



OBTENÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS QUIRAIS UTILIZANDO LIPASES EM REATORES ASSISTIDOS POR MEMBRANAS

Antônio Carlos de Oliveira Machado

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Cristiano Piacsek Borges

Rio de Janeiro
Dezembro de 2011

OBTENÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS QUIRAIS UTILIZANDO LIPASES EM
REATORES ASSISTIDOS POR MEMBRANAS

Antônio Carlos de Oliveira Machado

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. Denise Maria Guimarães Freire, D. Sc.

Prof. Cristiano Piacsek Borges, D.Sc.

Prof. Alessandro Bolis Costa Simas, D.Sc.

Prof. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof. Reginaldo Ramos de Menezes, D.Sc.

Prof. Maria da Graça do Nascimento, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

DEZEMBRO DE 2011

Machado, Antônio Carlos de Oliveira

Obtenção de intermediários quirais utilizando lipases em reatores assistidos por membranas/ Antônio Carlos de Oliveira Machado - Rio de Janeiro COPPE/UFRJ [2011].

XXIV, 165 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire,
Cristiano Piacsek Borges

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 144-165.

1.Lipases. 2.Imobilização. 3. Contactores de membrana. I. Freire, Denise Maria Guimarães, *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Eu dedico este trabalho aos meus amados pais Estela e Luis (eternamente entre nós), a minha irmã, Sandra, meus afilhados, meus amigos e a minha avó que me ajudou imensamente no início de tudo.

"As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos."

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, pela oportunidade de ter feito parte do corpo docente desta importante instituição.

A minha querida orientadora Denise Freire, a qual me fez acreditar que existia uma luz no fim do túnel. Além disso, agradeço pela indiscutível competência e dedicação na transmissão de conhecimentos.

Ao meu também orientador Cristiano Borges pela orientação, paciência, competência e atenção disponibilizada durante este trabalho.

Ao meu Pai Luis Carlos por tudo que fez por mim, principalmente por acreditar no meu potencial e ter me incentivado, mesmo só no Rio de Janeiro, a seguir sempre em frente superando todos os obstáculos. Pai dedico a você com muito amor essa Tese e te peço desculpas por tudo...Sei que você estará comigo sempre.....Nunca te esquecerei....

À minha amada mãe por todo seu carinho e dedicação, desde pequeno, acreditando que um dia eu chegaria lá. Obrigado por tudo e sempre saiba que se hoje sou alguém na profissão que escolhi devo tudo a você que, sobretudo me deu a vida. Pode ter certeza de que sempre estarei aqui sempre que você precisar.

À minha Vó que independente de qualquer coisa apoiou minha mãe na hora em que mais precisou, e graças a ela tive força de vontade para estudar e crescer na vida.

À minha irmã, que mesmo sendo maluquinha sempre acreditou em mim...Lembra quando a gente estudava junto, era uma loucura.

À Romi pela ajuda inicial com Bradford.

À Beth por toda sua paciência com as análises de DSC e TGA, além dos ensinamentos iniciais no preparo de membranas.

À Mariana pelas conversas de corredor e a ajuda no MEV.

À Cristina por todos os favores, que foram muitos. Obrigado por tudo.

Ao Wilson, amigo eterno, pela paciência e todas as ajudas ao longo desta Tese. Dizem que Deus costuma colocar anjos na vida das pessoas e com certeza você é uma destas pessoas. Apreendi muito com você.

Ao Alessandro e ao Ângelo pela produção dos substratos utilizados ao longo dos experimentos.

Ao Roberto “Bob” pela ajuda na montagem do sistema de bancada.

Ao pessoal do LABIM por me aturar. Não vou citar todos porque sempre a gente esquece de alguém, então prefiro que todos se sintam agradecidos.

As minhas eternas amigas Vanessa e Mariana, que apesar da distância sempre me procuram.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho os meus sinceros agradecimentos.

Ao CNPQ pela bolsa de doutorado.

Agradeço em especial a Deus por ter me permitido chegar até aqui superando todas as dificuldades. Sem sua ajuda nada disso teria sido possível, nem mesmo teria sentido.

Obrigado.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

OBTENÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS QUIRAIS UTILIZANDO LIPASES EM REATORES ASSISTIDOS POR MEMBRANAS

Antônio Carlos de Oliveira Machado

Dezembro/2011

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Cristiano Piacsek Borges

Programa: Engenharia Química

Este trabalho investigou o uso de diferentes lipases em meio orgânico, via catálise enantiosseletiva para a produção do (*R,S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol ((*R,S*)-IPG), que na forma *S* pode ser usado como intermediário quiral na produção de bloqueadores β -adrenalérgicos e inibidores de β -galactosidase. Assim, a partir do éster octanoato de (*R,S*)-IPG foram realizadas reações de hidrólise enantiosseletivas alterando-se: temperatura, pH, concentração de água e diferentes solventes. O acompanhamento do processo foi baseado nos valores de conversão e excessos enantioméricos (*ee*), e a otimização das condições reacionais mostraram que a temperatura e o pH ótimos para o processo (*ee*(*P*) > 99%) foram, respectivamente, 30°C e 7 em acetato de etila (50%) com a lipase Amano AK. Ensaio de imobilização com lipase AK foram conduzidos através de adsorção hidrofóbica e ligação covalente tanto em suporte microporoso como em membranas (comerciais ou “*home made*”) e devido à elevada perda de atividade enzimática (60%) após a imobilização, optou-se por utilizar a lipase confinada em reatores de membrana. Ensaio preliminares de resolução cinética foram conduzidos em um contactor de membranas planas compostas poli(éterimida) (PEI) recoberta com filme de PVA) a 30°C com vazões da fase aquosa e da fase orgânica iguais a 5,14 L/h e 6,4 L/h, respectivamente.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

OBTAINING CHIRAL INTERMEDIATES USING LIPASES IN MEMBRANE
ASSISTED REACTORS

Antônio Carlos de Oliveira Machado

December/2011

Advisors: Denise Maria Guimarães Freire

Cristiano Piacsek Borges

Department: Chemical Engineering

This study investigated the use of different lipases in organic medium, via enantioselective catalysis for the production of (*R,S*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol ((*R,S*)-IPG), which in the form S can be used as a chiral intermediate in the production of β -adrenergic blockers and β -galactosidase inhibitors. Thus, from the octanoate (*R,S*)-IPG ester, enantioselective hydrolysis were performed changing temperature, pH, water and different solvents. The monitoring process was based on the values of conversion and enantiomeric excess (ee), and the optimization of reaction conditions showed that the temperature and pH for the process ($e(P) > 99\%$) were respectively 30°C and 7 in ethyl acetate (50%) with Amano lipase AK. Immobilization tests were conducted with lipase AK by hydrophobic adsorption and covalent binding both in microporous support and membranes (commercial or "home made") and saw the high loss of enzyme activity (60%) after immobilization, the lipase was only confined. The preliminary tests of kinetic resolution were carried out in a flat composite membrane contactor (poly-ether-imide (PEI) film coated with PVA) at 30°C and the flow of the aqueous phase and organic phase were 5,14L/h and 6,4 L / h, respectively.

Índice

	Página
Capítulo 1: Introdução e Objetivos	1
1.1 Contextualização	1
1.2 Objetivos	4
Capítulo 2: Revisão bibliográfica	5
2.1 Enzimas	5
2.1.1 Lipases	6
2.1.1.1 Características gerais	6
2.1.1.2 Aplicações de lipases	11
2.1.1.3 Aspectos estruturais e mecanismo catalítico das lipases	13
2.1.1.3.1 Resolução de misturas racêmicas	17
2.1.1.3.1.1 Cinética de enantiosseletividade com substratos enantioméricos	22
2.2 Imobilização de enzimas	24
2.2.1 Aspectos gerais	24
2.2.1.1 Imobilização de lipases por adsorção por interação hidrofóbica	31
2.2.1.1.1 Modelo de Langmuir	40
2.2.1.1.2 Modelo de Langmuir-multicamada	41
2.2.1.1.3 Modelo de Freundlich	41
2.2.1.1.4 Modelo de Langmuir-Freundlich	42
2.2.1.2 Imobilização de lipases via ligação covalente	43
2.3 Reatores multifásicos	46
2.3.1 Contactores de membrana	47
2.3.1.1 Transferência de massa em contactores de membrana	51
2.3.1.1.1 Equações para transferência de massa em contactores de membranas	52
2.3.2 Aplicações dos contactores de membrana	54
2.3.2.1 Extração líquido-líquido	55
Capítulo 3: Material e Métodos	60
3.1 Material	60
3.2 Métodos	61

3.2.1	Preparo das membranas de Poli(éter imida) (PEI)	61
3.2.2	Preparo de membranas planas por espalhamento simples	62
3.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	63
3.2.4	Determinação da área específica	64
3.2.4.1	Isoterma de BET	64
3.2.4.2	Picnometria	64
3.2.4.2.1	Volume total do sólido (matriz e poros)	64
3.2.4.2.2	Volume total da matriz	65
3.2.4.2.3	Determinação do raio médio (RMP) dos poros e área específica	65
3.2.5	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	66
3.2.6	Termogravimetria (TG)	66
3.2.7	Imobilização via adsorção hidrofóbica	66
3.2.7.1	Preparo dos suportes	66
3.2.7.2	Imobilização	67
3.2.7.3	Dosagem de atividade hidrolítica por método espectrofotométrico	67
3.2.8.	Imobilização via ligação covalente	68
3.2.8.1	Ativação dos suportes com glutaraldeído	68
3.2.8.2	Imobilização	68
3.2.8.2.1	Cálculo dos parâmetros de imobilização	68
3.2.9	Dosagem de proteínas	70
3.2.10	Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	70
3.2.11	Resolução dos derivados do (<i>R,S</i>)-1,2-O-isopropilideno glicerol	70
Capítulo 4: Resultados e Discussão		74
4.1	Reações enzimáticas enantiosseletivas	74
4.1.1	Resolução dos ésteres derivados do (<i>R,S</i>)-1,2-O-isopropilideno glicerol	74
4.1.1.1	Seleção de enzimas	77
4.1.1.2	Efeito do solvente, temperatura, concentração enzimática e pH na resolução enantiomérica do octanoato de (<i>R,S</i>)-IPG	80
4.1.1.2.1	Efeito do pH e concentração de água no meio reacional	80

4.1.1.2.2 Efeito da concentração de enzima, solvente orgânico e temperatura	83
4.2 Caracterização dos Suportes	96
4.2.1 Microscopia de Varredura Eletrônica das Membranas de poli (éter-imida) (PEI)	96
4.2.2 Microscopia de Varredura Eletrônica da membrana comercial de Nylon 6,6	104
4.2.3 Microscopia de Varredura Eletrônica da membrana comercial de Polipropileno (PP)	105
4.2.4 Microscopia de Varredura Eletrônica do suporte Accurel	106
4.2.5 Determinação da área específica (ASE) das membranas porosas e accurel MP 100 utilizados na imobilização de enzimas	107
4.3 Estudo de diferentes suportes no ensaio de imobilização da lipase Amano AK	109
4.3.1 Polipropileno	109
4.3.2 Membranas de Poli (éterimida) (PEI)	120
4.3.3 Membranas de Nylon 6,6	127
4.4 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	130
4.5 Termogravimetria (TG)	134
4.6 Reator enzimático assistido por membranas	135
Capítulo 5: Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros	141
5.1 Conclusões	141
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	143
Capítulo 6: Bibliografia	144

Índice de Figuras

Figura 1.1: Enantiômeros da talidomida.	2
Figura 1.2: Estrutura do (R,S)-IPG.	3
Figura 2.1: Mercado mundial de enzimas industriais no período de 2008-2015.	6
Figura 2.2: Reação de hidrólise catalisada por triacilgliceol lipases.	7
Figura 2.3: Reações catalisadas por lipases.	8
Figura 2.4: Representação esquemática do motivo estrutural conservado em enzimas da família α/β hidrolise. Filamentos em conformação β (1-8) formando uma estrutura em folha β -pregueada estão indicados pelas setas, estrutura em α -hélices (A-F) indicadas pelas colunas. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica estão indicadas pelos círculos.	14
Figura 2.5: Superposição dos esqueletos das lipases de <i>Rhizomucor miehei</i> (a) e de pâncreas humano (b), mostrando a mudança conformacional da tampa na ativação interfacial. As tampas estão destacadas em verde (fechado) e laranja (aberto).	15
Figura 2.6: Mecanismo cinético (Ping-Pong Bi Bi) de lipase catalisando reações envolvendo múltiplos substratos e produtos usando a notação de Cleland's (E: enzima; Es: éster; Al: álcool; Ac: ácido, W: água, F: acil enzima, $i = 1, 2, 3, \dots$, I; $j = 1, 2, 3, \dots$, J)	15
Figura 2.7: Mecanismo geral das reações catalisadas por lipases, considerando também a reação de transesterificação (Tríade catalítica numerada como na lipase Cal-B, Ser105–His224–Asp187; Primeiro substrato = EtOAc, segundo substrato = ROH; IT = Intermediário tetraédrico)	16
Figura 2.8: a) Representação das duas porções hidrofóbicas da enzima; b) Esquematização do encaixe álcool/enzima	20
Figura 2.9: Simetria de hidrólise enzimática e reação de transesterificação de acordo com Kazlauskas.	20
Figura 2.10: Exemplo de Resolução Cinética Dinâmica de alcoóis.	21
Figura 2.11: Diferentes técnicas de imobilização.	27
Figura 2.12: Interação entre suporte e enzima.	33
Figura 2.13: Imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos.	34

