no propano pressurizado. A curva cinética obtida para cada condição experimental apresentada na Tabela 4.2 é demonstrada na Figura 4.2.

Tabela 4.2. Atividade residual da lipase Amano PS ressuspensa após tratamento com propano pressurizado em função do tempo de processamento.

Condição Experimental (P-T)	Tempo (minutos)				
	15	30	60	120	180
	Atividade Residual* (%)				
35°C-30Bar	88,55	109,57	39,33	83,25	100,36
35°C-200Bar	94,96	92,94	126,59	75,42	63,21
55°C-30Bar	95,78	111,46	119,30	94,18	78,40
55°C-200Bar	85,18	87,03	90,09	53,06	53,70
45°C-115Bar	93,25	80,90	93,25	82,04	28,07
45°C-115Bar	86,35	80,90	85,46	72,71	34,52
45°C-115Bar	108,39	113,15	93,47	100,96	59,27

*Atividade inicial de hidrólise=88,4U/mL.

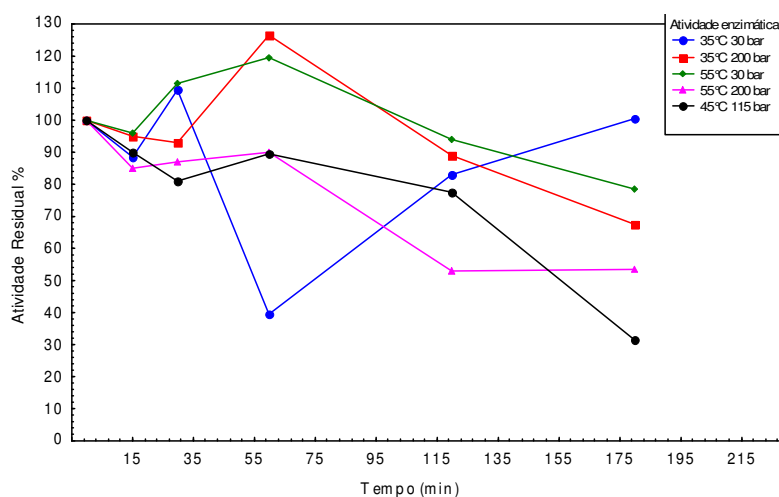


Figura 4.2. Atividade residual da lipase Amano PS ressuspensa em função do tempo de exposição ao propano pressurizado.

Uma análise prévia da tabela e da figura apresentadas anteriormente permite verificar que, após 30 minutos de processamento em propano pressurizado, a lipase PS teve praticamente inalterada sua atividade inicial em todas as condições experimentais avaliadas. Ao longo do tempo de exposição, o comportamento da atividade enzimática variou em função da condição

experimental, sendo que, após 180 minutos de exposição, todas as condições de temperatura e pressão conduziram a uma queda gradativa da atividade enzimática, parecendo haver um efeito combinado de temperatura e pressão, afetando a atividade final. Quedas mais acentuadas de atividade foram verificadas na condição de temperatura e pressão intermediárias. Cabe salientar que na condição de menor temperatura e pressão, após 180 minutos, a enzima manteve inalterada sua atividade comparada à atividade inicial.

Após esta análise prévia em relação à atividade residual como função do tempo de exposição da lipase ressuspensa em propano pressurizado, os dados apresentados na tabela anterior foram tratados estatisticamente nos tempos de 30 e 180 minutos, visando avaliar o efeito das variáveis pressão e temperatura na atividade residual da lipase Amano PS ressuspensa. Foram, desta forma, obtidos os Gráficos de Pareto apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4 para os tempos de 30 e 180 minutos, respectivamente.

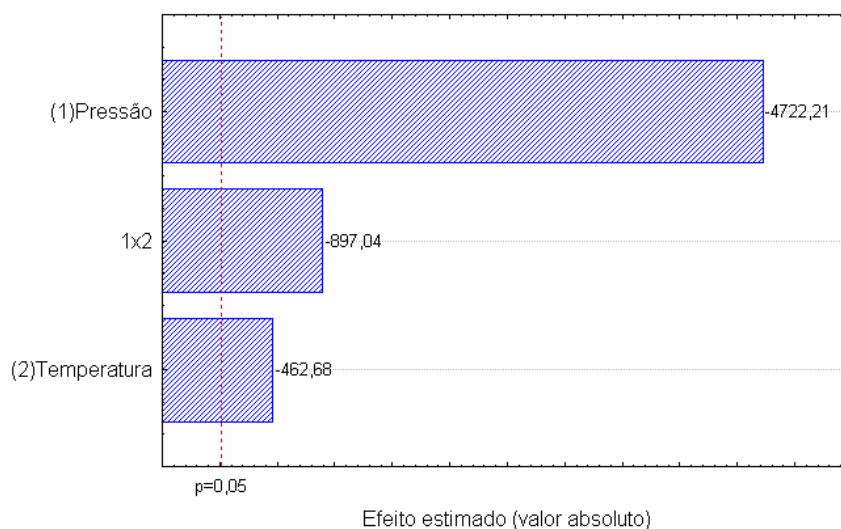


Figura 4.3. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano PS ressuspensa após tratamento por 30 minutos em propano pressurizado.

Observa-se que, com 95% de confiança, a pressão e a temperatura afetaram negativamente a atividade enzimática, demonstrando que um aumento nestas variáveis, dentro da faixa estudada, acarreta numa diminuição da atividade

residual da referida lipase. Cumpre salientar o efeito também significativo de interação entre as referidas variáveis.

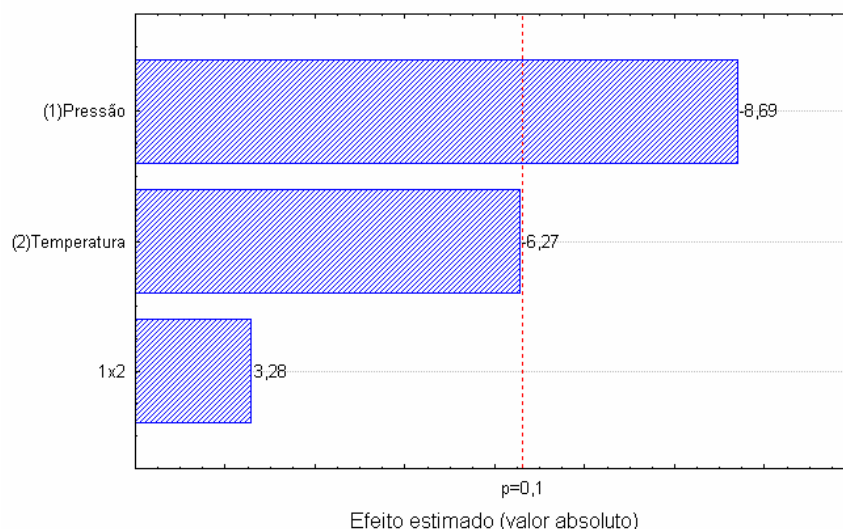


Figura 4.4. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano PS ressuspendida após tratamento por 180 minutos em propano pressurizado.

Observa-se na análise dos resultados que, após 180 minutos de exposição ao propano pressurizado, com 90% de confiança, a pressão e a temperatura afetaram negativamente a atividade enzimática.

Numa tentativa de correlacionar os dados obtidos nesta etapa com os observados quando da utilização da lipase liofilizada pode-se verificar que a forma de apresentação da enzima (sólida ou em suspensão) parece afetar o comportamento desta durante tratamento com propano pressurizado. Enquanto neste caso a pressão e a temperatura afetaram negativamente a atividade enzimática, quando da utilização da enzima liofilizada apenas a temperatura apresentou este efeito negativo, sendo que a pressão apresentou efeito contrário.

Com relação aos resultados reportados na literatura, cumpre mencionar a escassez dos mesmos relacionados ao comportamento da atividade de enzimas em solução em fluidos pressurizados, muito embora estes resultados possam ser significativos no sentido de que a maioria dos sistemas reacionais empregando

enzimas livres como catalisadores necessita que as mesmas sejam utilizadas na forma ressuspensa em tampão apropriado.