Figura 2.14: Exemplo da formação de base de Schiff utilizando suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando o glutaraldeído como agente de ativação.	44
Figura 2.15: Seleção de reatores multifásicos.	46
Figura 2.16: (a) Contactor de membrana de fluxo paralelo comercializado pela CELGARD LLC; (b) Esquema básico de funcionamento de um contactor e (c) Geração da interface nos poros da membrana.	48
Figura 2.17: Perfil de concentração de um dado soluto para uma membrana hidrofóbica. Onde: 1: Membrana hidrofóbica, 2: Fase orgânica, 3: Fase aquosa e 4: Poros da membrana.	51
Figura 2.18: Esterificação do ácido mandélico via contactor de membranas.	56
Figura 2.19: Esquema de separação do ácido mandélico através de resolução cinética dinâmica.	57
Figura 2.20: Resolução cinética do ibuprofeno éster racêmico via lipase catalisando a reação de hidrólise, R' designa um grupo alquil.	57
Figura 2.21: Estruturas químicas do (S)-1-heptil-ibuprofeno éster e (S)-2-etóxietyl-ibuprofeno éster.	58
Figura 2.22: Sistema utilizado para separação de misturas racêmicas com um contactor de membranas.	58
Figura 3.1: Estruturas poliméricas contidas nas membranas, (a) PEI, (b) Nylon 6,6 e (c) PP.	61
Figura 3.2: Representação esquemática da preparação de membranas planas.	63
Figura 3.3: Reação de hidrólise do acetato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno.	71
Figura 3.4: Reação de hidrólise do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno.	71
Figura 3.5: Sistema de transferência de massa da fase orgânica para fase aquosa.	73
Figura 3.6: Sistema de recirculação com contactor de membrana plana.	73
Figura 4.1: X (%) (●), ee(S) (□) e ee(P) (⊕) nas reações de hidrólise do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) catalisada por diferentes lipases (50 mg) a 35°C em acetato de etila em (a) 2 horas e (b) 24h de reação.	78

- Figura 4.2:** Gel de eletroforese da lipase de *Pseudomonas fluorescens*, comercialmente denominada amano AK em diferentes concentrações. Da esquerda para direita: Padrão de massa molar e soluções com a lipase de interesse. 79
- Figura 4.3:** Variação de X (%) (☒), ee(S) (■) e ee(P) (□) em função do pH em bateladas contendo (a) 16,6% ; (b) 50% e (c) 83,3 % v/v de água, nas reações de hidrólise do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM). Todas as reações foram conduzidas em acetato de etila com 0,9 U de atividade enzimática colocada e a 30°C. 81
- Figura 4.4:** Resolução cinética do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em acetato de etila com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 30°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1. 84
- Figura 4.5:** Resolução cinética do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em tolueno com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 30°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1. 84
- Figura 4.6:** Resolução cinética do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em hexano com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 30°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1. 85
- Figura 4.7:** Cromatograma obtido da reação (5 horas) entre a enzima Amano AK (0,9 U) e o octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno em 3 horas de reação em acetato de etila a 30°C. 86
- Figura 4.8:** Variação de ee(P) (☒) e X (■) em (a) 3 e (b) 24 horas de reação do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) com a enzima amano AK (0,9 U) em diferentes solventes com água (1:1). 87
- Figura 4.9:** Resolução cinética do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em acetato de etila com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 10°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1. 90
- Figura 4.10:** Resolução cinética do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em tolueno com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 10°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1 90
- Figura 4.11:** Resolução cinética do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em hexano com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 10°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1 91

Figura 4.12: Fotomicrografias da superfície das membranas planas obtidas a partir da solução PEI/LiNO ₃ /NMP (15/3/82 m/m/m).	97
Figura 4.13: Fotomicrografias das seções transversais das membranas planas obtidas a partir da solução PEI/LiNO ₃ /NMP (15/3/82 m/m/m).	97
Figura 4.14: Fotomicrografias da (a) superfície e da (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/LiNO ₃ /NMP (15/5/85 m/m/m).	98
Figura 4.15: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/LiNO ₃ /NMP (15/3/82 m/m/m) em 10 min de exposição a atmosfera.	99
Figura 4.16: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/LiNO ₃ /NMP (15/3/82% m/m) em 20 min de exposição a atmosfera.	99
Figura 4.17: Fórmula estrutural do aditivo PVP.	100
Figura 4.18: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/ PVP-K10/NMP (15/5/80 m/m/m).	101
Figura 4.19: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/ PVP-K90/NMP (15/5/80 m/m/m).	101
Figura 4.20: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/PVP-K90/NMP (15/3/82 m/m/m) em 10 min de exposição a atmosfera.	102
Figura 4.21: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/PVP-K90/NMP (15/3/82 m/m/m) em 20 min de exposição a atmosfera.	103
Figura 4.22: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/PVP-K90/NMP (15/1,5/1,5/82 m/m/m/m) em 10 min de exposição a atmosfera.	104
Figura 4.23: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana de nylon 6,6 comercial.	105
Figura 4.24: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana polipropileno (PP) comercial.	106
Figura 4.25: Fotomicrografias do suporte accurel.	107
Figura 4.26: Cinética de adsorção da lipase Amano AK sobre o accurel a 4°C.	110

Figura 4.27: Efeito da variação do pH nos parâmetros de imobilização ((■) E; (■) R _a e (■) η) da lipase Amano AK (2,6 U) a 4°C.	111
Figura 4.28: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em accurel e a 4°C.	112
Figura 4.29: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (10-100 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,667-5,3 mg/mL), ambas em accurel e a 4°C.	113
Figura 4.30: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Amano AK), (a) concentração enzimática até 0,62 mg de proteína e (b) concentração enzimática até 5,3 mg de proteína, sobre o accurel MP 100.	114
Figura 4.31: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana de polipropileno (PP) a 4°C.	117
Figura 4.32: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sobre a membrana de PP a 4°C.	117
Figura 4.33: Esquema da rota de imobilização enzimática em membranas de PP ativadas com NH ₂ .	119
Figura 4.34: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana de PEI contendo 3% de LiNO ₃ (PN) a 4°C.	121
Figura 4.35: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana de PEI contendo 3% de PVP (PV) a 4°C.	122
Figura 4.36: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana de PEI contendo 1,5% de LiNO ₃ + 1,5% de PVP (PH) a 4°C.	122
Figura 4.37: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sobre a membrana de PEI contendo 3% de LiNO ₃ (PN) a 4°C.	125

Figura 4.38: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sobre a membrana de PEI contendo 1,5% de LiNO ₃ e 1,5% de PVP (PH) a 4°C.	125
Figura 4.39: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sobre a membrana de PEI contendo 3% de PVP (PV) a 4°C.	125
Figura 4.40: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B (CAL-B) sobre a membrana de PEI contendo 3% de LiNO ₃ (PN) a 4°C.	127
Figura 4.41: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana Nylon 6,6 (N) a 4°C.	128
Figura 4.42: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sobre a membrana de nylon 6,6 (N) a 4°C.	129
Figura 4.43: Espectro de infravermelho na faixa de 0 a 5000cm ⁻¹ para diferentes materiais utilizados como suporte para imobilização enzimática, a saber: (a) PEI+3% de LiNO ₃ , (b) PEI+1,5% de PVP+1,5% de LiNO ₃ , (c) PEI+3% de PVP, (d) Membrana de polipropileno e (e) membrana de nylon.	131
Figura 4.44: Análise termogravimétrica das membranas de PEI com diferentes aditivos.	134
Figura 4.45: Variação da concentração do (S)-IPG e (R)-IPG na fase aquosa e na fase orgânica (acetato de etila). Sendo a concentração inicial de (R,S)-IPG na fase orgânica de 4,88 mM, volume das fases igual a 140 mL e temperatura do processo igual a 23°C.	136
Figura 4.46: Variação da concentração do (S)-IPG e (R)-IPG na fase aquosa e na fase orgânica (tolueno). Sendo a concentração inicial de (R,S)-IPG na fase orgânica de 5,88 mM, volume das fases igual a 140 mL e temperatura do processo igual a 23°C.	136
Figura 4.47: Sistema de contactores de membranas utilizado na resolução racêmica do éster octanoato de (R,S)-IPG.	137

Figura 4.48: Variação da concentração do (S)-IPG e (R)-IPG nas fases aquosa e orgânica em acetato de etila a 30°C. Sendo a atividade inicial da lipase Amano AK igual a 30 U e a concentração do octanoato de (R,S)-IPG igual a 4mM. Os volumes da fase orgânica e aquosa foram 200 e 50 mL, respectivamente, e sendo que 10 % da fase orgânica foi água. 139

Figura 4.49: Resolução cinética do octanoato de (R,S)-IPG em acetato de etila a 30°C. Sendo a concentração inicial do éster 4mM e a atividade enzimática inicial da lipase Amano AK igual a 30 U. (●) ee(P) e (●) X e (●) ee(S). 140

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Exemplos de processos industriais empregando lipases.	9
Tabela 2.2: Exemplos de aplicações industriais de lipases.	12
Tabela 2.3: Comparação entre os diferentes métodos de imobilização enzimática.	29
Tabela 2.4: Atividade relativa de lipases imobilizadas sobre suportes hidrofóbicos.	36
Tabela 2.5: Imobilização de lipases via adsorção física.	37
Tabela 2.6: Grupos funcionais presentes na enzima disponíveis para ligação covalente com um dado suporte.	43
Tabela 4.1: Hidrólise dos ésteres derivados do IPG catalisado pela lipase Novozyme 435.	75
Tabela 4.2: Hidrólise dos ésteres derivados do IPG catalisado pela lipase Amano AK.	75
Tabela 4.3: Influência da concentração enzimática inicial na resolução do octanoato de (<i>R,S</i>)-1,2-O-isopropilideno (5mM) a 30°C em acetato de etila e água (1:1).	88
Tabela 4.4: Reações de hidrólise do octanoato de (<i>R,S</i>)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em 5 horas de reação variando-se a atividade inicial da lipase (0,9U e 2,7U), temperatura (10 e 30°C) e solvente (acetato de etila, tolueno e hexano).	93
Tabela 4.5: Reações de hidrólise do octanoato de (<i>R,S</i>)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em 24 horas de reação variando-se a atividade inicial da lipase (0,9U e 2,7U), temperatura (10 e 30°C) e solvente (acetato de etila, tolueno e hexano).	93
Tabela 4.6: Resolução do (<i>R,S</i>)-1,2-O-isopropilideno glicerol através de reações de hidrólise e acilação enantiosseletiva utilizando diferentes catalisadores.	94
Tabela 4.7: Áreas específicas das membranas utilizadas na imobilização da lipase Amano AK.	108
Tabela 4.8: Parâmetros da isoterma de Langmuir, em relação a atividade, obtidos pela imobilização da lipase Amano AK sobre microporos e membranas de polipropileno (PP).	118
Tabela 4.9: Parâmetros da isoterma de Langmuir, em relação a atividade, obtidos pela imobilização da lipase Amano AK sobre diferentes membranas de PEI através de ligação covalente e adsorção hidrofóbica.	121

Tabela 4.10: Parâmetros da isoterma de Langmuir, em relação a atividade, obtidos pela imobilização da lipase Amano AK sobre membrana de nylon 6,6 através de ligação covalente e adsorção hidrofóbica. 129

Tabela 4.11: Comprimento de onda (λ) relativo às bandas características de determinados grupos funcionais presentes nas moléculas da PEI, PP e nylon 6,6. 133

Lista de Siglas e Abreviaturas

Abs - Absorbância

Ads – Adsorção

AS – Área específica

Asp – Ácido aspártico

ATR - Refletância Total Atenuada

β - Coeficiente de transferência de massa individual

BASF - Badische Anilin und Soda-Fabrik

C – Carbono

C* - É a concentração da espécie em solução que está em equilíbrio com a fração adsorvida no processo de imobilização

CA - Celulose

CAL-B – Lipase *Candida antarctica* – Fração B

CG – Cromatografia Gasosa

CMC – Concentração Micelar Crítica

CSTR - Continuous Stirred-Tank Reactor

DAG – Diacilglicerol

DNA - Ácido desoxirribonucleico

E - Razão enantiomérica

EC - Enzyme Commission

E. coli - *Escherichia coli*

ee – Excesso enantiomérico

Enz - Enzima

EUA - Estados Unidos da América

FDA - Food and Drug Administration

FTIR - Espectroscopia no infravermelho

Glu – Ácido glutâmico

His - Histidina

HMFS - Human Milk Fat Substitutes

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography

Inc - Incorporation

IPG - Isopropilideno Glicerol

J – Fluxo (L/h.m²)

K - Coeficiente de transferência de massa global, m/s

k_{cat} - (Turnover number) = constante catalítica

K_A - Constante de equilíbrio da reação de adsorção (Langmuir)

K_{AA} - Constante que descreve a interação entre as moléculas de adsorvato (Langmuir multicamada)

K_D – Constante de dissociação aparente (Langmuir-Freundlich)

K_m - Constante de Michaelis-Menten

K10 – Poli(vinipirrolidona) com massa molecular igual a 10 kDa

K90 – Poli(vinipirrolidona) com massa molecular igual a 360 kDa

Log*P* – Coeficiente de partição (1-octanol/água)

Ln – Logaritmo neperiano

MAG – Monoacilglicerol

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

m_i - Coeficiente de partição

min – minuto

mM –Mili molar

MMPG - (*R,S*)- trans-4 metóxi-3 –ácido fenilglicídico

n - Índice da isoterma de Freundlich

N - Nylon

NC-IUBMB – Nomenclature Committee of international Union of Biochemistry and Molecular Biology.

NMP - N-metil-2-pirrolidona

PEI – Poli (éterimida)

PEO - Poli-óxido etileno

PFR - Plug Flow Reactor

pH - Potencial Hidrogeniônico

PH - Membrana de PEI com nitrato de lítio e PVP (1:1) como aditivo

PN - Membrana de PEI com 3% de nitrato de lítio como aditivo

pNPB – Butirato de p-nitrofenila

PP - Polipropileno

PVP – Poli (vinilpirrolidona)

PV – Membrana de PEI com 3% de PVP como aditivo

PVA - Poli(álcool vinílico)

PTFE - politetrafluoretileno

Q_{\max} - Capacidade máxima adsortiva

QTS - Membranas de quitosana

R^2 – Coeficiente de ajuste de um determinado modelo de aos dados experimentais

R_a – Retenção de atividade, %

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMP - raio médio do poro

Ser - Serina

ST – Seção transversal

TG – Termogravimetria

TGA –Analisador termogravimétrico

U - Unidade de atividade enzimática, $\mu\text{mol}/\text{min}$

V – Volume

X – Conversão, %

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivos

1.1 Contextualização

Atualmente, a preparação de compostos orgânicos de maneira enantiosseletiva a partir de intermediários quirais é um dos principais objetivos dos químicos orgânicos sintéticos (Lin *et al.*, 2001; Blaser *et al.*, 2004), e isto se deve principalmente à reconhecida importância da quiralidade nos processos biológicos (desenvolvimento de inúmeros produtos agroquímicos e farmacêuticos).

Os enantiômeros possuem propriedades físicas e químicas idênticas em um ambiente aquiral. No entanto, em ambiente quiral, suas propriedades mudam completamente, visto que a atividade biológica de substâncias quirais geralmente depende de sua estereoquímica, uma vez que um organismo vivo é um ambiente altamente quiral (Burton *et al.*, 2006).

É conhecido que alguns fármacos são produzidos e comercializados na forma de racematos, ou seja, mistura equimolar de isômeros (*R,S*), e que a atividade biológica depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente um dos isômeros apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo teratogênico.

A atividade biológica associada a cada um dos enantiômeros de uma substância utilizada para fins medicinais passou a ser encarada com mais seriedade a partir de 1960, com os casos de má-formação de fetos associados ao consumo do fármaco talidomida (Figura 1.1). A talidomida é uma droga que possui um forte poder sedativo e anti-náusea e, portanto seu uso em mulheres grávidas no início de gestação passou a ser considerado apropriado. Posteriormente foi descoberto que esta droga também possuía um forte efeito teratogênico o que levava a sérios efeitos colaterais na formação do feto. Estes efeitos foram atribuídos ao enantiômero (*S*) o qual ocasionava a teratogenia, enquanto que o enantiômero (*R*) levava ao efeito desejado.

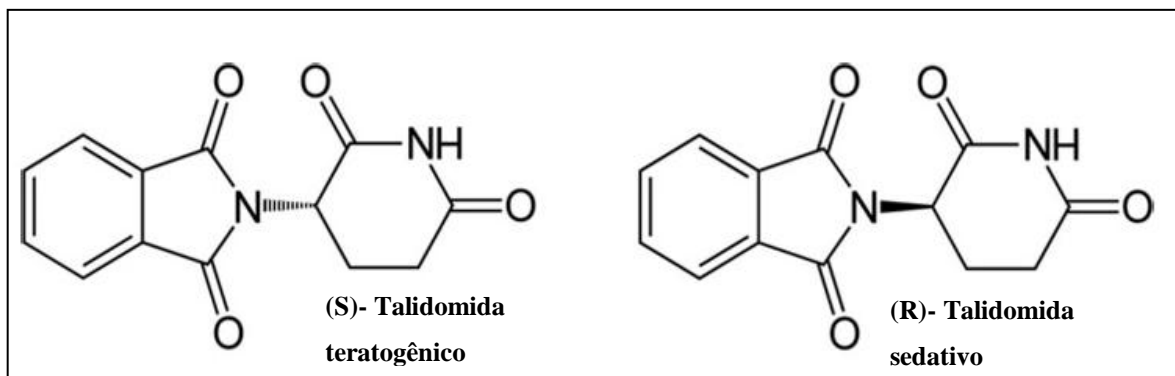


Figura 1.1: Enantiômeros da talidomida (www.wikipedia.org).

Em 1992, a FDA (*Food and Drug Administration*, órgão regulatório do EUA para comercialização de alimentos e fármacos) adotou um programa no qual as drogas racêmicas enfrentariam processos muito mais longos e complexos de aprovação para venda nos EUA do que as drogas enantiopuras.

A obtenção de moléculas enantiomericamente puras não é somente uma necessidade da indústria farmacêutica. Em muitos casos, em que substâncias bioativas são empregadas na elaboração de agroquímicos, flavorizantes ou aditivos alimentares, apenas um dos enantiômeros apresenta atividade desejada. Assim, novas metodologias para separação de misturas racêmicas vêm sendo estudadas.

Neste contexto o uso de enzimas como biocatalisadores tem possibilitado a obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, visto que estas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros da mistura racêmica. Um grupo de enzimas que vêm sendo bastante empregadas neste campo são as lipases (EC 3.1.1.3) que além de serem versáteis em reações de hidrólise e esterificação, biotransformações e resoluções ópticas, são também acessíveis, de baixo custo e estáveis em solventes orgânicos, o que as torna extremamente atrativas em processos biocatalíticos em geral. A aplicação e recuperação destas enzimas em meio aquo-restrito vêm sendo desenvolvidas conjuntamente com técnicas de imobilização das mesmas de modo a tornar possível a separação da enzima do meio reacional, seu reuso e maior estabilidade. A escolha do método de fixação quando se imobiliza uma dada enzima é extremamente importante, pois deve prevenir a perda de atividade enzimática, sem alterar a natureza química ou os grupos reativos no local de ligação da enzima (sítio ativo).

Assim, atualmente tem sido cada vez mais difundida, especialmente entre os químicos orgânicos, a utilização de processos com membrana na separação de misturas

racêmicas (contactores de membrana), já que os mesmos sistemas permitem a reação e a separação dos os produtos simultaneamente.

Neste trabalho, o bloco quiral estudado foi o (*R,S*)-IPG (Figura 1.2), também conhecido como (*R,S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol ou (*R,S*)-IPG (1,2-O-isopropilideno glicerol) foi originalmente sintetizado por Fischer em 1895 através da reação do glicerol com acetona na presença de cloreto de zinco (Fai Liu, 1999).

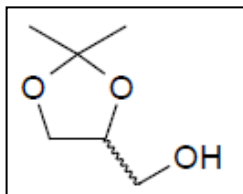


Figura 1.2: Estrutura do (*R,S*)-IPG (www.wikipedia.org).

No caso específico do (*R,S*)-IPG, nenhum dos enantiômeros causa algum tipo de efeito deletério e, apesar da forma *S* ser mais facilmente obtida em resoluções enantioméricas, a forma *R* pode ser usada como bloco quiral na síntese do ácido γ -amino β -hidroxibutírico, medicamento usado no tratamento da hipertensão. Já o *S*-IPG é bloco quiral utilizado para a síntese de diglicerídios e muitos outros compostos biologicamente ativos, tais como, fosfolipídeos, fatores de agregação plaquetária, β -adrenoceptores, dentre outros (Fai Liu, 1999). Além disso, por ser derivado do glicerol, este substrato é bastante atrativo, visto que pode ser obtido da glicerina bruta, rejeito da produção de biodiesel.

Desta forma, pensando na integração de processos (produção e separação de bioprodutos) e áreas do conhecimento (química, bioquímica e engenharia química) buscou-se neste trabalho efetuar reações enzimáticas (usando lipases como biocatalisadores) para resolução enantiomérica do (*R,S*)-IPG seguida pela separação simultânea dos produtos em contactores de membranas.

1.2 Objetivos

O objetivo global deste trabalho é propor um sistema utilizando membranas catalíticas, ou seja, contendo lipases imobilizadas, visando a resolução de uma mistura racêmica ((*R,S*)-IPG)) com separação simultânea dos produtos reacionais.

Como objetivos específicos podem ser destacados:

- Escolha do melhor éster derivado do (*R,S*)-IPG a ser empregado no sistema de resolução e separação simultânea.
- Estudos com diferentes lipases, solventes e temperaturas a fim de verificar a melhor condição reacional de resolução enantiomérica.
- Desenvolver membranas poliméricas para imobilização de diferentes enzimas.
- Imobilização da lipase de interesse em diversas membranas poliméricas, comerciais e desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBim).
- Verificar a influência de diferentes métodos de imobilização sobre a atividade enzimática.
- Efetuar resoluções enantioméricas em contactor de membranas planas de forma contínua com recuperação simultânea de produto.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Enzimas

As limitações existentes na obtenção de produtos ou intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, os quais são pouco versáteis além de exigirem altas temperaturas a fim de garantir razoável velocidade de reação. Além disso, devido a sua baixa especificidade, fornecem produtos de composição química ou mista até mesmo contaminados, gerando, desta forma, a necessidade de uma etapa posterior para purificação, o que gera um aumento nos custos do processo. Diferentemente de um catalisador químico, enzimas são biocatalisadores de natureza protéica ou glicoprotéica que, além de apresentarem seletividade (químico, regio e enantio), também atuam em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C), pH e pressão, atingindo taxas de reação bastantes elevadas (podem elevar a taxa de uma reação de 10^8 a 10^{12} vezes). Este comportamento das enzimas permite uma redução dos custos com o “downstream” do processo, já que sua elevada especificidade resulta em um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis e redução na quantidade de resíduos (De Castro *et al.*, 2004).

De acordo com NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) as enzimas são classificadas e codificadas em relação à reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C (Enzyme Commission) seguida de até 4 dígitos referentes à classe e subclasses a que pertence a enzima (Lima, 2004; Zimmermann, 2005). O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima são: i) apresentam alta estabilidade em

solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de co-fatores; iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato e, iv) exibem uma alta enantiosseletividade.

O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de enzimas em geral, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial. De acordo com a reportagem da Business Communications Company Inc. o mercado global de enzimas para interesse industrial foi estimado em US\$ 4,4 bilhões de dólares em 2015. Esta estimativa está baseada no fato de que novas aplicações utilizando enzimas estão surgindo, exigindo desta forma que a indústria responda com um fluxo contínuo de produtos inovadores. A Figura 2.1 ilustra os principais consumidores de enzimas e o valor gasto anualmente por estes setores.

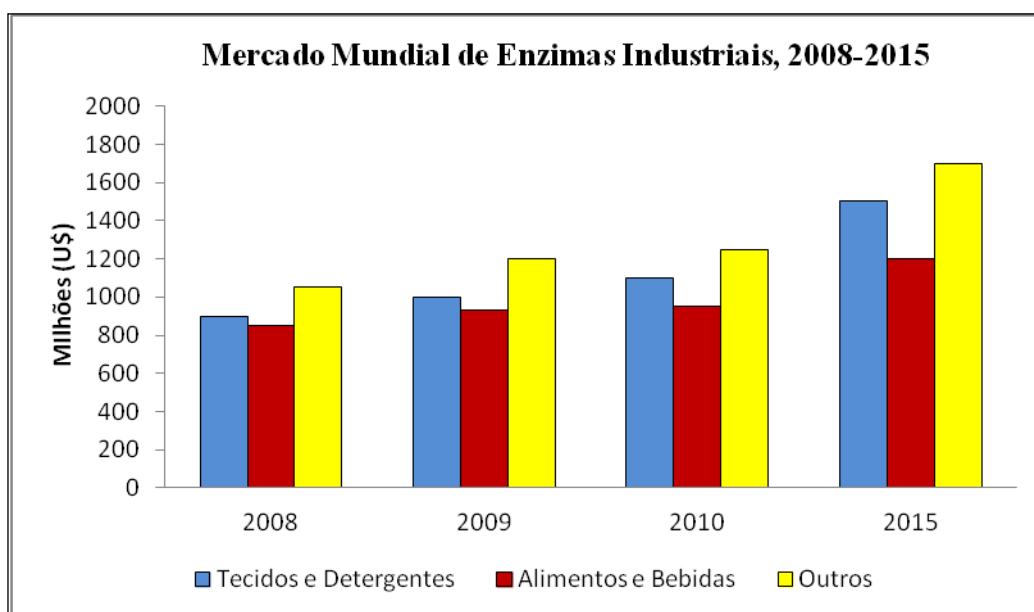


Figura 2.1: Mercado mundial de enzimas industriais no período de 2008-2015. (<http://www.bccresearch.com/report/BIO030F.html>, 2011).

2.1.1. Lipases

2.1.1.1. Características gerais

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases - E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster carboxílicas de triacilgliceróis a fim de liberar ácidos orgânicos e glicerol (Figura 2.2), podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes com baixa

concentração de água. Além dos lipídeos, seus substratos naturais, lipases constituem um grupo de enzimas bastante diversificado em relação à utilização de outros substratos não específicos, tais como, amidas, tioésteres, dentre outros (Paques e Macedo, 2006; Berglund, 2001).

As lipases são comumente encontradas na natureza e podem ser obtidas de fontes animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal (extraída da soja, do centeio e do algodão) e microbiana (bactérias e fungos) (Paques e Macedo, 2006; De Castro *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2001; Costa e Amorim, 1999). Inicialmente eram obtidas a partir do pâncreas de animais e utilizadas como auxiliar digestivo para consumo humano (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998). O elevado custo de produção, quando comparadas a outras hidrolases (proteases e carboxilases), bem como o baixo rendimento do processo fermentativo limitou por anos a utilização de lipases microbianas. Entretanto, avanços registrados em relação à tecnologia do DNA recombinante associados à facilidade de produção e abundância de microorganismos mudaram este cenário nas últimas décadas (Hasan *et al.*, 2006). Atualmente as lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, dentre outras.

Tanto por razões técnicas quanto econômicas, as enzimas microbianas têm tido sua importância cada vez mais aumentada. No caso das enzimas vegetais, há necessidade de grande quantidade de plantas para se obter uma quantidade razoável de uma determinada enzima de interesse. Muitas vezes, isto se torna inviável em virtude dos elevados valores da terra e custos operacionais. Já as enzimas animais são subprodutos das indústrias de carne, cujo suprimento é limitado, principalmente, para atendimento a uma demanda súbita, em grande escala (Jaeger *et al.*, 1994).

As enzimas microbianas, entretanto, não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento.

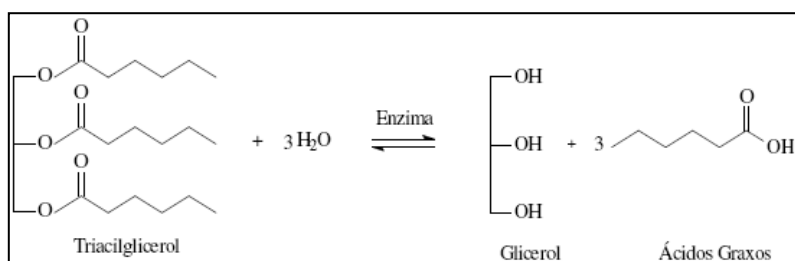


Figura 2.2: Reação de hidrólise catalisada por triacilglicerol lipases (Lima, 2004).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molar variando entre 20 a 75 KDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a 25 até 70°C.

A possibilidade de aceitarem diferentes substratos com elevada eficiência e estabilidade, além dos lipídeos, seus substratos naturais, bem como suas propriedades químico, régio ou enantiosseletivas faz com que as lipases catalisem uma série de diferentes reações (Freire e Castilho, 2008), como ilustra a Figura 2.3. Além de catalisar reações de hidrólise e esterificação, lipases podem atuar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida a serem empregados (Hasan *et al.*, 2006). Além disso, reações de aminólise (síntese de amidas) e lactonização vêm sendo também estudadas, entretanto, independente do tipo de reação catalisada, a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (Berglund, 2001; Paques e Macedo, 2006).