ANDRADE *et al.* (2007), investigando o efeito do processamento com CO₂ e propano pressurizados na atividade de uma solução (2mg de sólido/mL) da enzima D-hidantoinase, verificaram um contínuo decréscimo da atividade enzimática em todas as condições experimentais avaliadas em CO₂ pressurizado. A determinação da atividade enzimática na solução mostrou atividades residuais de cerca de 60%, indicando que a enzima foi desnaturada durante o processamento com dióxido de carbono comprimido. Desnaturação de proteínas induzida pela pressão tem sido tópico de intensas pesquisas nos últimos anos, e a partir de vários exemplos, a desnaturação pela pressão parece ser um processo reversível, diferentemente da desnaturação provocada pela temperatura (HEREMANS *et al.*, 1996). Os mesmos autores apresentam resultados relacionados ao processamento da mesma enzima em solução em propano pressurizado, onde pôde-se verificar que, após 2 horas de tratamento, uma pequena alteração na atividade residual foi observada. Comparando os resultados do tratamento da D-hidantoinase em solução com dióxido de carbono e propano, os autores verificaram que as proteínas parecem ser mais estáveis em propano que em CO₂. Este fato pode ser explicado em termos da maior solubilidade do dióxido de carbono em soluções aquosas comparado ao propano. Quando as macromoléculas estão em solução, é esperado que as cadeias pareçam aumentar de volume, aumentando a mobilidade molecular. Desta forma, moléculas com menores comprimentos de cadeia poderiam interagir mais facilmente em solução. Como o CO₂ apresenta maior solubilidade em soluções aquosas que o propano, interações mais efetivas poderiam estar disponíveis entre os grupamentos. Várias especulações são apresentadas na literatura acerca do efeito do processamento com CO₂ pressurizado sobre a atividade de diversas enzimas, no entanto, devido ao caráter ainda recente da aplicação de propano como solvente pressurizado, pouco tem sido relatado na literatura acerca do seu efeito direto na atividade de enzimas.

Lipase Amano PS imobilizada

Os resultados obtidos para a lipase Amano PS imobilizada em Accurel EP100 após processamento em propano pressurizado são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Atividade residual da lipase Amano PS imobilizada após tratamento com propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	t [horas]	R [bar/min]	P [bar]	Atividade Residual [*] (%)
1	35 (-1)	0,5 (-1)	2 (-1)	30 (-1)	321,97
2	35 (-1)	0,5(-1)	50 (+1)	200 (+1)	72,37
3	35 (-1)	3 (+1)	2 (-1)	200 (+1)	105,01
4	35 (-1)	3 (+1)	50 (+1)	30 (-1)	60,08
5	65 (+1)	0,5 (-1)	2 (-1)	200 (+1)	74,88
6	65 (+1)	0,5 (-1)	50 (+1)	30 (-1)	38,88
7	65 (+1)	3 (+1)	2 (-1)	30 (-1)	54,55
8	65 (+1)	3 (+1)	50 (+1)	200 (+1)	86,96
9	50 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	109,47
10	50 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	107,36
11	50 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	88,19

* Atividade inicial de hidrólise=312,8U/g.

T=temperatura, t=tempo de exposição, R=taxa de despressurização e P=pressão.

Confrontando diretamente os resultados apresentados nesta tabela com os obtidos quando da utilização da lipase PS na forma liofilizada (Tabela 4.1) pode-se verificar que diferentes comportamentos são observados em função da forma de apresentação da enzima. Para a enzima imobilizada, a condição experimental 1, equivalente aos menores níveis de temperatura, tempo de exposição, taxa de despressurização e pressão, conduziu a um maior incremento da atividade de hidrólise da referida enzima (321%). Comparando novamente com a Tabela 4.1 parece haver, no caso da enzima imobilizada, um efeito deletério da taxa de

despressurização e da pressão na atividade residual, fatos que podem também ser observados nos experimentos 2, 4, 5 e 6.

Uma vez determinada a atividade residual para cada condição experimental definida no planejamento de experimentos, os dados foram tratados estatisticamente e obteve-se o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.5.

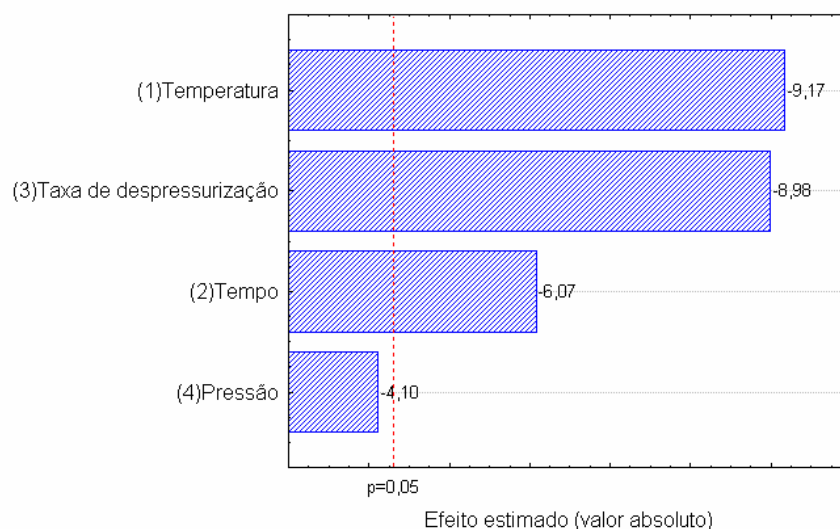


Figura 4.5. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano PS imobilizada após tratamento em propano pressurizado.

Observa-se que a temperatura, a taxa de depressurização e o tempo de exposição apresentaram efeito negativo significativo ($p<0,05$), demonstrando que maiores atividades residuais são obtidas quando da depressurização lenta do sistema, em faixas de menores temperaturas e menores tempos de exposição. Alguns trabalhos apresentados na literatura sugerem que a etapa de depressurização determina a atividade da enzima após o processamento em fluidos pressurizados. Neste sistema, parece haver concordância com esta afirmação apresentada por alguns autores. Por outro lado, dentro da faixa estudada, a temperatura apresentou efeito significativo negativo sugerindo que um aumento da temperatura diminua a atividade residual do sistema. A literatura, no entanto, aponta como ótima para a atividade da lipase PS Amano temperaturas na faixa de 50-60°C. A etapa de imobilização parece não ter aumentado a

estabilidade térmica da enzima frente ao sistema avaliado. Cabe novamente mencionar, com base nos dados apresentados até o momento, que cada sistema precisa ser investigado separadamente, pois os resultados são função, principalmente, das características da enzima, da forma de apresentação da mesma, do solvente e das possíveis interações entre os mesmos.

Novamente, conforme mencionado anteriormente no item relacionado ao comportamento da lipase PS Amano na forma livre após tratamento em propano pressurizado, pode-se relatar que o uso de solventes com baixa constante dielétrica poderia manter ou aumentar a atividade e estabilidade enzimáticas (KNEZ e HABULIN, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006a,b; FRICKS *et al.*, 2006).

Neste sentido, o trabalho apresentado por OLIVEIRA *et al.* (2006), relacionado ao comportamento de duas lipases imobilizadas comerciais (Novozym 435 e Lipozyme IM) após tratamento em CO₂ e propano pressurizado, verificou que, para a enzima Lipozyme IM, o tratamento com dióxido de carbono conduziu às maiores perdas de atividade de esterificação (cerca de 14%) e em propano menores perdas de atividade foram observadas (máximo de 8,9%). Para a enzima Novozym 435, o processamento com dióxido de carbono também apresentou efeito deletério na atividade da enzima, embora num nível inferior quando comparado a Lipozyme IM. Por outro lado, os resultados mostraram que o tratamento da lipase Novozym 435 em propano comprimido conduziu a um aumento na atividade enzimática em todas as condições experimentais avaliadas, com ganhos médios de atividade de cerca de 14%.

O trabalho apresentado por HABULIN e KNEZ (2001), os quais estudaram a atividade de algumas lipases na reação de esterificação de ácido butírico e etanol em CO₂ supercrítico e propano a 40°C e 100 bar, mostra que maiores perdas de atividade foram verificadas em CO₂. É interessante reportar que estes autores também verificaram um aumento da atividade de esterificação das lipases testadas em propano.

Os resultados reportados na literatura e os apresentados neste trabalho permitem concluir que solventes com baixa constante dielétrica favorecem a ativação interfacial, permitindo maior acesso ao sítio ativo da enzima (KNEZ e

HABULIN, 2001). Como mencionado anteriormente, no caso específico dos resultados apresentados neste trabalho pôde-se verificar que o emprego de propano pressurizado como solvente, em várias condições avaliadas, conduziu a um aumento da atividade residual da lipase Amano PS imobilizada. Tal fato pode ter se dado devido às características hidrofóbicas do propano e o fato de que o mesmo se comporta como um solvente líquido convencional no presente estudo, e possivelmente devido à afinidade da lipase PS Amano por este solvente.

4.2 Atividade hidrolítica da lipase AY30 Amano em propano pressurizado

Nesta etapa são apresentados os resultados obtidos na avaliação da atividade hidrolítica da lipase Amano AY30 nas formas livre (liofilizada e ressuspendida). Cumpre salientar que a etapa de avaliação da atividade residual utilizando a referida lipase imobilizada não foi efetuada uma vez que, durante o processo de imobilização, houve expressiva redução da atividade de hidrólise, tornando inacessível a avaliação da atividade após processamento em propano pressurizado.

Lipase Amano AY30 liofilizada

Os resultados obtidos para a lipase Amano AY30 na forma livre (liofilizada) após processamento em propano pressurizado são apresentados na Tabela 4.4.