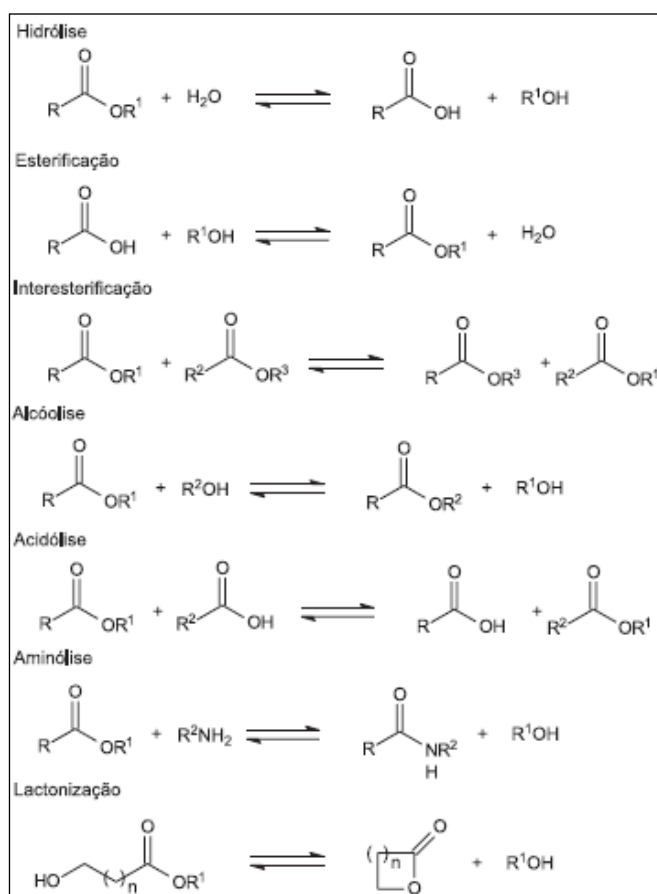


Figura 2.3: Reações catalisadas por lipases (Paques e Macedo, 2006).

Importantes indústrias do setor químico como a BASF, com sede em Ludwigshafen na Alemanha, empregam lipases, especificamente de *Candida antarctica*,

em processos de resolução de aminas e álcoois racêmicos para a síntese de intermediários de fármacos e agrotóxicos (Bornscheuer, 2002). Outros produtos, tais como substitutos da gordura do leite materno (HMFS), análogos da manteiga de cacau (CBE), compostos aromatizantes, di- (DAG) e monoacilgliceróis (MAG), ácidos graxos poliinsaturados concentrados e precursores de fármacos também são produzidos em escala industrial utilizando lipases como biocatalisador (Bickerstaff, 2009 citado em Mendes, 2009). A Tabela 2.1 apresenta outros exemplos de aplicações industriais de lipases.

Tabela 2.1: Exemplos de processos industriais empregando lipases (Vasic-Racki, 2000 citado em Freire e Castillo, 2008).

<i>Processo</i>	<i>Início da operação</i>	<i>Firma</i>
Interesterificação de gorduras	1979, 1983	Fuji Oil, Unilever
Hidrólise de ésteres	1988	Sumitomo
Transesterificação	1990	Unilever
Acilação	1996	BASF

A aplicação de lipases em meio não aquoso ou aquo-restritos, com baixa atividade de água pode ser realizada atualmente devido (i) elucidação das estruturas tridimensionais das enzimas pela engenharia de proteínas, (ii) estudo do mecanismo de reação de lipases (ativação interfacial), (iii) utilização da engenharia genética na produção de enzimas recombinantes e (iv) adoção de métodos de imobilização da enzima (De Castro *et al.*, 2004).

Esterases (E.C.3.1.1.1), assim como as lipases, representam também um diverso grupo de hidrolases que catalisam a quebra e formação de ligações éster (Bornscheuer, 2002). Entretanto, diferentemente das lipases, que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa (mais de 10 átomos de carbono), as esterases segundo Verger (1997) hidrolisam acilgliceróis com menos de 10 átomos de carbono. Porém, o interesse nestas enzimas reside no fato de que as mesmas não requerem cofatores, são relativamente estáveis e também são ativas em solventes orgânicos (Bornscheuer, 2002). Deve-se enfatizar também, que a maioria das lipases podem hidrolisar os substratos de esterases, enquanto que o inverso não é verdadeiro (Jaeger *et al.*, 2002).

Em 1958, Sarda e Desnuelle definiram lipases em relação a suas características cinéticas, embasados no fenômeno de ativação interfacial que foi observado pela primeira vez em 1936 por Holwerda e colaboradores e em 1945 por Schonheyder e Volqvartz. Segundo eles a propriedade de ativação está relacionada com a presença de uma interface água/lipídeo que é gerada na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados (Verger, 1997). Desta forma o fenômeno de ativação interfacial se caracteriza pelo aumento da atividade lipolítica quando a solubilidade do substrato é excedida, ou seja, sua concentração está próxima ou ultrapassa seu limite de solubilidade, gerando uma fase independente, e tanto a qualidade quanto a quantidade da interface tem papel importante na atividade catalítica dessas enzimas. Por este motivo, lipases não hidrolisam substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima, a concentração micelar crítica (CMC) (Verger, 1997; Costa e Amorim, 1999).

Quando as primeiras estruturas tridimensionais de algumas lipases fúngicas de *Rhizomucor miehei* e *Geotrichum candidu*, bem como a lipase pancreática humana, foram elucidadas no início da década de 90, o fenômeno de ativação interfacial passou a ser explicado em função da presença de uma cobertura ou tampa hidrofóbica que protege o sítio ativo da enzima expondo-o ao interagir com a interface orgânico-aquosa em virtude das mudanças conformacionais. Hoje, sabe-se que a presença da tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, visto que diversas lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) apresentam “tampa” em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (Verger, 1997; Paiva *et al.*, 2000; De Castro *et al.*, 2004; Cunha, 2007; Freire e Castilho, 2008).

Por outro lado, algumas enzimas provenientes das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia glumae*, além da cutinase proveniente de *Fusarium solani ssp. pisi* não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (Paiva *et al.*, 2000). Além disso, a ocorrência ou não da ativação interfacial pode ser influenciada pelas condições experimentais e pelos substratos utilizados (Ferrato *et al.*, 1997).

A fim de acabar com as diversas contradições existentes na literatura, atualmente a maioria dos autores define lipase como uma carboxilesterases capaz de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa, (Verger, 1997; Reetz, 2002; De Castro *et al.*, 2004; Lima, 2004).

A principal forma de produção de lipases tem sido através de processos fermentativos, pois estes processos apresentam maior facilidade de controle, maior capacidade produtiva e custo de obtenção reduzido. Os principais microorganismos utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, bactérias do gênero *Pseudomonas* e leveduras do gênero *Candida* (Balcão *et al.*, 1996; Pandey *et al.*, 1999; Freire e Castilho, 2008).

2.1.1.2. Aplicações de lipases

O crescente interesse no uso de lipases encontra-se principalmente em aplicações industriais de larga escala, em virtude de suas características peculiares: biocatalisadores acessíveis, ou seja, de fácil produção, baixo custo de geração, não requerimento de cofatores, operação em condições brandas de temperatura e pH, minimização de problemas de isomerização, racemização e rearranjo, estabilidade em solventes orgânicos, quimiosseletividade (habilidade da enzima gerar seletivamente um certo produto atuando no seu grupo funcional), regioseletividade (habilidade da enzima atuar seletivamente em uma determinada posição dentro da molécula) e enantioespecificidade (habilidade da enzima diferenciar enantiômeros em um racemato) (Castilho *et al.*, 2001).

Os setores industriais que mais se utilizam de lipases para geração de bens de consumo são: o de formulação de detergentes, degradação de óleos e gorduras, síntese farmacêutica, produção de cosméticos, manufatura de fermento e queijo (indústria alimentícia), manufatura de papéis, couro, tratamento de efluentes, produção de biodiesel, kits diagnósticos, biossensores para utilização em análises clínicas, de alimentos, químicas, de contaminação ou poluição de ambientes, dentre outras (Reetz, 2002; Vulfson, 1994 citado em Tincom, 2003; Hasan *et al.*, 2006; Cunha, 2007; Freire e Castilho, 2008; Pandey *et al.*, 1999). Além disso, as lipases têm sido utilizadas em terapias enzimáticas (Kurita-Water, 1994 citado em Tincom, 2003). Na Tabela 2.2 é possível verificar diferentes exemplos de aplicações industriais de lipase em função do tipo de reação catalisada.

Tabela 2.2: Exemplos de aplicações industriais de lipases (Paques e Macedo, 2006; Hasan *et al.*, 2006; Freire e Castilho, 2008).

<i>Área Industrial</i>	<i>Aplicação</i>	<i>Produto</i>
Alimentação	Hidrólise de gordura do leite	Agentes flavorizantes para produtos matinais
	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas
	Transesterificação de óleos	Manteiga de cacau
	Melhorar textura	Fabricação de pães
	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, di e monoglicerídeos
	Remoção de manchas/gordura	Detergentes
	Síntese de ésteres	Ésteres, emulsificantes
Química	Transesterificação de óleos vegetais	Biodiesel
	Pré-tratamento enzimático de efluentes oriundos de abatedouros e indústria de laticínios.	Resíduos contendo menos gorduras
Médica	Dosagem de triglicérides do sangue	Kits diagnósticos
	Resolução enantiosseletiva	(<i>R,S</i>)-ibuprofeno, (<i>R,S</i>)-naproxeno
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragrância para perfumes

O advento de novas tecnologias, como a recombinação genética, engenharia de proteínas e a evolução dirigida vêm propiciando a obtenção de enzimas com características (atividade, quimio, régio e enantiosseletividade) novas e mais específicas para determinados processos industriais, promovendo desta forma, uma expansão do mercado para as enzimas, em especial para as lipases. Mais de 30% deste mercado até 2001 era destinado ao setor de fabricação de detergentes (Sharma *et al.*, 2001). Uma aplicação que tem merecido destaque é a utilização de lipases na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, já que estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica.

No período de 2000-2010 foram publicados cerca de 2900 trabalhos, sendo que somente nos últimos dois anos, foram 920 trabalhos relatando o uso de lipases em processos químicos e industriais (<http://apps.isiknowledge.com>, 2010). Estes dados

demonstram o grande interesse e a versatilidade do uso desses catalisadores em inúmeras áreas como mencionado anteriormente.

Entre as maiores empresas produtoras destas enzimas estão a Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozymes (Dinamarca), Genencor International (EUA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão) (Hasan *et al.*, 2006).

2.1.1.3. Aspectos estruturais e mecanismo catalítico das lipases

Desde 1990, com a resolução das primeiras estruturas tridimensionais (lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana) através da técnica de cristalografia de Raios-X, o entendimento sobre os mecanismos de atuação das lipases começou a ser desvendado. Daí por diante, mais de onze estruturas de lipases já foram determinadas, das quais, com exceção da lipase pancreática, todas são de origem microbiana (Jaeger e Reetz, 1998; Kazlauskas *et al.*, 1998).

Todas as lipases cujas estruturas tridimensionais têm sido elucidadas são do tipo α/β hidrolase (Pissilão, 2006; Lima, 2004; Bornscheuer, 2002; Jaeger e Reetz, 1998; Kazlauskas *et al.*, 1998) (Figura 2.4). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas rodeado por porções em α -hélice. As fitas β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si.

O sítio catalítico das lipases é composto por uma tríade catalítica (Serina (Ser), ácido aspártico ou glutâmico (Asp/Glu) e histidina (His)) semelhante à observada primeiramente em serina-proteases. O sítio ativo está localizado no lado C-terminal das fitas. O nucleófilo catalítico (serina) está localizado especificamente no C-terminal da fita β_5 em um pentapeptídeo altamente conservado (G-X₁-S-X₂-G, onde G= glicina; S= Serina; X₁= histidina e X₂= ácido glutâmico ou aspártico), que constitui o ângulo nucleofílico (Jaeger *et al.*, 1999; Lima, 2004; Bornscheuer, 2002; Uppenberg *et al.*, 1994).

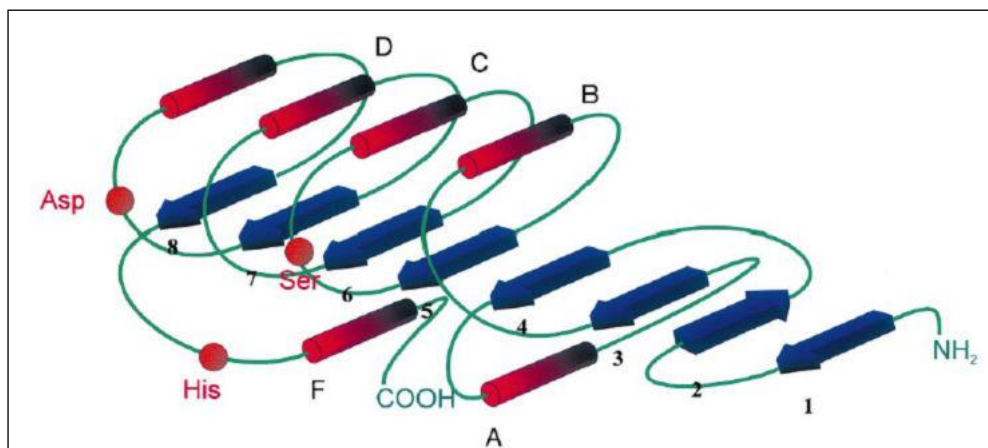


Figura 2.4: Representação esquemática do motivo estrutural conservado em enzimas da família α/β hidrolase. Filamentos em conformação β (1-8) formando uma estrutura em folha β -pregueada estão indicados pelas setas, estrutura em α -hélices (A-F) indicadas pelas colunas. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica estão indicadas pelos círculos (Bornscheuer, 2002).

Quando a enzima é submetida a meios aquosos, a exposição do sítio é termodinamicamente desfavorável, permanecendo então na conformação “fechada” ou inativa (Figura 2.5). No entanto, na presença de substratos hidrofóbicos (interfaces) observa-se uma mudança na estrutura da enzima para a conformação ativa ou “aberta”, tornando o sítio ativo da enzima totalmente acessível ao substrato, explicando assim o fenômeno de ativação interfacial (Costa e Amorim, 1999). Essa abertura consiste na reestruturação conformacional da lipase que cria uma região eletrofílica (“cavidade do oxianion”) em torno do resíduo serina: a tampa helicoidal vira-se para trás encobrendo seu lado hidrofílico em uma cavidade polar, antes preenchida por moléculas de água, e expondo totalmente o lado hidrofóbico da tampa. Essa exposição faz com que a superfície apolar em torno do sítio catalítico seja expandida. A cavidade do oxianion é responsável pela estabilização de cargas negativas geradas durante o ataque nucleofílico na ligação carbonila do substrato, portanto estabiliza o estado de transição durante a catálise. (Balcão *et al*, 1996; Paiva *et al.*, 2000).