Pela análise desta tabela pode-se verificar que houve um aumento da atividade hidrolítica após tratamento com propano pressurizado em algumas das condições experimentais avaliadas. O maior incremento em relação à atividade inicial ocorreu nos experimentos de maiores temperaturas e menores pressões. O experimento 4 foi o que apresentou uma menor atividade residual comparado aos demais.

Tabela 4.4. Atividade residual da lipase Amano AY30 liofilizada após tratamento com propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	t [horas]	R [bar/min]	P [bar]	Atividade Residual [*] (%)
1	35 (-1)	0,5 (-1)	2 (-1)	30 (-1)	131,82
2	35 (-1)	0,5(-1)	50 (+1)	200 (+1)	108,7
3	35 (-1)	3 (+1)	2 (-1)	200 (+1)	90,72
4	35 (-1)	3 (+1)	50 (+1)	30 (-1)	31,37
5	65 (+1)	0,5 (-1)	2 (-1)	200 (+1)	80,59
6	65 (+1)	0,5 (-1)	50 (+1)	30 (-1)	145,45
7	65 (+1)	3 (+1)	2 (-1)	30 (-1)	134,82
8	65 (+1)	3 (+1)	50 (+1)	200 (+1)	82,62
9	50 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	167,36
10	50 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	147,39

* Atividade inicial de hidrólise=22,5U/mL.

T=temperatura, t=tempo de exposição, R=taxa de despressurização e P=pressão.

Uma vez determinada a atividade residual para cada condição experimental definida no planejamento de experimentos, os dados foram tratados estatisticamente e obteve-se o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.6. A análise desta figura permite concluir que dentro do intervalo de estudo investigado, nenhuma variável apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) na atividade de hidrólise da lipase Amano AY30. Fazendo referência aos resultados obtidos para a lipase Amano PS pode-se novamente verificar que diferentes enzimas possuem diferentes comportamentos em propano pressurizado.

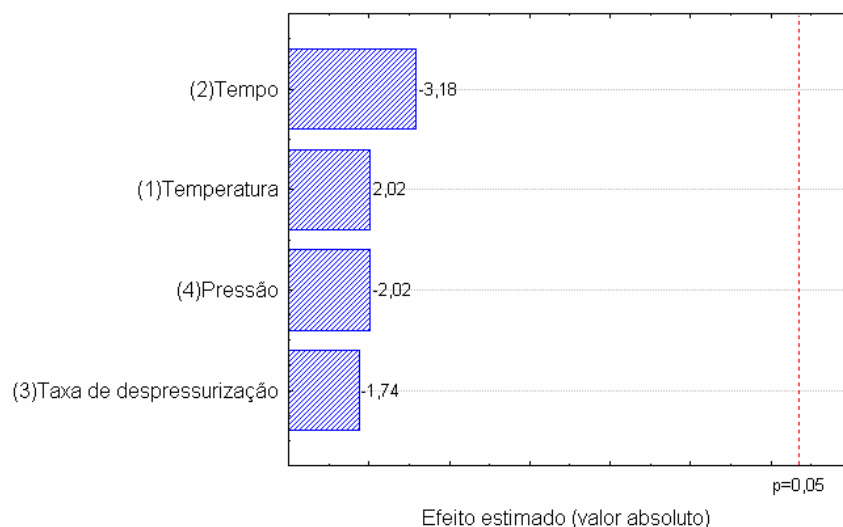


Figura 4.6. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano AY30 liofilizada após tratamento em propano pressurizado.

Lipase Amano AY30 ressuspensa

Os resultados obtidos para a lipase Amano AY30 na forma livre (ressuspensa) após processamento em propano pressurizado são apresentados na Tabela 4.5.

Cabe salientar que nesta etapa foi avaliada a atividade hidrolítica em função do tempo de processamento. No entanto, visando uma comparação mais direta com os dados obtidos anteriormente para a lipase liofilizada, a análise estatística foi realizada apenas para os tempos de 0,5 e 3 horas de processamento no propano pressurizado.

A análise da Figura 4.7 permite verificar que, em todas as condições experimentais houve um decréscimo contínuo da atividade residual da lipase em função de tempo de tratamento em propano pressurizado. Tal efeito foi mais pronunciado nas condições de maiores temperaturas (65°C), parecendo esta variável afetar negativamente a atividade da enzima ao longo do processamento. Cabe mencionar a completa inativação da enzima, após 30 minutos de processamento quando pressão de 200bar foi empregada e após 180 minutos de

processamento quando da pressão de 30bar. Tais efeitos deletérios não foram verificados para a lipase Amano PS ressuspensa, conforme apresentado anteriormente.

Tabela 4.5. Atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspensa após tratamento com propano pressurizado em função do tempo de processamento.

Condição Experimental (T-P)	Tempo (minutos)				
	15	30	60	120	180
Atividade Residual (%)					
35°C-30Bar	79,59	88,04	87,01	38,88	30,33
35°C-200Bar	70,31	68,17	57,53	51,14	47,95
55°C-30Bar	51,86	55,66	27,82	11,39	25,27
55°C-200Bar	82,62	35,02	19,57	23,90	15,18
45°C-115Bar	95,57	103,33	67,75	55,51	33,33
45°C-115Bar	61,29	66,96	53,78	39,80	41,51
45°C-115Bar	92,55	93,47	39,43	42,07	34,57

A curva cinética obtida para cada condição experimental apresentada na Tabela 4.5 é demonstrada na Figura 4.7.

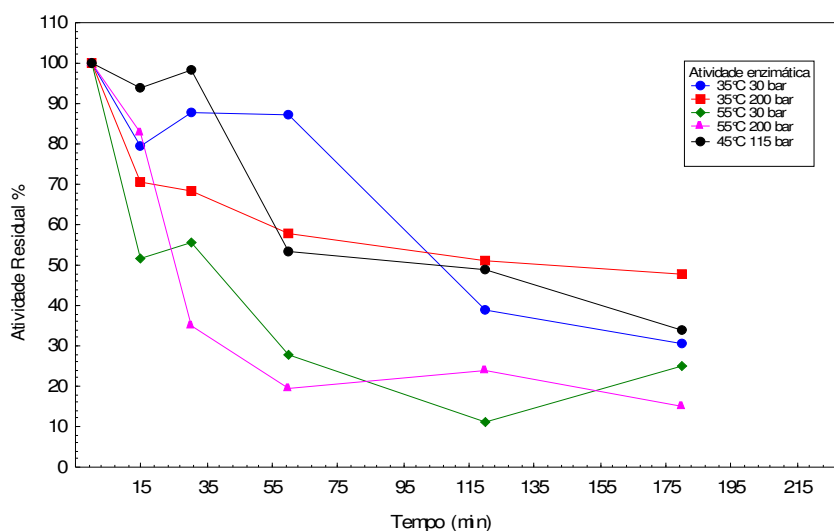


Figura 4.7. Atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspensa em função do tempo de exposição ao propano pressurizado.

Após esta análise prévia em relação à atividade residual como função do tempo de exposição da lipase ressuspensa em propano pressurizado, os dados apresentados na tabela anterior foram tratados estatisticamente nos tempos de 30 e 180 minutos, visando avaliar o efeito das variáveis pressão e temperatura na atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspensa. Foi obtido o Gráfico de Pareto (Figura 4.8) para o tempo de 30 minutos de exposição da enzima Amano AY30 ao propano pressurizado.

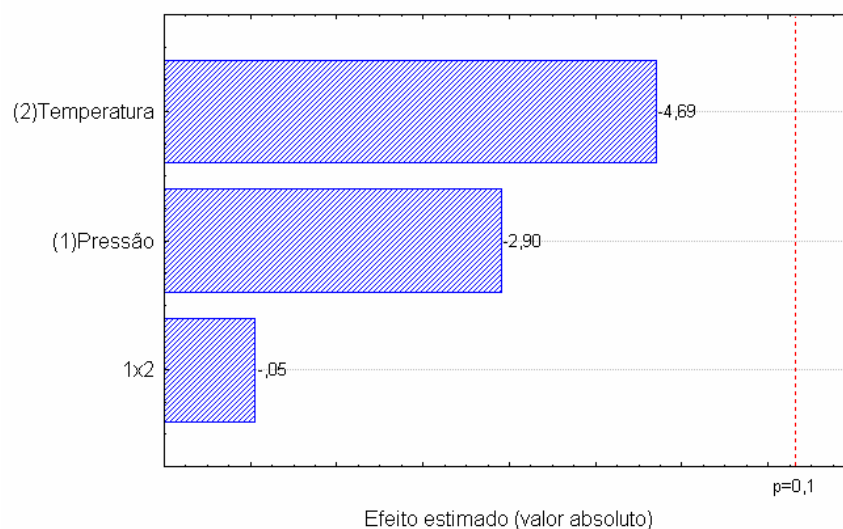


Figura 4.8. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspensa após tratamento por 30 minutos em propano pressurizado.