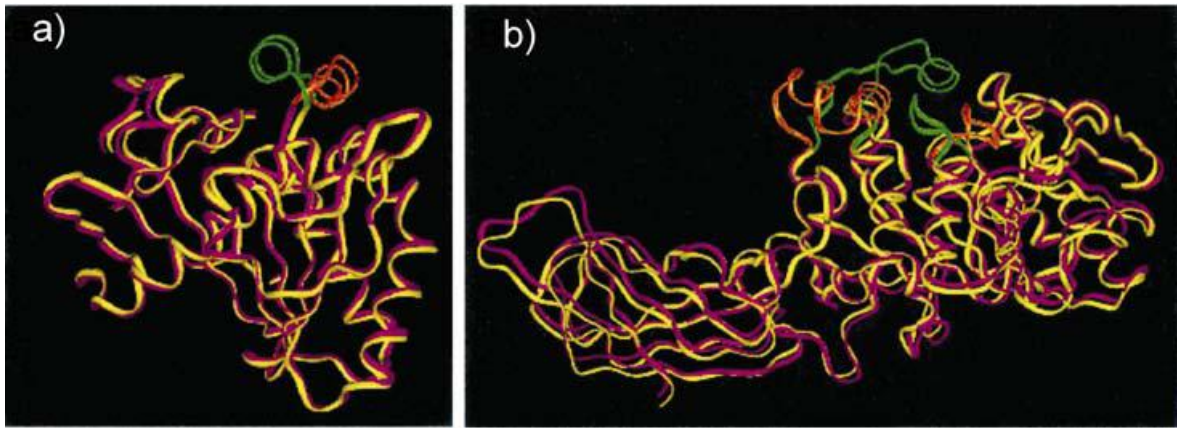


Figura 2.5: Superposição dos esqueletos das lipases de *Rhizomucor miehei* (a) e de pâncreas humano (b), mostrando a mudança conformacional da tampa na ativação interfacial. As tampas estão destacadas em verde (fechado) e laranja (aberto). Modificado de Petersen *et al.*(2001), citado em Almeida (2005).

Independente do tipo de reação catalisada (hidrólise, esterificação ou interesterificação) o mecanismo mais descrito e aceito para descrever a ação catalítica das lipases é o Ping-Pong Bi Bi (Figura 2.6). Este mecanismo consiste em duas etapas majoritárias (Paiva *et al.*, 2000; Jaeger *et al.*, 1999):

1. Ataque nucleofílico sobre a ligação éster do substrato pelo átomo de oxigênio do grupamento hidroxila do resíduo serina do sítio catalítico, após a abertura da tampa, resultando na formação de um complexo denominado enzima acilada e liberação de uma porção álcool do substrato original.
2. Hidrólise do complexo enzimático acilado, resultando na regeneração da enzima.

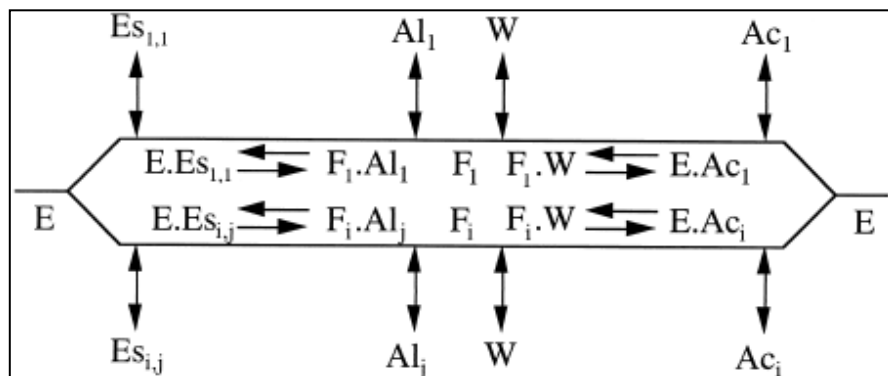


Figura 2.6: Mecanismo cinético (Ping-Pong Bi Bi) de lipase catalisando reações envolvendo múltiplos substratos e produtos usando a notação de Cleland's (E: enzima; Es: éster; Al: álcool; Ac: ácido, W: água, F: acil enzima, $i = 1, 2, 3, \dots, I$; $j = 1, 2, 3, \dots, J$) (Paiva *et al.*, 2000).

A Figura 2.7 representa o mecanismo de ação catalítica e os estados transientes formados durante a hidrólise de um éster (etanoato de metila) catalisada por lipases e esterases (Simas *et al.*, 2011).

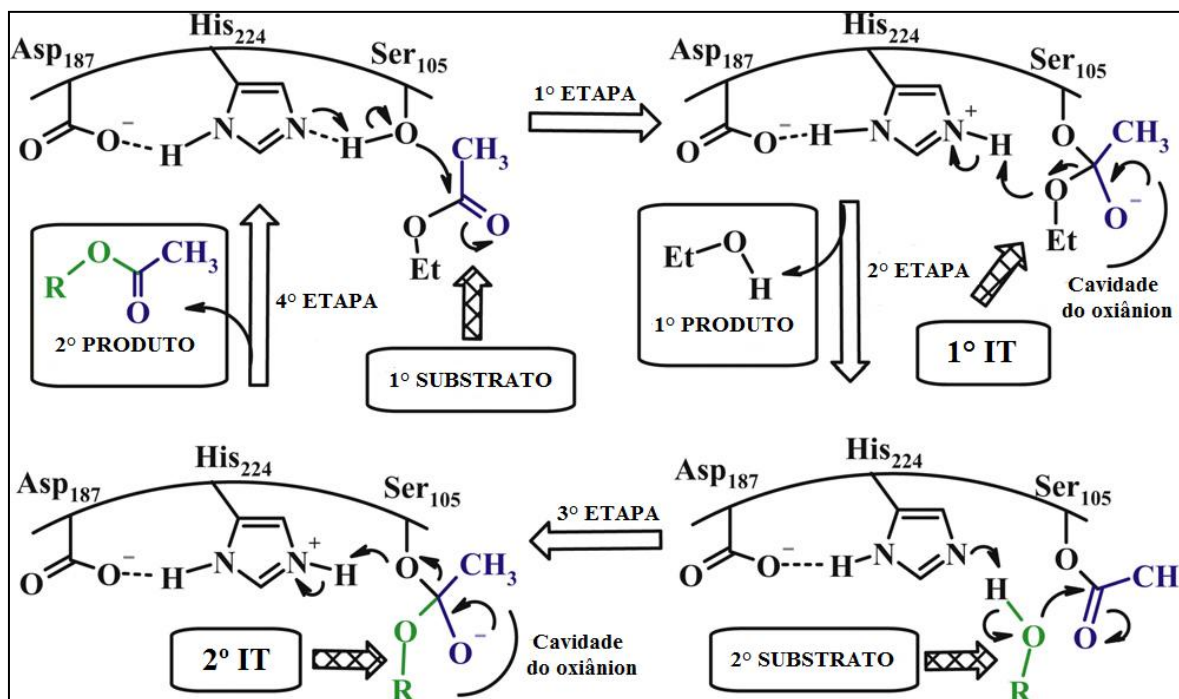


Figura 2.7: Mecanismo geral das reações catalisadas por lipases, considerando também a reação de transesterificação (Triáde catalítica numerada como na lipase Cal-B, Ser105–His224–Asp187; Primeiro substrato = EtOAc, segundo substrato = ROH, IT = Intermediário tetraédrico) (Simas *et al.*, 2011).

De acordo com a Figura 2.7 o processo de hidrólise de um éster catalisada por uma lipase ocorre em 4 etapas, descritas a seguir:

Primeira etapa: Inicialmente a histidina da tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina presente no sítio catalítico. Ocorre, então, o ataque nucleofílico ao átomo de carbono suscetível da ligação éster do substrato, abrindo a ligação C=O e dando origem ao intermediário tetraédrico. O anel imidazólico da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido.

Segunda etapa: O intermediário tetraédrico formado é estabilizado por ligações de hidrogênio com os grupamentos amidas dos resíduos pertencentes à chamada “cavidade do oxiânion”. O intermediário tetraédrico é desfeito, pelo retorno da ligação C=O e conseqüente clivagem da ligação éster e liberação da porção álcool, cujo

oxigênio recebe um próton proveniente da histidina, que age como ácido gerando-se assim o intermediário denominado enzima acilada.

Terceira etapa: Formação do intermediário covalente enzima acilada, onde o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo serina da enzima. A molécula de água que se aproxima e é ativada pelo resíduo histidina vizinho, e o íon hidroxila resultante promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente. Uma molécula de água, que tem seu caráter nucleofílico acentuado pela ação básica da histidina protonada, ataca o carbono suscetível do intermediário acil enzima, abrindo a ligação C=O, gerando um segundo intermediário tetraédrico.

Quarta etapa: Retorno da ligação C=O desfaz-se o segundo intermediário tetraédrico com a liberação do ácido carboxílico e da enzima livre.

Quando a água está presente em excesso, e, portanto, permanece constante no meio reacional, a expressão genérica que descreve a taxa de hidrólise para o mecanismo Ping-Pong Bi Bi é muito semelhante à expressão da taxa de Michaelis-Menten (Equação 2.1) (Paiva *et al.*, 2000).

$$r = \frac{v_{\max,aparente}[Es]}{K_{m,aparente} + [Es]}$$

Eq. 2.1

onde: $v_{\max,aparente}$ definida como $v_{\max,f}[W]/(K_{m,W} + [W])$ denota a taxa máxima aparente da reação no sentido direto (hidrólise) e $K_{m,aparente}$ definido como $K_{m,Es}[W]/(K_{m,W} + [W])$ denota uma constante de Michaelis-Menten aparente. $[Es]$ é a concentração do éster e $[W]$ é a concentração de água.

2.1.1.3.1. Resolução de misturas racêmicas

Isômeros são compostos que possuem os mesmos constituintes atômicos (fórmula molecular), porém suas disposições na molécula são diferentes, conferindo conseqüentemente características químicas diversas. Já estereoisômeros são aqueles isômeros cujos átomos ou grupos de átomos possuem uma distribuição espacial diferente na molécula. Eles podem ser divididos em geométricos ou ópticos. Os isômeros geométricos são estereoisômeros que não apresentam atividade óptica e sua terminologia está centrada em cis (do mesmo lado) e trans (lados opostos) para

descrever sua disposição espacial. Já os isômeros ópticos são aqueles que apresentam atividade óptica, possuindo centros quirais ou centros assimétricos (Nasipuri, 1991).

A quiralidade representa uma propriedade intrínseca dos chamados “blocos estruturais da vida”, tais como aminoácidos e açúcares e, conseqüentemente, dos peptídeos, proteínas e polissacarídeos (Júnior *et al.*, 2006). O conceito básico de resolução quiral teve início em 1809, com o cristalógrafo Hauy (White e Subramanian, 1994 citado em Lourenço *et al.*, 2010), entretanto foi Pasteur, em 1848, que efetivamente descobriu a diferença de atividade entre dois enantiômeros, ao publicar que a enzima de *Penicillium glaucum* consumia mais rapidamente o enantiômero (*R*)-tartarato de amônio do que o (*S*)-tartarato de amônio. O fenômeno foi observado verificando-se que as imagens não sobreponíveis desviavam a luz plano polarizada em direções opostas (Berthod *et al.*, 2006 citado em Lourenço *et al.*, 2010).

É importante enfatizar que o fenômeno da quiralidade está associado à impossibilidade de realização de determinadas operações de simetria, gerando desta forma a lógica de que todas as substâncias assimétricas são quirais, entretanto a recíproca não é verdadeira (Nasipuri, 1991).

Quando, em uma amostra, os enantiômeros estão em quantidades iguais, chamamos de mistura racêmica ou racemato, no entanto quando estes compostos estão em quantidades desiguais, dizemos que a amostra é enantiomericamente enriquecida.

Durante décadas a questão da quiralidade, e conseqüentemente da pureza ótica de compostos biologicamente ativos comercializados como fármacos foi negligenciada pela comunidade científica. Como um exemplo clássico e trágico da importância da quiralidade na indústria farmacêutica podemos citar o caso da talidomida. Na década de 60 a talidomida foi comercializada na sua forma racêmica como um sedativo, para aliviar náuseas matinais em gestantes. Entretanto, posteriormente o fármaco foi retirado do mercado por causar sérios efeitos colaterais levando a deformações congênitas em fetos, quando administrado em gestantes (Burton *et al.*, 2006; Júnior *et al.*, 2006; Cunha, 2007). O enantiômero *R* da talidomida possui as propriedades sedativas anunciadas, enquanto que o seu antípoda ótico é teratogênico. Entretanto, hoje se sabe que o enantiômero *R in vivo* causa teratogênias também, visto que ocorre racemização, formando o enantiômero *S* (Burton *et al.*, 2006).

O caso da talidomida foi um marco para a indústria farmacêutica, acarretando mudanças profundas na legislação e no controle de fármacos e medicamentos. Em 1992,

a FDA (*Food and Drug Administration*) adotou um programa no qual as drogas racêmicas enfrentariam processos muito mais longos e complexos de aprovação para venda nos EUA do que as drogas quirais. A partir desse ano a grande maioria das indústrias farmacêuticas tem procurado metodologias eficientes para produção de compostos opticamente puros. O uso de mistura racêmica para novos medicamentos só é permitido se todos os ensaios clínicos forem realizados com cada enantiômero isoladamente e comparados com aqueles presentes na mistura racêmica. Devido a sua enantioselectividade, lipases têm sido empregadas em vários processos deste tipo por meio de hidrólise em meio aquoso ou de síntese em meio orgânico (Margolin, 1996; Tsai e Huang 1999).

Alguns modelos podem ser utilizados para descrever o mecanismo de enantioselectividade em uma reação enzimática, sendo possível prever a enantiopreferência pelo substrato, entretanto, o mais simples dos modelos não consegue prever o grau de enantioselectividade (Ghanem *et al.*, 2004; Cunha, 2007). Em 1964 Prelog (Faber, 1997) observou que a estereoselectividade da biorredução de cetonas dependia do tamanho dos grupamentos ligados a carbonila. Denominado como um modelo simples, a regra de Prelog's, prediz que a enantioselectividade de redução de cetonas por álcool desidrogenases de leveduras baseia-se no tamanho dos dois substituintes no grupamento carbonila.

Em 1991, Kazlauskas e colaboradores desenvolveram uma regra empírica para a resolução de álcoois secundários quirais. Esta regra prevê qual enantiômero constituinte de um racemato reagirá mais rapidamente com uma lipase ou uma esterase. Esta proposta está baseada fundamentalmente no efeito estereo de cada grupo substituinte do álcool em questão e em estruturas de raios-X de enzimas.

Através da análise de estruturas das enzimas, foi admitida a presença de duas porções hidrofóbicas, uma de tamanho grande e outra média e estas seriam as porções responsáveis pela “acomodação” dos grupamentos substituintes de um álcool secundário durante uma reação enzimática. Naturalmente, um grupo de tamanho médio se acomodará na porção hidrofóbica média e um grupo de tamanho grande se acomodará na porção hidrofóbica grande (Figura 2.8) (Kazlauskas, 1991; Ghanem *et al.*, 2004).

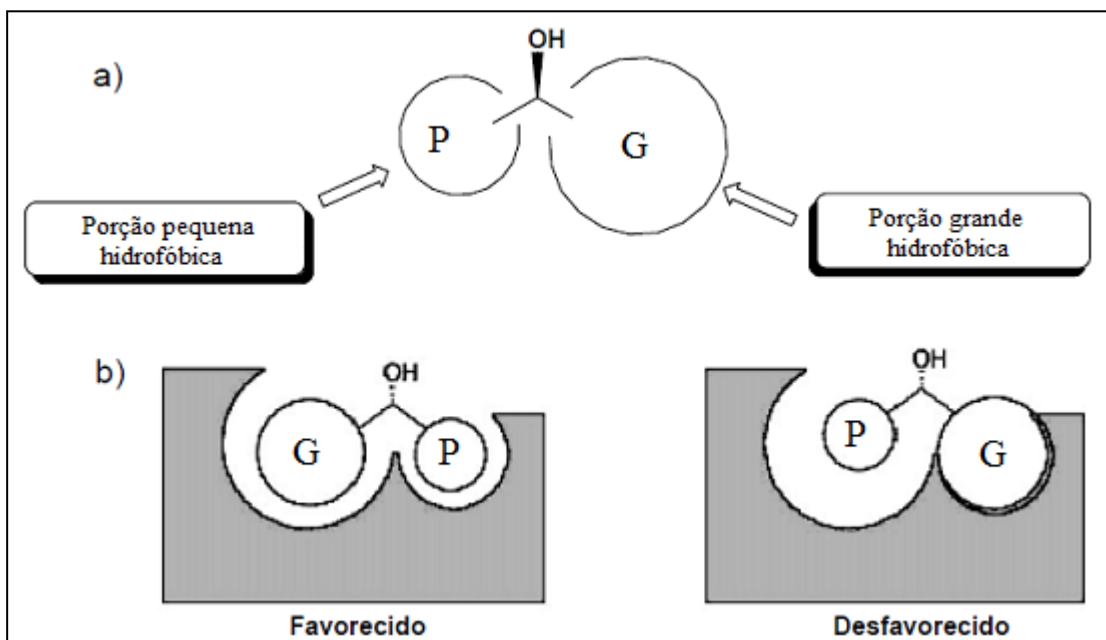


Figura 2.8: a) Representação das duas porções hidrofóbicas da enzima.

b) Esquematização do encaixe álcool/enzima (Kazlauskas *et al.*, 1991).

É importante enfatizar que este postulado não possui vínculo com a configuração *R* ou *S*, mas sim estritamente com o tamanho dos grupos. Adicionalmente, apesar de lipases catalisarem reações de hidrólise enantiosseletiva de álcoois primários, lactonas e ácidos carboxílicos, esta regra só vale para álcoois secundários e algumas aminas primárias. Na Figura 2.9 está representada a simetria em processos reacionais enzimáticos distintos seguindo a regra de Kazlauskas.

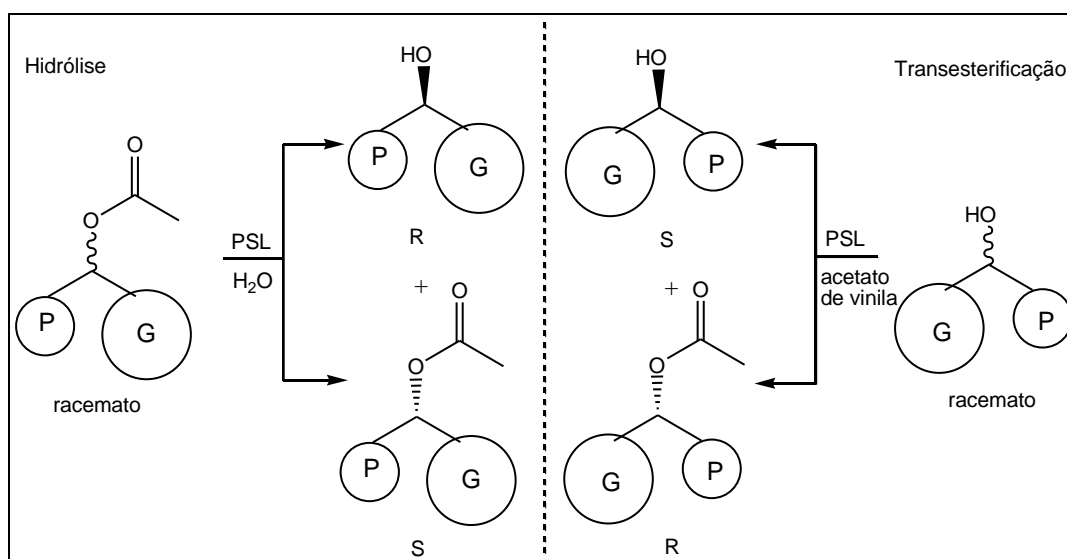


Figura 2.9: Simetria de hidrólise enzimática e reação de transesterificação de acordo com Kazlauskas. Onde PSL: Lipase proveniente de *Pseudomonas cepacia*. Reproduzido de Gotor *et al.* (2006).

Um substrato racêmico quando é submetido a uma reação enzimática sofre discriminação entre os enantiômeros. Devido à quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sítio ativo é convertido em uma velocidade mais alta. Para assegurar uma alta seletividade para um dos enantiômeros a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais a velocidade é tão extrema, que o “bom” enantiômero é transformado rapidamente e o outro não é convertido. Então a reação enzimática cessa automaticamente em 50% de conversão, quando já não existe mais o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de rendimento em uma resolução enzimática (Lozano *et al.*, 2006). De modo a aumentar o rendimento teórico máximo obtido a partir desta técnica de resolução foi desenvolvida a metodologia de Resolução Cinética Dinâmica. Esta técnica assemelha-se a resolução cinética convencional, como mencionada anteriormente, entretanto, durante o processo, ocorre a racemização *in situ* do reagente como demonstra a Figura 2.10.

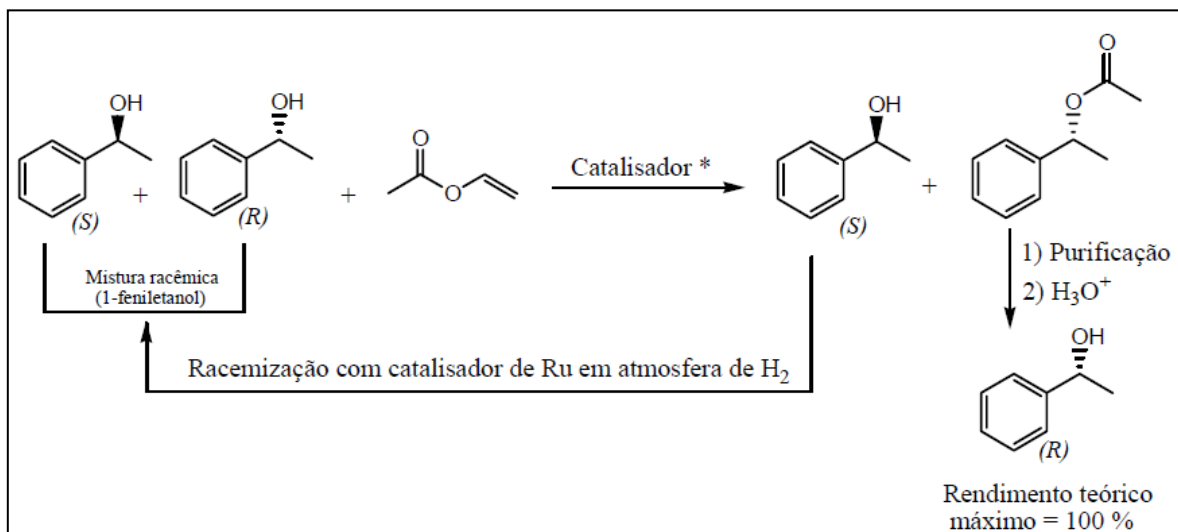


Figura 2.10: Exemplo de Resolução Cinética Dinâmica de álcoois (Martin-Matute *et al.*, 2005).

Analisando a Figura 2.10 observa-se que, através da racemização *in situ* do álcool ((S)-1-feniletanol), que não reage na presença do catalisador quiral. Já se utilizando um catalisador de rutênio é possível obter um rendimento teórico máximo de 100%. Pode-se destacar que um fator fundamental para a eficiência desse método, para esse exemplo, é que a velocidade de racemização do álcool deve ser superior à velocidade de reação de transesterificação. A escolha da técnica de resolução de racematos a ser utilizada para separar uma determinada mistura racêmica dependerá de fatores tais

como propriedades físicas e químicas das moléculas e, até mesmo, o custo e a viabilidade do processo.

2.1.1.3.1.1. Cinética de enantioespecificidade

As propriedades enantioespecíficas das enzimas isoladas podem, muitas vezes com vantagem, ser utilizadas em processos de resolução de racematos. O enantiômero para qual a enzima é mais específica é transformado mais rapidamente, enriquecendo desta forma o meio reacional com o substrato para o qual a enzima é menos específica (Pinto *et al.*, 1999). Normalmente, quando uma mistura de dois enantiômeros (um racemato, por exemplo) é submetida a um ensaio cinético, a enzima atua simultaneamente sobre os dois enantiômeros, que constituem “substratos alternativos”. A relação entre as duas eficiências catalíticas é conhecida como razão enantiomérica (E), um parâmetro cinético intrínseco de cada enzima que descreve a especificidade da enzima para os substratos alternativos, ou seja, quantas vezes um enantiômero é melhor substrato que o outro para a enzima utilizada (Pinto *et al.*, 1999, Straathof e Jongejam, 1997; Costa e Amorim, 1999; Ghanem *et al.*, 2004).

$$E = \frac{(k_{cat} / K_m)_s}{(k_{cat} / K_m)_{s'}} \quad \text{Eq.2.2}$$

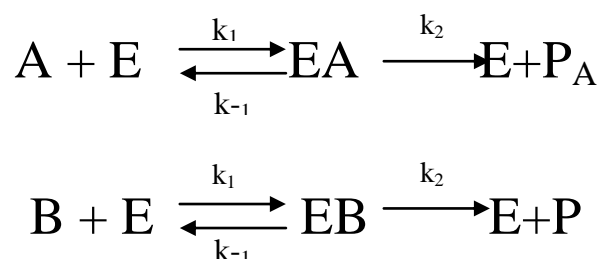
Onde: k_{cat}/K_m representa a constante de especificidade e relaciona a eficiência catalítica da enzima com sua afinidade pelo substrato, ou seja, trata-se da velocidade aparente de segunda ordem para reação entre uma enzima e um substrato; k_{cat} (*turnover number*) é a constante catalítica, representa o número de moléculas de substrato convertidos em produto por segundo por molécula de enzima sob condições de saturação; K_m é a constante de Michaelis e; E é a razão enantiomérica.

Um valor elevado de E para um dado par enzima-substrato é essencial para o sucesso de uma resolução cinética, já que isto assegura não apenas um excesso enantiomérico (ee) elevado, mas também um rendimento proporcionalmente alto. Para propósitos práticos, um valor de E abaixo de 10 para qualquer processo biocatalítico torna-o inviável de ser realizado como um processo enantiosseletivo. Por outro lado, este pode ser considerado bom se estiver situado entre aproximadamente 10 e 30 e, acima disto, excelente. Valores de $E > 200$ normalmente podem estar relacionados a

incertezas intrínsecas derivadas dos métodos analíticos de determinação do excesso enantiomérico (por exemplo, RMN, HPLC ou CG), já que para valores de E acima deste patamar, uma pequena variação no excesso enantiomérico do produto ou substrato provoca um significativo aumento no valor numérico de E (Costa e Amorim, 1999; Faber, 1997).

Chen e col. (1982) analisaram o modelo Michaeliano sem reação reversa e foram os primeiros a encontrar relações úteis entre razão enantiomérica, excesso enantiomérico (ee) e conversão (X), no estudo de resoluções de racematos.