Após 30 minutos de processamento em propano pressurizado, observa-se que a pressão e a temperatura não afetaram significativamente ($p < 0,10$) a atividade da lipase Amano AY30 ressuspensa. Cumpre salientar o efeito não significativo de interação entre as referidas variáveis.

Os resultados apresentados na Tabela 4.7 foram também tratados estatisticamente após 180 minutos de exposição da enzima ao propano pressurizado e um modelo empírico foi obtido (Equação 4.1). O modelo codificado para a atividade residual em função da temperatura e da pressão foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 4.6. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado)

validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.9.

$$\text{Atividade residual}(\%) = 32,59 - 9,46T - 6,93.P.T \quad (4.1)$$

Tabela 4.6. Análise de variância para a atividade residual em função da temperatura e da pressão para a lipase Amano AY30 após 180 minutos de processamento em propano pressurizado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	549,58	2	274,79	8,32
Resíduo	132,11	4	33,03	
Falta de ajuste	93,24	2		
Erro puro	38,87	2		
Total	681,69	6		

Coeficiente de correlação: $R=0,90$, $F_{0,90;4;6} = 3,18$

Na Figura 4.9 pode-se verificar que em níveis mais elevados de pressão e níveis inferiores de temperatura são obtidos os maiores valores de atividade residual. Neste aspecto, pode-se evidenciar que existe uma tendência de aumento da atividade residual com o aumento da pressão, efeito ainda não totalmente desvendado na literatura, embora existam dados experimentais que corroborem o comportamento no sistema aqui enfocado.

Numa tentativa de correlacionar os dados obtidos nesta etapa com os observados quando da utilização da lipase liofilizada pode-se verificar que a forma de apresentação da enzima (sólida ou em suspensão) parece novamente afetar o comportamento desta durante tratamento com propano pressurizado. Correlacionando estes dados com os obtidos para a lipase Amano PS ressuspendida em propano pressurizado pode-se novamente verificar diferentes comportamentos de atividade residual em função da enzima utilizada.

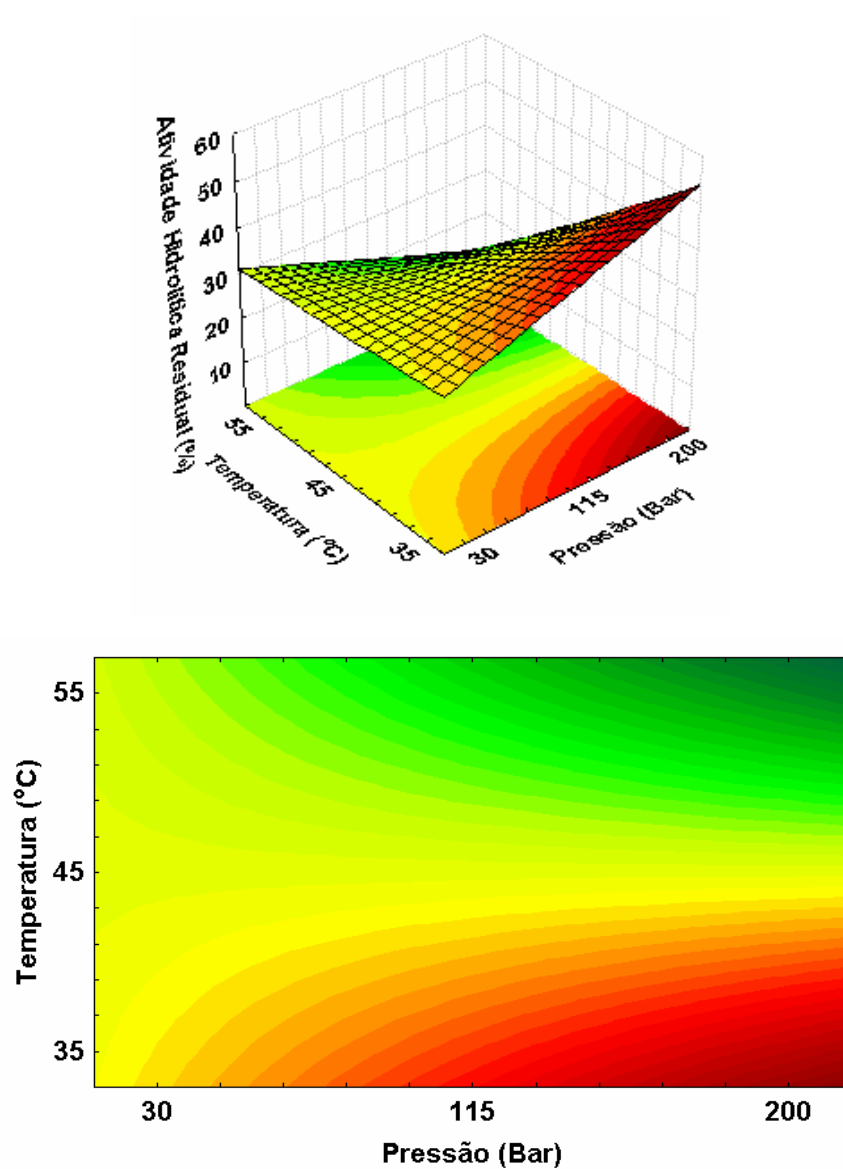


Figura 4.9. Superfície de resposta e curva de contorno da atividade residual da lipase Amano AY30 ressuspensa após tratamento por 180 minutos em propano pressurizado.

4.3 Atividade hidrolítica da lipase de *Yarrowia lipolytica* em propano pressurizado

Nesta etapa são apresentados os resultados obtidos na avaliação da atividade hidrolítica da lipase de *Yarrowia lipolytica* nas formas livre (liofilizada e ressuspendida). Cumpre salientar que a etapa de avaliação da atividade residual utilizando a referida lipase imobilizada foi investigada em apenas três condições experimentais, devido à falta de amostra de enzima suficiente para complementar esta última etapa.

Lipase de *Yarrowia lipolytica* liofilizada

Os resultados obtidos para a lipase de *Yarrowia lipolytica* na forma livre (liofilizada) após processamento em propano pressurizado são apresentados na Tabela 4.7.

Pela análise desta tabela pode-se verificar que houve uma variação pouco pronunciada na atividade residual após o tratamento com propano, já que incrementos ou perdas pouco significativos em relação à atividade inicial foram verificados para a maioria das condições experimentais. Cabe mencionar a boa reprodutibilidade dos dados obtidos, o que pode ser evidenciado pelos valores de atividade residual referentes aos experimentos 9 e 10 (réplicas do ponto central). No entanto, cabe aqui mencionar que, em praticamente todas as condições experimentais, a lipase de *Yarrowia lipolytica* na forma livre (liofilizada), uma enzima não comercial, apresentou boa estabilidade após processamento em propano pressurizado, podendo a mesma ser uma boa alternativa a ser empregada como catalisador em processos bioquímicos em meios alternativos, neste caso, propano pressurizado, viabilizando economicamente tais processos em comparação aos catalisados por lipases comerciais de alto custo.

Tabela 4.7. Atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* liofilizada após tratamento com propano pressurizado.

Experimento	T [°C]	t [horas]	R [bar/min]	P [bar]	Atividade Residual* (%)
1	35 (-1)	0,5 (-1)	2 (-1)	30 (-1)	121,41
2	35 (-1)	0,5(-1)	50 (+1)	200 (+1)	102,6
3	35 (-1)	3 (+1)	2 (-1)	200 (+1)	126,94
4	35 (-1)	3 (+1)	50 (+1)	30 (-1)	102,83
5	55 (+1)	0,5 (-1)	2 (-1)	200 (+1)	99,47
6	55 (+1)	0,5 (-1)	50 (+1)	30 (-1)	73,11
7	55 (+1)	3 (+1)	2 (-1)	30 (-1)	95,63
8	55 (+1)	3 (+1)	50 (+1)	200 (+1)	113,67
9	45 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	102,79
10	45 (0)	1,45 (0)	26 (0)	115 (0)	97,51

* Atividade inicial de hidrólise=56,4U/mL.

T=temperatura, t=tempo de exposição, R=taxa de despressurização e P=pressão.

Numa tentativa de correlacionar diretamente os resultados apresentados na tabela anterior com os da Tabela 4.1 e 4.4 (referente à atividade residual da lipase Amano PS e Amano AY30, respectivamente, após tratamento com propano pressurizado, nas mesmas condições experimentais) pode-se novamente mencionar que, diferentes enzimas possuem diferentes comportamentos, considerando o mesmo solvente e as mesmas condições experimentais, fazendo crer que a interação entre a enzima e o solvente apresenta papel fundamental no comportamento da atividade enzimática.

Uma vez determinada a atividade residual para cada condição experimental definida no planejamento de experimentos, os dados foram tratados estatisticamente e obteve-se o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.10.

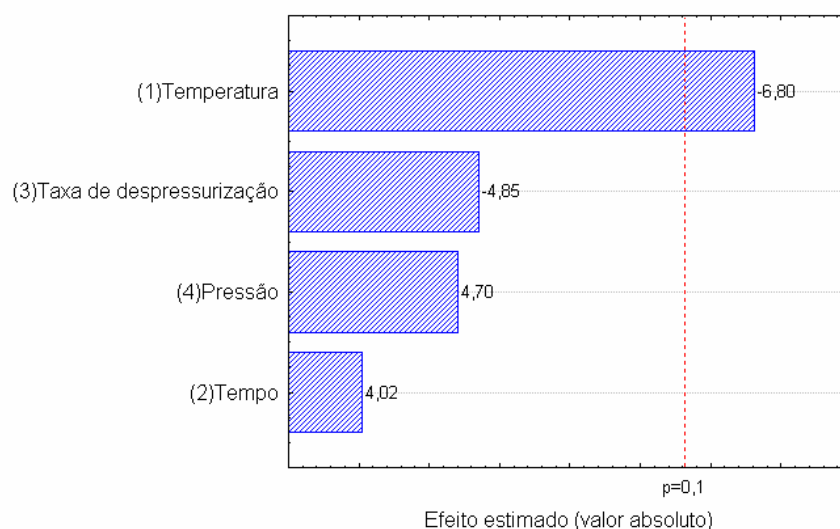


Figura 4.10. Gráfico de Pareto da atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* liofilizada após tratamento em propano pressurizado.

A análise desta figura permite concluir que, dentro do intervalo de estudo investigado, somente a temperatura apresentou efeito significativo ($p < 0,10$) negativo na atividade de hidrólise da lipase de *Yarrowia lipolytica*. Fazendo referência aos resultados obtidos para as lipases Amano PS e Amano AY30 pode-se novamente verificar que diferentes enzimas possuem diferentes comportamentos em propano pressurizado.

Lipase de *Yarrowia lipolytica* ressuspendida

Os resultados obtidos para a lipase de *Yarrowia lipolytica* na forma livre (ressuspendida) após processamento em propano pressurizado são apresentados na Tabela 4.8. Cabe salientar que nesta etapa foi avaliada a atividade hidrolítica em função do tempo de processamento. No entanto, visando uma comparação mais direta com os dados obtidos anteriormente para a lipase liofilizada, a análise estatística foi realizada apenas para os tempos de 0,5 e 3 horas de processamento no propano pressurizado. A curva cinética obtida para cada condição experimental apresentada na Tabela 4.8 é demonstrada na Figura 4.11.

Tabela 4.8. Atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* ressuspensa após tratamento com propano pressurizado em função do tempo de processamento.

Condição Experimental (T-P)	Tempo (minutos)				
	15	30	60	120	180
	Atividade Residual (%)				
35°C-30Bar	102,92	88,77	89,17	89,39	74,12
35°C-200Bar	89,50	73,27	74,45	68,11	79,61
55°C-30Bar	17,89	18,73	17,68	3,12	0,21
55°C-200Bar	5,58	0,00	0	0	0,00
45°C-115Bar	87,58	69,26	55,43	36,45	33,66
45°C-115Bar	66,10	63,25	52,67	61,41	22,78
45°C-115Bar	68,55	73,83	59,76	43,55	27,14

A análise da Tabela 4.8 e da Figura 4.11 permite verificar que, em todas as condições experimentais houve um decréscimo contínuo da atividade residual da lipase em função de tempo de tratamento em propano pressurizado. Tal efeito foi mais pronunciado nas condições de maiores temperaturas (55°C), parecendo esta variável afetar negativamente a atividade da enzima ao longo do processamento.

Após esta análise prévia em relação à atividade residual como função do tempo de exposição da lipase ressuspensa em propano pressurizado, os dados apresentados na tabela anterior foram tratados estatisticamente nos tempos de 30 e 180 minutos, visando avaliar o efeito das variáveis pressão e temperatura na atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* ressuspensa.

Os resultados apresentados na Tabela 4.8, após 30 minutos de exposição da enzima ao propano pressurizado, foram tratados estatisticamente e um modelo empírico foi obtido (Equação 4.2). O modelo codificado para a atividade residual em função da temperatura e da pressão foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 4.9. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.12.

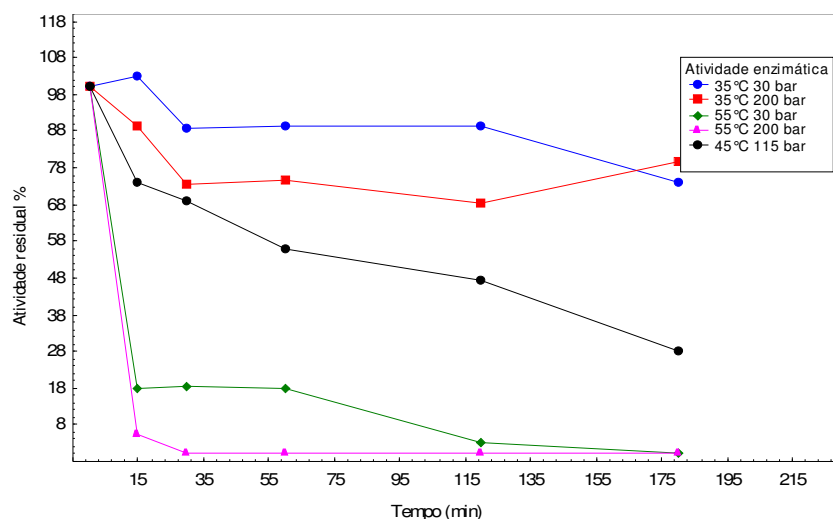


Figura 4.11. Atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* ressuspensa em função do tempo de exposição ao propano pressurizado.

$$Atividade\ residual\ (\%) = 55,30 - 8,55.P - 35,82.T \quad (4.2)$$

Na Figura 4.12 pode-se verificar que em níveis inferiores de pressão e de temperatura são obtidos os maiores valores de atividade residual. Neste aspecto, pode-se evidenciar que existe uma tendência de aumento da atividade residual com a diminuição da pressão e da temperatura, mostrando que para esta enzima, a pressão afeta negativamente a atividade hidrolítica, bem como a temperatura.

Os resultados apresentados na Tabela 4.8, após 180 minutos de exposição da enzima ao propano pressurizado, foram tratados estatisticamente e um modelo empírico foi obtido (Equação 4.3). O modelo codificado para a atividade residual em função da temperatura e da pressão foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 4.10. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,92) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.13.

Tabela 4.9. Análise de variância para a atividade residual em função da temperatura e da pressão para a lipase de *Yarrowia lipolytica* após 30 minutos de processamento em propano pressurizado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	5426,78	2	2713,38	10,71
Resíduo	1012,66	4	253,16	
Falta de ajuste	956,36	2		
Erro puro	56,30	2		
Total	6439,44	6		

Coeficiente de correlação: $R=0,92$, $F_{0,90;4;6}=4,32$

$$\text{Atividade residual (\%)} = 33,93 - 38,38.T \quad (4.3)$$

Tabela 4.10. Análise de variância para a atividade residual em função da temperatura e da pressão para a lipase de *Yarrowia lipolytica* após 180 minutos de processamento em propano pressurizado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	5892,15	1	5892,15	109,71
Resíduo	268,52	5	53,70	
Falta de ajuste	208,57	3		
Erro puro	59,95	2		
Total	6160,68	6		