Suponha que A e B sejam o par enantiomérico, o rápido e o lento, respectivamente, que competem pelo sítio ativo da enzima. Com base no modelo mecanístico, considerando $A_0 = B_0$ (mistura racêmica, ou seja, 50% de cada enantiômero), além de reações irreversíveis sem inibição por produto, as equações de velocidade podem ser escritas como:



Levando-se em consideração o modelo acima é possível deduzir a equação 2.3, a qual representa a razão enantiomérica em um processo de resolução enantiosseletiva de um dado racemato, onde os produtos gerados não interferem na velocidade da reação. Neste caso, a razão enantiomérica é função apenas de dois parâmetros, logo, ao se definir dois deles, o terceiro fica determinado (Chen *et al.*, 1982; Straathof e Jongejam, 1997).

$$E = \frac{\ln[(1-c).(1-ee(S))]}{\ln[(1-c).(1+ee(S))]} \quad \text{Eq. 2.3}$$

Equação similar (2.4) baseada no excesso enantiomérico em relação aos produtos também pode ser escrita, de forma que:

$$E = \frac{\ln[1-c.(1+ee(P))]}{\ln[1-c.(1-ee(P))]} \quad \text{Eq. 2.4}$$

Os excessos enantioméricos, mencionados nas equações acima, equivalem a diferença das frações molares dos enantiômeros da mistura tanto em relação aos substratos quanto aos produtos, logo, podem ser determinados diretamente na mistura através de um polarímetro, onde se determina o desvio ótico do par enantiomérico. Além disso, o uso de CG também é bastante simples, já que a área de cada pico pode ser relacionada com uma determinada concentração na amostra analisada, permitindo a determinação dos excessos enantioméricos (Equações 2.5 e 2.6).

$$ee(S) = \frac{(B - A)}{(A + B)} \quad \text{Eq. 2.5}$$

$$ee(P) = \frac{(P_A - P_B)}{(P_A + P_B)} \quad \text{Eq. 2.6}$$

Já o valor da conversão pode ser determinado pela equação 2.7:

$$c = \frac{(A_0 - A) + (B_0 - B)}{A_0 + B_0} = 1 - \frac{(A + B)}{(A_0 + B_0)} \quad \text{Eq. 2.7}$$

Outras equações, bem mais complexas podem ser utilizadas a fim de se determinar E. A equação 2.8 representa outra forma de se obter este parâmetro levando-se em consideração tanto o excesso do substrato quanto do produto (Straathof e Jongejam, 1997).

$$E = \frac{\ln((1 - ee(S))/(1 + ee(S)/ee(P)))}{\ln((1 + ee(S))/(1 + ee(S)/ee(P)))} \quad \text{Eq. 2.8}$$

2.2. Imobilização de enzimas

2.2.1. Aspectos gerais

A crescente utilização de enzimas em processos industriais ocasionou nos últimos anos um aumento no consumo destas proteínas. Entretanto, nem sempre foi assim, pois a estabilidade das enzimas era muito baixa, apresentavam um elevado custo e, além

disso, quando incorporadas a um determinado processo industrial geravam um encarecimento da etapa de separação e concentração (*downstream*), visto que eram utilizadas na forma liofilizada, normalmente. Desta forma, no início dos anos 50 foram produzidas preparações enzimáticas imobilizadas por inclusão em matrizes poliméricas e por ligação em suportes (Tischer e Kasche, 1999).

A utilização de enzimas imobilizadas facilitou o desenvolvimento de processos em escala comercial, visto que são inúmeras as vantagens destas em relação ao uso de preparações contendo enzimas livres. Dentre as principais vantagens apontadas por diversos autores (Freire, 1988; Illanes, 1994; Freire *et al.*, 1990; Benjanmin e Pandey, 1998; Villeneuve *et al.*, 2000; Guisan *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2007) estão:

Facilidade de separação dos produtos. Quando elevado grau de pureza é exigido em um determinado processo, recomenda-se o uso de enzimas imobilizadas, pois como mencionado anteriormente, os processos unitários de separação são bastante simples.

Facilidade de recuperação do biocatalisador. A utilização de biocatalisadores imobilizados facilita as etapas de purificação (*downstream*) em um processo, já que as técnicas empregadas na separação do biocatalisador passam a ser operações unitárias simples como filtração ou centrifugação dispensando, portanto a realização de procedimentos de inativação enzimática como desnaturação térmica ou por pH, que podem levar a alterações indesejáveis do produto final. Já em alguns casos, onde os biocatalisadores apresentam custo elevado, a imobilização pode tornar o processo economicamente viável, visto que, o mesmo podem ser reutilizados diversas vezes.

Processo pode ser operado continuamente. Além de reduzir o volume reacional, já que a enzima pode ser utilizada em maior concentração, e facilitar o controle do processo, a utilização de biocatalisadores imobilizados também possibilita a implementação de processos operando de forma contínua através de reatores tubulares (PFR) ou tanques de agitação (CSTR).

Previne a formação de agregados em meio orgânico. As enzimas livres, quando suspensas em um solvente orgânico, tendem a se agregar e aderir às paredes do reator, principalmente, se a água for adicionada a esse sistema. A imobilização de enzimas sobre suportes sólidos pode contornar esse problema.

Manutenção de micro-ambiente com elevada atividade de água. A imobilização permite a manutenção de uma camada de solvatação no micro-ambiente em torno da enzima capaz de manter uma dinâmica molecular mínima, essencial à atividade enzimática em ambientes orgânicos.

Estabilização da enzima. A imobilização da enzima sobre diferentes suportes pode aumentar a rigidez da estrutura molecular minimizando a ocorrência de desnaturação por temperatura, pH ou solvente. Além disso, a reação pode ser interrompida a qualquer momento, ou seja, quando se atinge um determinado grau de conversão.

Propriedades enzimáticas podem ser alteradas favoravelmente. A interação entre a enzima e o suporte pode ocasionar mudanças conformacionais na enzima provocando alterações desejadas nas propriedades catalíticas, como por exemplo, o aumento da atividade e estereoespecificidade da enzima.

Custos com manejo de materiais são minimizados. O aumento da estabilidade da enzima imobilizada facilita a sua estocagem e diminui as exigências para sua manipulação.

Com o advento da técnica de imobilização, vários processos, antes inviáveis, foram reavaliados. Segundo Kourkoutas e col. (2004), as técnicas de imobilização podem ser divididas em diferentes categorias baseadas no mecanismo empregado (Figura 2.11): (a) fixação ou adsorção em superfícies sólidas, (b) oclusão em matrizes porosas, (c) floculação natural ou ligação cruzada através de agentes artificiais, e (d) contenção através de barreiras, como, por exemplo, membranas.

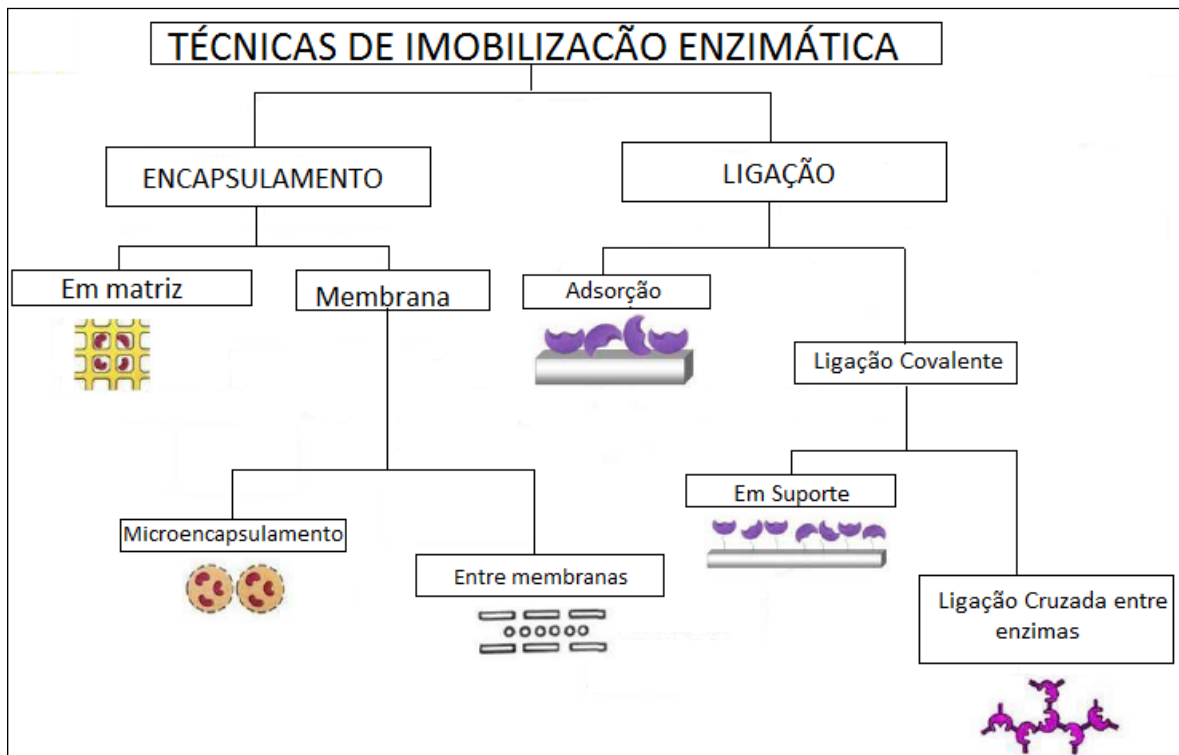


Figura 2.11: Diferentes técnicas de imobilização (Kourkoutas *et al.*, 2004).

✓ Fixação ou adsorção em superfícies sólidas

Consiste na fixação do biocatalisador a um suporte insolúvel em água através de adsorção física (interações hidrofóbicas), forças eletrostáticas ou por ligações covalentes. A seleção do suporte depende da natureza própria da enzima, assim como de:

- Tamanho da partícula
- Área superficial
- Razão molar entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos
- Composição química

Os materiais utilizados como suporte podem ser orgânicos ou inorgânicos sendo os mais comuns a sílica, alumina, carvão ativado, diversos polissacarídeos, além dos polímeros naturais, como o agar, e sintéticos, como o poli-óxido etileno (PEO).

✓ Oclusão em matrizes porosas

Esta técnica baseia-se fundamentalmente na retenção de enzimas no interior de uma matriz polimérica de modo a impedir a sua liberação para o meio, permitindo apenas a difusão de substratos e produtos. Neste processo não há nenhum tipo de reação envolvida, pois a enzima ou célula é somente retida fisicamente, não sofrendo qualquer

tipo de modificação estrutural, pois está protegida por polímeros de elevada massa molar.

✓ **Floculação natural ou ligação cruzada através de agentes artificiais**

A floculação natural ou agregação é definida por muitos autores como um aglomerado de células ou proteínas (enzimas) que se juntam para a formação de unidades maiores. Nesta técnica não há adição de qualquer agente externo, e os agregados são gerados através de adesão natural. Esta técnica é muito utilizada em reatores do tipo leito fluidizado, leito empacotado e CSTR.

Na floculação artificial, ou reticulação cruzada (cross-linking), as enzimas formam agregados através de reações com agentes bifuncionais, sendo o glutaraldeído o mais comum. Os dois grupos aldeídicos do glutaraldeído formam base de Schiff com os resíduos de aminoácidos livres da enzima, formando uma rede de ligação cruzada .

✓ **Contenção através de barreiras**

A contenção de enzimas através de barreiras pode ser alcançada utilizando-se filtros de membranas microporosas, por confinamento em microcápsulas ou através de sistemas bifásicos, onde se gera uma interface para atuação enzimática. A tecnologia de reatores com membranas vem sendo amplamente utilizado em processos contínuos para separação de misturas racêmicas.

Inicialmente reatores de membrana foram utilizados em reações de hidrólise de óleos, visto que a glicerina gerada é obtida na fase hidrofílica e os ácidos graxos na fase hidrofóbica. Hoq e col. (1985) estudaram a hidrólise enzimática do óleo de oliva em um reator de membranas hidrofóbicas contendo lipases imobilizadas via adsorção hidrofóbica. A enzima foi adsorvida na superfície da membrana em contato com a fase aquosa enquanto que o óleo foi continuamente recirculado pelo outro lado. Neste caso, além de servir como um suporte de imobilização a utilização do sistema proposto evitou a formação de emulsão.

Merçon e col. (2000) hidrolizaram óleo de babaçu em um reator de membranas planas contendo a lipase imobilizada por adsorção física.

Hilal e col. (2006) utilizaram reator de membrana contendo lipases imobilizadas, tanto por adsorção física quanto através de ligação covalente, na esterificação do ácido oléico com n-butanol.

Wang e col. (2007) utilizaram um reator de membranas compostas de acetato de celulose e politetrafluoretileno, contendo enzimas imobilizadas na separação do ibuprofeno através de uma reação de hidrólise.

Balcão e Malcata (1998) relataram mudanças ocorridas na composição em ácidos graxos da manteiga submetida à acidólise com ácido oléico através da utilização da lipase comercial *Mucor javanicus*, imobilizada por adsorção física em membrana fibra oca hidrofóbica, a 40 °C e sob condições reacionais com atividade de água controlada. O principal objetivo dessa pesquisa foi aumentar o nível de ácidos graxos insaturados da manteiga e reduzir, concomitantemente, o nível de ácidos graxos saturados de cadeia média e longa (láurico e mirístico). Com a hidrólise, observou-se na manteiga modificada um aumento de 30% m/m de ácido oléico e redução de 8 e 2% para os ácidos graxos láurico e mirístico, tendo em vista a composição original da manteiga.

Na Tabela 2.3 modificada de Kennedy e Cabral (1987) é possível verificar as comparações entre os diferentes métodos de imobilização enzimática.

Tabela 2.3: Comparação entre os diferentes métodos de imobilização enzimática (Kennedy e Cabral, 1987).

<i>Características</i>	<i>Adsorção</i>	<i>Ligação covalente</i>	<i>Ligação iônica</i>	<i>Ligação cruzada</i>	<i>Oclusão</i>	<i>Membranas</i>
Preparação	Simple	Difícil	Simple	Intermediária	Difícil	Simple
Custo	Baixo	Elevado	Baixo	Intermediário	Moderado	Elevado
Força de ligação	Variável	Forte	Intermediária	Forte	Fraca	Forte
Aplicabilidade	Vasta	Seletiva	Vasta	Pouca	Vasta	Vasta
Estabilidade da enzima imobilizada	Baixa	Alta	Intermediária	Alta	Alta	Alta
Barreiras difusionais	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim

O processo de imobilização normalmente ocasiona modificações nas propriedades físico-químicas da enzima com conseqüente alteração na estabilidade e nas propriedades

cinéticas. Os principais aspectos a respeito desses efeitos são discutidos abaixo (Freire,1988):

Efeitos conformacionais. São efeitos associados às modificações conformacionais da proteína em virtude das interações entre a enzima e o suporte, tal como, o enrijecimento da estrutura protéica durante o processo de imobilização covalente.

Efeitos esteroquímicos. Hidrofobicidade, constante dielétrica e a presença de cargas fixas no suporte são características que podem interferir diretamente no desempenho do biocatalisador, gerando efeitos de exclusão, ou seja, certas regiões da enzima tornam-se pouco acessíveis para o substrato. A utilização de espaçadores entre o suporte original e a enzima é uma excelente alternativa para minimizar o problema, já que, mantém os sítios ativos da enzima mais distantes dos efeitos de exclusão do suporte.