Coeficiente de correlação: $R=0,98$, $F_{0,95;4;6}=6,60$

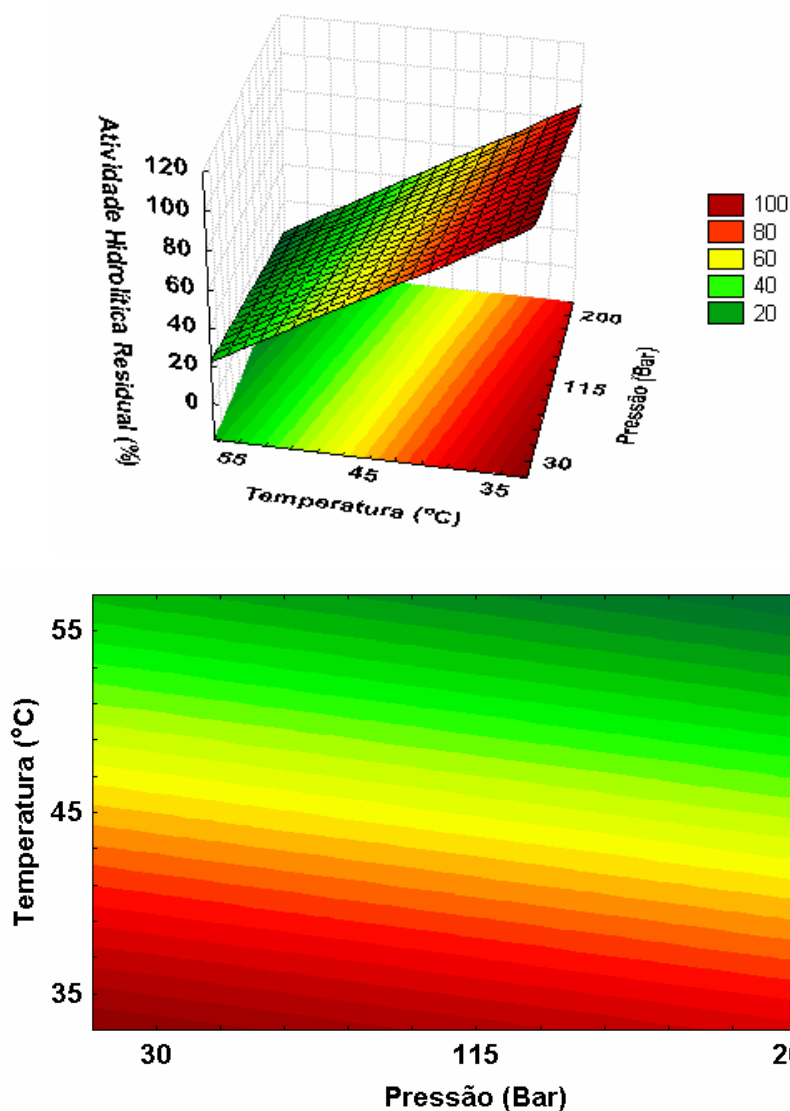


Figura 4.12. Superfície de resposta e curva de contorno da atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* ressuspensa após tratamento por 30 minutos em propano pressurizado.

Na Figura 4.13 pode-se verificar que somente a temperatura apresentou efeito significativo negativo na atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* após processamento por 180 minutos em propano pressurizado. Cabe mencionar que a atividade ótima desta enzima encontra-se em torno de 40°C, sugerindo

inconsistência na tentativa de deslocar os níveis desta variável no sentido de aumentar ainda mais a atividade residual.

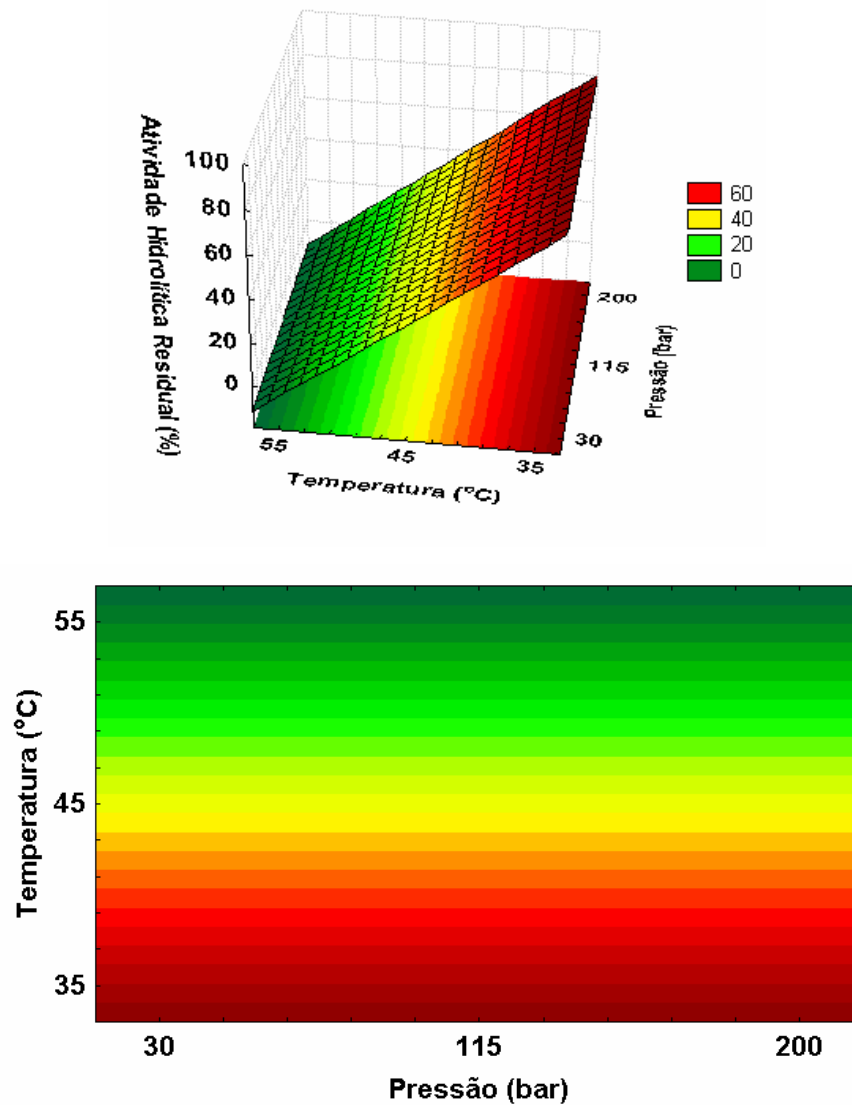


Figura 4.13. Superfície de resposta e curva de contorno da atividade residual da lipase de *Yarrowia lipolytica* ressuspensa após tratamento por 180 minutos em propano pressurizado.

4.4 Considerações Finais

A partir dos resultados apresentados no decorrer deste capítulo, relacionados ao comportamento de três lipases, duas comerciais (Amano PS e Amano AY30) e uma não comercial (obtida por fermentação submersa de *Yarrowia lipolytica*), nas formas livre (liofilizada e ressuspendida) e imobilizada, após processamento em propano pressurizado e, devido ao grande volume de informações, buscar-se-á compilar os dados, como forma de melhor visualização global dos resultados obtidos.

Primeiramente, será apresentada a compilação referente ao comportamento das três lipases avaliadas na forma livre (liofilizada). A Figura 4.14 apresenta a compilação de tais dados. Os números apresentados na abscissa são relacionados às condições experimentais estudadas no planejamento experimental (Tabelas 4.1, 4.4 e 4.7).

Com base nesta figura, pode-se verificar que, de forma geral, as três lipases apresentaram um bom comportamento em propano pressurizado, salvo em algumas condições experimentais; comprovando que, dentro das faixas de temperatura, pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização investigadas, o propano mostrou-se um solvente adequado para a catálise de reações bioquímicas utilizando as enzimas na forma liofilizada aqui enfocadas.

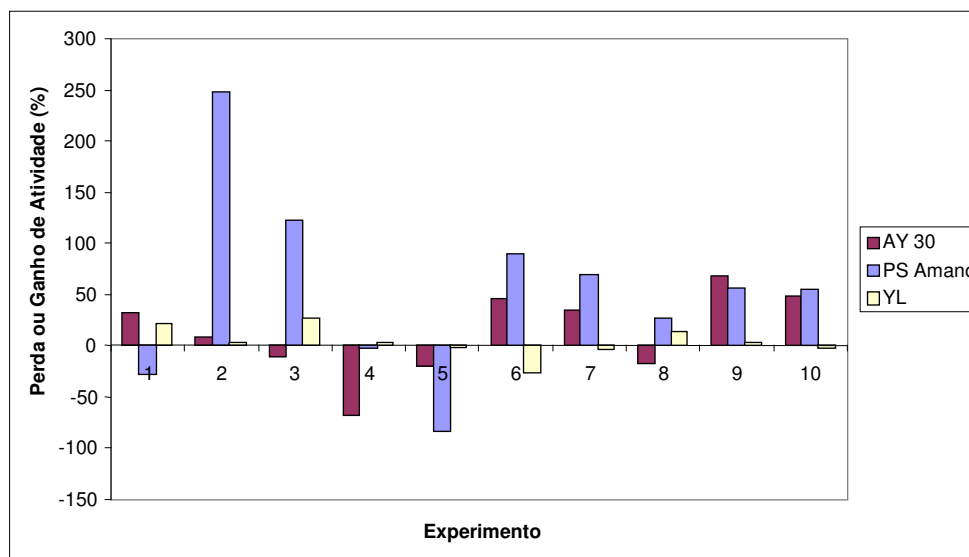


Figura 4.14. Compilação dos resultados de atividade residual em função da lipase liofilizada utilizada após processamento em propano pressurizado.

As Figuras 4.15 e 4.16 apresentam gráficos relacionados a diferentes condições experimentais em função da lipase na forma ressuspensa investigada. Os gráficos referentes às demais condições experimentais encontram-se no Anexo I.

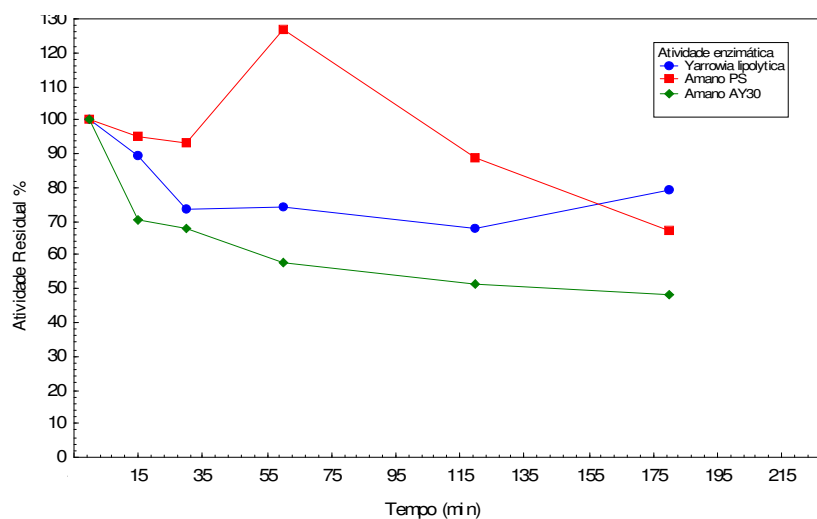


Figura 4.15. Compilação dos resultados de atividade residual em função da lipase ressuspensa. Condição experimental de 35°C e 200bar.

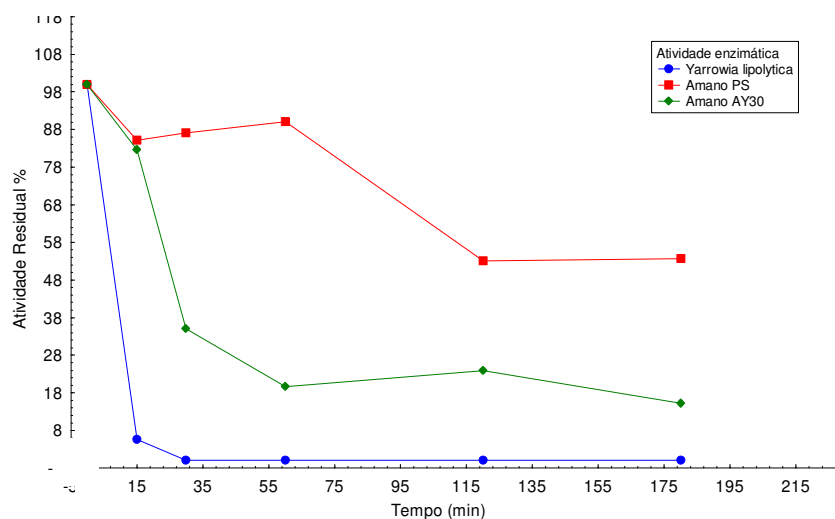


Figura 4.16. Compilação dos resultados de atividade residual em função da lipase ressuspensa. Condição experimental de 55°C e 200bar.

A análise destas figuras permite verificar um efeito pronunciado da temperatura em relação à pressão na atividade residual das lipases. Uma tendência geral demonstra maior estabilidade da lipase Amano PS frente às condições experimentais apresentadas.

A Figura 4.17 apresenta a compilação completa dos dados obtidos para as lipases ressuspensas em função do tempo de exposição ao propano pressurizado. Os números apresentados na abscissa são relacionados às condições experimentais estudadas no planejamento experimental (Tabelas 4.2, 4.5 e 4.8).

De uma forma geral, com base na figura apresentada, pode-se verificar que, para as três enzimas, após exposição de 180 minutos ao propano pressurizado, ocorreu uma queda expressiva da atividade enzimática. Apenas a condição experimental 1 (menor temperatura – 35°C e menor pressão – 30bar) para a lipase Amano PS apresentou, após 180 minutos de processamento, um incremento em relação à atividade inicial.

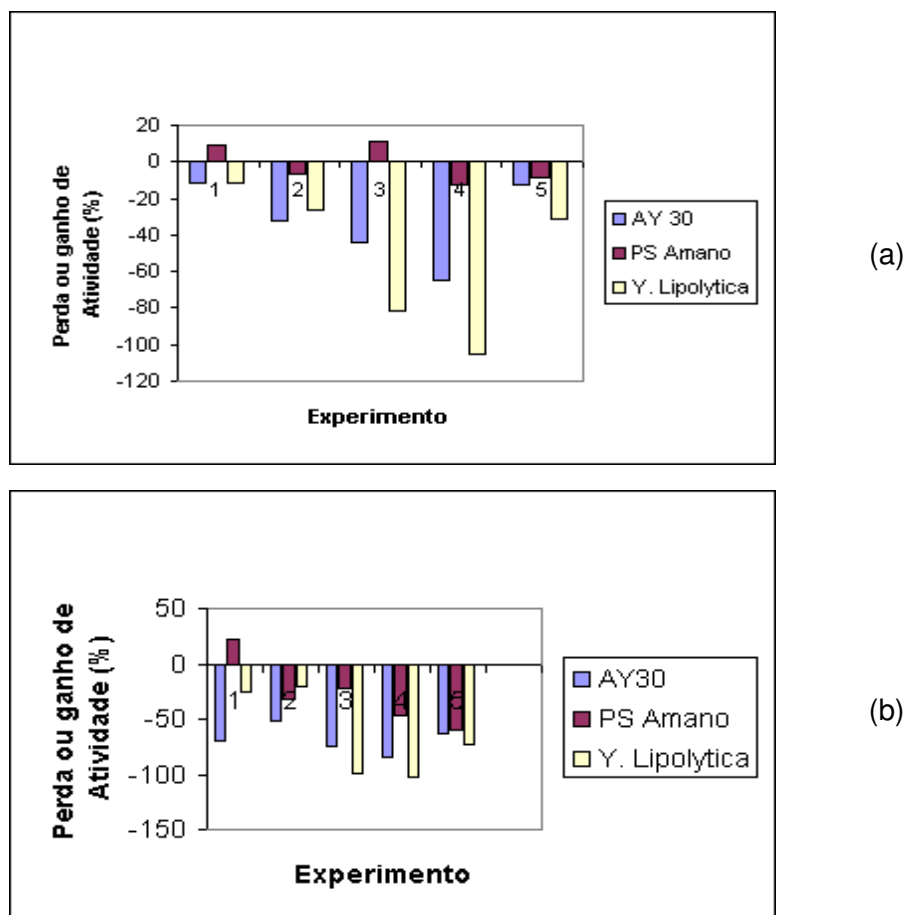


Figura 4.17. Compilação dos resultados de atividade enzimática em função da lipase ressuspendida para cada condição experimental. (a) após 30 minutos de exposição, (b) após 180 minutos de exposição.

Para fins de comparação em relação à forma de apresentação da enzima (liofilizada e imobilizada), a Figura 4.18 apresenta os dados obtidos em relação à lipase Amano PS. Através da análise desta figura pode-se verificar que, para esta enzima, após processamento com propano pressurizado, a forma livre da enzima pareceu apresentar maior estabilidade que a forma imobilizada.

Com base em todos os resultados apresentados anteriormente, de uma forma geral, pode-se concluir que a atividade enzimática varia de forma significativa dependendo da enzima, da forma de apresentação da mesma, do fluido pressurizado e da condição experimental investigada. Os resultados aqui apontados permitem definir para cada enzima e em cada forma de apresentação,

faixas de operação em termos de atividade residual para aplicação das mesmas como catalisadores de reações de hidrólise de interesse, tornando possível, com base nos dados aqui apresentados e nos resultados apontados na literatura, verificar que o propano apresenta-se como um solvente adequado à consecução de tais reações.

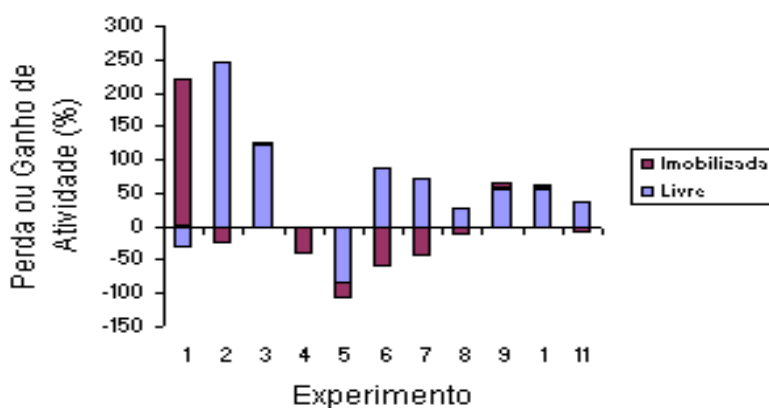


Figura 4.18. Compilação dos resultados de atividade enzimática em função da forma de apresentação (imobilizada e liofilizada) da lipase Amano PS.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

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

- As lipases apresentam diferentes comportamentos dependendo da forma de apresentação e das condições experimentais, podendo-se concluir que os efeitos de interação enzima-solvente apresentam papel fundamental no comportamento da enzima em fluido pressurizado.

- O propano mostrou-se um solvente adequado à execução de reações enzimáticas neste meio pois, na maioria dos sistemas avaliados, conduziu a um aumento da atividade hidrolítica após processamento.

Como conclusões específicas, relativas à cada sistema estudado, pode-se mencionar:

- O maior incremento da atividade obtido para a lipase Amano PS liofilizada (aproximadamente 340%) ocorreu na condição de 35°C, 30 minutos de exposição ao propano, taxa de despressurização rápida (50bar/min) e pressão de 200bar;

- Após 30 minutos de processamento em propano pressurizado, a lipase Amano PS ressuspensa manteve praticamente inalterada sua atividade inicial;

- O processamento da lipase Amano PS ressuspensa em propano a 35°C e pressão de 30bar conduziu, após 180 minutos de exposição, à manutenção da atividade inicial;

- Incrementos da ordem de 300% foram obtidos após tratamento da lipase Amano PS imobilizada à 35°C, 30 minutos de exposição, taxa de despressurização lenta (2bar/min) e 30bar de pressão;

- O processamento da lipase Amano AY30 liofilizada conduziu, em praticamente todas as condições experimentais, à manutenção da atividade inicial;

- Maiores temperaturas (55°C) e pressões (200bar) conduziram à inativação completa da lipase Amano AY30 ressuspensa após exposição de 30 minutos em propano pressurizado;

- O processo de imobilização em Accurel EP100 reduziu significativamente a atividade hidrolítica da lipase Amano AY30;
- A lipase de *Yarrowia lipolytica* liofilizada apresentou excelente estabilidade em termos de atividade de hidrólise após tratamento com propano pressurizado, em todas as condições experimentais avaliadas;
- A lipase de *Yarrowia lipolytica* ressuspensa apresentou queda gradativa de atividade em função do tempo de processamento em propano, tendo sido esta mais acentuada nas condições de maior temperatura e pressão.

5.2 Sugestões

Tomando como base os resultados obtidos e dadas às observações constatadas durante o desenvolvimento deste trabalho, pode-se apontar algumas sugestões para trabalhos futuros:

- 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;
- Avaliação do comportamento da atividade das lipases frente ao processamento em outros fluidos pressurizados (CO₂, por exemplo);
- Avaliação do comportamento da atividade de outras lipases não comerciais em fluidos pressurizados;
- Utilização dos resultados obtidos neste trabalho para definir regiões de operação para reações de hidrólise em meio pressurizado usando lipases como catalisadores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE, J.M., OESTREICHER, E.G., ANTUNES, O.A.C., OLIVEIRA, J.V., OLIVEIRA, D., SOARES, C.M., DARIVA, C. "Effect of Treatment with Compressed CO₂ and Propane on D-Hydantoinase Activity". Journal of Molecular Catalysis B. (2007) Submetido para publicação.

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

BEVILAQUA, J.V., PINTO, J.C., LIMA, L.M., BARREIRO, A.G., ALVES, T.L.M., FREIRE, D.M.G. "Enzymatic hydrolysis by immobilized lipase applied to a new prototype anti-asthma drug". Biochemical Engineering Journal 21 (2004) 103.

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 26 (2003) 75.

CHEN, J.S., BALABAN, M.O., WEI, C.L., MARSHALL, M.R., HSU, W.Y. "Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40 (1992) 2345.

CHUA, L.S., SARMIDI, M.R. "Effect of solvent and initial water content on (R, S)-1-phenylethanol resolution". Enzyme and Microbial Technology 38 (2006) 551, 556.

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

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

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

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.

GANDHI, N. N. "Applications of lipases". Journal of the American Oil Chemist Society, v74, n.6, pp. 621 – 634, 1997.

GIEBAUF, A.; GAMSE, T. "A simple process for increasing the specific activity of porcine pancreatic lipase by supercritical carbon dioxide treatment". J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 9 (2000) 57.

HABULIN, M., KNEZ, Z. "Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane". J. Chem. Technol. Biotechnol. 76 (2001) 1260.

HALLING, P. J. "Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: predictions of effects on equilibrium position". Biotechnology and Bioengineering. 35, 7 (1990) 691.

HAMMOND, D. A.; KAREL, M.; KLIBANOV, A. M.; KRUKONIS, V. J. "Enzymatic reactions in supercritical gases". Appl. Biochem. Biotechnol. 11 (1985) 393.

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

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

ISHIKAWA, H.; SHIMODA, M.; YONEKURA, A.; OSAJIMA, Y. "Inactivation of enzymes and decomposition of α -helix structure by supercritical carbon dioxide microbubble method". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (1996) 2646.

KASCHE, V., SCHLOTHAUER, R., BRUNNER, G. "Enzyme denaturation in supercritical CO₂: stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step". *Biotechnol. Lett.* 10 (1988) 569.

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

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

KNEZ, Z., HABULIN, M., KRME LJ, V. "Enzyme catalyzed reactions in dense gases". *J. Supercrit. Fluids* 14 (1998) 17.

KUMAR, R., MADRAS, S., MODAK, J. "Enzymatic Synthesis of Ethyl Palmitate in Supercritical Carbon Dioxide". *Ind. Eng. Chem. Res.*, 43 (2004) 1568.

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 SCCO₂". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 113-116 (2005) 181.

LEAL, M. C. M. R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. Rio de Janeiro: 2000. Dissertação de Mestrado. Programa de Engenharia Química da COPPE, UFRJ.

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

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*. 67 (1990) 890.

MARIA, P.D., SINISTERRA, J.M., MONTERO, J.M., LOTTI, G., VALERO, C., ALCÂNTARA, A.R. "Synthesis of 2'-deoxyribosynucleosides using new 2'-deoxyribosyltransferase microorganism producers". *Enzyme and Microbial Technology* 28 (2006) 199.

McHUGH, M.; 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.

NAKAMURA, K., CHI, Y.M.; YAMADA, Y.; YANO, T. "Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide". *Chemical Enginnering Community*. 45 (1985) 207.

NAKAYA, H., MIYAWAKI, O., NAKAMURA, G. "Determination of *log P* for pressurized carbon dioxide and its characterization as a medium for enzyme reaction". *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 176.

NDIAYE, P.M., FRANCESCHI, E., OLIVEIRA, D., DARIVA, C., TAVARES, F.W., OLIVEIRA, J.V. "Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures". *J. Supercrit. Fluids*, 37 (2006) 29.

OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J.V. "Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexano and SC-CO₂". *J. Supercrit. Fluids*. 19 (2001) 141.

OLIVEIRA, D e OLIVEIRA, J. V. "Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in SC-CO₂". *Industrial & Engineering Chemical Research*. 39 (2000) 4450.

OLIVEIRA, D. “Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO₂ supercrítico”. Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro- COPPE, RJ, Brasil, 1999.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; DARIVA, C.; CUNHA, A.G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J.V.; FREIRE, D.M.G. “Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 39, 1-4 (2006) 117.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A.F.; KUNITA, M.H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. “Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids”. *The Journal of Supercritical Fluids*. 38 (2006) 127.

PRIMO, M.S., CENI, G.C., OLIVEIRA, J.V., OLIVEIRA, D., ANTUNES, O.A.C., DARIVA, C. “Peroxidase (POD) and Polyphenoloxidase (PPO) from Mate Tea Leaves treated with compressed carbon dioxide”. *Journal of Supercritical Fluids* (2007) Submetido para publicação.

RANDOLPH, T. W.; CLARCK, D. S.; BLANCH H. W.; PRAUSNITZ, J. M. “Enzymatic oxidations of cholesterol aggregates in SC-CO₂” *Science*. 238 (1988) 387.

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

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

SEYDERHELM, I.; BOGUSLOVSKI, S.; MICHAELIS, G.; KNORR, D. “Pressure induced inactivation of selected food enzymes”. *Journal of Food Science*. 61 (1996) 208.

SHARMA, R.; CHISTI, Y. e BANERJEE, U.C. “Production, purification, characterization, and applications of lipases”. *Biotechnology Advances*. 19 (2001) 627.

TANIGUCHI, M.; KAMIHIRA, M.; KOBAYASHI, T. "Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity". *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 593.

TEDJO, W.; ESHTIAGHI, M. N.; KNORR, D. "Impact of supercritical carbon dioxide and high pressure on lipoxygenase and peroxidase activity". *Journal of Food Science.* 65 (2000) 1284.

TORRE, O., FERNÁNDEZ, V.G., GOTOR, V. "Lipase-catalyzed resolution of chiral 1,3-amino alcohols: application in the asymmetric synthesis of (S)-dapoxetine". *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (2006) 860.

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.

ZAKS, A e KLIBANOV, A.M. "Why does ribonuclease irreversibly inactive at high temperatures?". *Biochemistry.* 12 (1985) 5432.

7. ANEXOS

Anexo I

**Atividade residual das lipases PS e AY30 (Amano Inc.) e de
Yarrowia lipolytica ressuspendidas
em propano pressurizado em função da pressão e da temperatura**