Efeitos de partição. São efeitos ocasionados pela diferença de distribuição das espécies entre o micro-ambiente e seio da fase. Esses efeitos resultam de interações hidrofóbicas, hidrofílicas e eletrostáticas entre o suporte e o substrato.

Limitações difusionais. Da mesma forma que na catálise heterogênea, a ação catalítica de enzimas imobilizadas pode ser dividida em no mínimo cinco etapas, a saber:

Difusão externa de substratos: Difusão do substrato do seio da fase líquida até a superfície do suporte;

Difusão interna de substratos: Transporte do substrato da superfície do suporte para o domínio da enzima;

Catálise: Reação química propriamente dita;

Difusão interna de produtos: Transporte do produto do domínio da enzima para a superfície do suporte;

Difusão externa de produtos: Difusão do produto da superfície do suporte para o seio do meio reacional.

As alterações nas propriedades das enzimas são decorrentes da interação entre os vários efeitos citados anteriormente (conformacionais, estereoquímicos, de partição e limitações difusionais). Dependendo do efeito que controla a reação, os parâmetros

cinéticos podem ser diferenciados. Esses parâmetros podem ser classificados em três categorias principais (Freire, 1988).

Parâmetros cinéticos intrínsecos. São os parâmetros que refletem o comportamento cinético verdadeiro da enzima imobilizada. Esses parâmetros só podem ser determinados no macroambiente caso a concentração de substrato e produto seja a mesma do micro-ambiente. Devido à existência de efeitos conformacionais e esteroquímicos, os parâmetros cinéticos intrínsecos da enzima imobilizada podem ser distintos, e geralmente o são, dos parâmetros para a enzima solúvel.

Parâmetros cinéticos inerentes. Esses parâmetros refletem o comportamento cinético da enzima na ausência de limitações difusionais e só podem ser determinados quando o transporte de substratos e produtos ocorrer de forma infinitamente rápida. Essa condição pode ser alcançada na prática pelo uso de membranas finas, enzimas com baixa atividade e agitação suficiente do meio reacional. Os parâmetros cinéticos inerentes e intrínsecos diferem entre si quando o efeito de partição é importante, ou seja, quando a matriz sólida interage com as espécies solúveis.

Parâmetros cinéticos efetivos. São os parâmetros globais que refletem o comportamento da enzima imobilizada na presença de efeitos difusionais, de partição, conformacionais e estereoquímicos. Esses parâmetros são determinados a partir da velocidade global da reação nas condições experimentais normalmente empregadas.

2.2.1.1. Imobilização de lipases via adsorção por interação hidrofóbica

Neste método de imobilização, considerado bastante simples e amplamente utilizado, grupos superficiais do suporte interagem com grupos de superfície da enzima, através da combinação de interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, atrações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, dentre outras (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Dalla Vecchia *et al.*, 2004). As interações predominantes dependem da natureza química e propriedades superficiais do suporte e da enzima de trabalho. Embora as enzimas imobilizadas por esta técnica estejam suscetíveis a uma dessorção, a

imobilização por adsorção é uma das técnicas mais empregadas na obtenção de biocatalisadores insolúveis, haja vista sua maior praticidade e menor custo (Kennedy, 1987). E a maior aplicação de biocatalisadores imobilizados por adsorção encontra-se em meios orgânicos, onde as enzimas não são solúveis, desfavorecendo a dessorção (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998).

O processo de imobilização por adsorção consiste no contato de uma solução, de concentração enzimática conhecida (μg de proteína/mL ou U/mL), com uma dada massa do suporte em estudo, à temperatura constante. Oliveira e col. (2006) mostraram que o aumento da concentração inicial de proteína nem sempre melhora a retenção de atividade do sistema, já que para valores acima de 8,1 mg de proteína/ g de suporte os autores não observaram nenhum aumento significativo em relação a atividade hidrolítica, provavelmente pelo fato do suporte ter atingido sua capacidade máxima adsortiva. Além disso, outra forma de adsorção é a precipitação da lipase sobre a superfície do suporte através do uso de solventes, como por exemplo, acetona e butanol (Cunha, 2007).

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as relativas à possibilidade de regeneração do material. Assim, o processo de imobilização bem como o uso repetido e contínuo do biocatalisador, algumas vezes, requer o uso de operações tais como: filtração, centrifugação e agitação, portanto, o suporte deve ter também boa resistência mecânica. Outra característica importante é a estabilidade térmica do suporte, pois dependendo do coeficiente de expansão, pode ocorrer distorção ou destruição do sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido à variação de temperatura (Kennedy *et al.*, 1987). Outras propriedades relevantes são: caráter hidrofóbico/hidrofílico, área superficial, insolubilidade no meio reacional, boa permeabilidade, elevada rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de microorganismos, capacidade de reutilização e custo (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Assim, levando-se em consideração as propriedades desejadas de um suporte, diversos materiais podem ser utilizados tais como polietileno, polipropileno, poliestireno, resinas sintéticas, celulose e sefadex® dentre outros.

Considerando as forças envolvidas no processo de adsorção, pode-se inferir que o sucesso e a eficiência de adsorção de uma enzima sobre um suporte dependem de vários parâmetros tais como pH, força iônica do meio, natureza do solvente empregado, relação entre a concentração de enzima e suporte, além das propriedades intrínsecas da enzima e do suporte empregado (Figura 2.12).

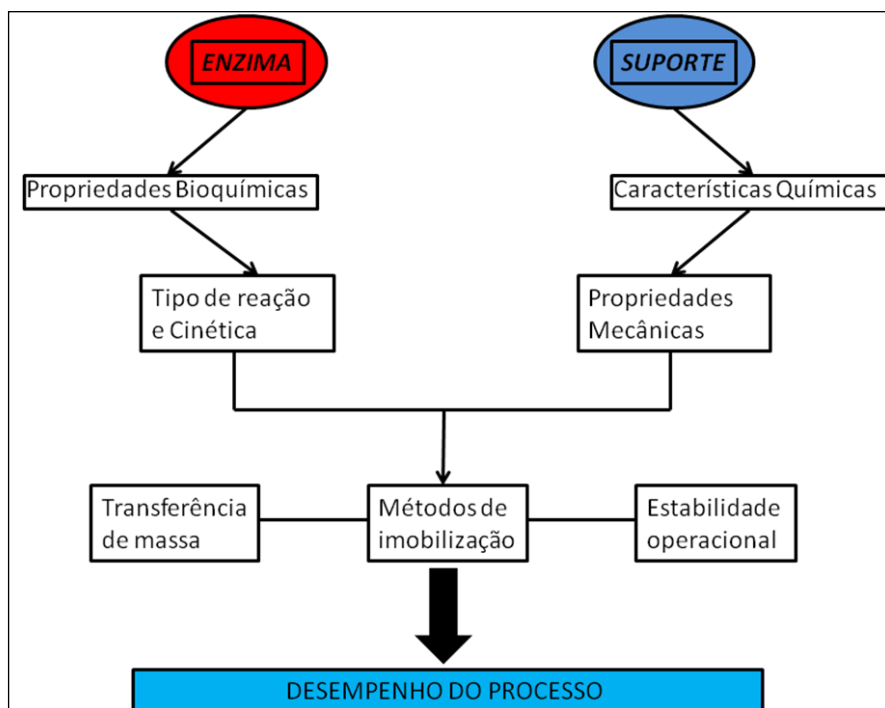


Figura 2.12: Interação entre suporte e enzima (Kennedy, 1987).

O uso de suportes porosos é mais vantajoso em um processo de imobilização, pela grande área interna disponível para a adsorção enzimática, além disso, a enzima fica protegida da turbulência externa, entretanto isto pode gerar limitações difusionais, bem como uma sub-estimativa de atividade, pois a enzima pode estar tão inclusa que não fica desta forma disponível para atuar.

Vários modelos foram propostos para analisar a adsorção de catalisadores sobre diferentes suportes, e assim como na cinética heterogênea na cinética enzimática, a quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador. Assim, mantendo-se a temperatura do processo de adsorção constante é possível gerar as isotermas de adsorção, que normalmente, seguem os modelos de Langmuir, Freundlich ou a combinação destes (Soares *et al.*, 1999).

No processo de imobilização por adsorção, tanto a quantidade de enzima adsorvida quanto a orientação em que estas são imobilizadas afetam sua atividade e

estabilidade (Nakanishi *et al.*, 2001). Logo, além de avaliar a quantidade adsorvida, é necessário determinar os valores de atividade recuperada e rendimento obtidos para um dado processo de imobilização (Gitlesen *et al.*, 1997).

Normalmente por apresentarem caráter mais hidrofóbico, lipases são imobilizadas em suportes hidrofóbicos quando se opta pelo processo de adsorção física. A presença de interfaces hidrofóbicas ocasiona mudanças estruturais da lipase, por exemplo, o fenômeno de ativação interfacial. Sendo assim, a adsorção de lipases sobre suportes porosos em meios com baixa força iônica ocorre através de grandes bolsos hidrofóbicos, formados pela face interna da tampa que recobre o sítio ativo e a área hidrofóbica próxima ao sítio enzima, deslocando o equilíbrio conformacional em direção à forma aberta (Figura 2.13) (Paiva *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2007, Almeida *et al.*, 2008). Outra razão pela qual o emprego de suportes hidrofóbicos é preferível aos hidrofílicos para imobilização decorre da tendência dos suportes hidrofílicos em competir pela água disponível no meio reacional (Villeneuve *et al.*, 2000).

Desta forma é possível obter preparações enzimáticas imobilizadas e hiperativadas que possam atuar sobre pequenos substratos hidrofóbicos solúveis no meio reacional. Entretanto, o aumento de cadeia e hidrofilicidade de um substrato pode acarretar impedimento estereoquímico devido à proximidade da superfície do suporte hidrofóbico em relação ao sítio ativo da lipase, reduzindo a atividade enzimática (Mateo *et al.*, 2007, Almeida *et al.*, 2008).

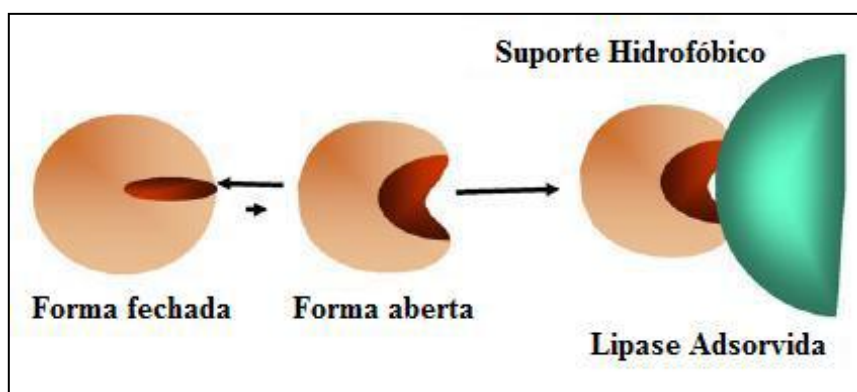


Figura 2.13: Imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos (Mateo *et al.*, 2007).

Apesar de dificultar o entendimento e o controle do mecanismo de imobilização, o fenômeno de ativação interfacial pode ser explorado no desenvolvimento de métodos de purificação e no aperfeiçoamento dos métodos de imobilização. Pode-se esperar que

lipases com pequenas diferenças estruturais reconhecessem de forma distinta uma mesma superfície hidrofóbica, modificando a taxa e a força de adsorção. Gera-se, desta forma, a separação ou o enriquecimento de diferentes isoformas por adsorção seletiva variando as condições experimentais como tempo de equilíbrio, pH, força iônica e temperatura de equilíbrio da solução. Fibras de agarose recobertas por grupos hidrofóbicos (butil, fenil ou octil) representam uma interface hidrofóbica na qual lipases estão aptas a sofrer adsorção interfacial seletiva similar à experimentada por lipases na presença de gotas de substratos líquidos insolúveis (Sabuquillo *et al.*, 1998; Fernandez-Lorente *et al.*, 2001, Cunha *et. al.*; 2008).

A técnica de imobilização por adsorção hidrofóbica tem sido extensivamente utilizada na modificação favorável das propriedades catalíticas e físico-químicas das lipases. Comercialmente destacam-se: a lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) imobilizada em resina poliacrílica e denominada no mercado pelo nome Novozym 435, o biocatalisador mais empregado em reações de biotransformação de lipases em meios aquo-restritos; lipase de *Mucor miehei* imobilizada em resina de troca aniônica macroporosa (Lipozyme-IM) quando comercializada pela Novozymes e Chirazyme ao ser comercializada pela Roche (Christensen *et al.*, 2003). Entretanto, estes biocatalisadores são de alto custo, associado ao preço das matrizes hidrofóbicas.

A Tabela 2.4 apresenta a hiperativação de lipases de diferentes fontes após o processo de imobilização em alguns suportes utilizando o palmitato de p-nitro fenila (p-NPP) como substrato reacional (Bastida *et al.*, 1998; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2009).

Tabela 2.4: Atividade relativa de lipases imobilizadas sobre suportes hidrofóbicos.

<i>Lipase</i>	<i>Suporte</i>	<i>Atividade relativa (%)</i>
<i>C. antarctica</i>	Octil-agarose	200
<i>C. rugosa</i>	Octil-agarose	110
<i>H. lanuginosa</i>	Octil-agarose	2000
<i>R. miehei</i>	Octil-agarose	700
<i>M. javanicus</i>	Octil-agarose	300
<i>P. fluorescens</i>	Octil-agarose	150
<i>R. niveus</i>	Octil-agarose	600
<i>Pancreática de porco</i>	Octil-agarose	300
<i>M. miehei</i>	Octadecil-sepabeads	500
<i>T. thermophilus</i>	Octadecil-sepabeads	400
<i>P. simplicissimum</i>	Butil-agarose	131
<i>P. simplicissimum</i>	Fenil-agarose	240
<i>P. simplicissimum</i>	Octil-agarose	1133

A esterase termoestável recombinante oriunda da arquea hipertermófila de *Pyrococcus furiosus* também apresentou, após imobilização via adsorção hidrofóbica em Accurel® EP 100 (polipropileno microporoso), uma melhora significativa em relação a retenção de atividade (106%). Segundo os autores esta esterase apresenta um número razoável de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos nas proximidades do sítio ativo que podem interagir com o suporte, permitindo assim a formação de um ambiente que envolve a superfície deste suporte, o sítio ativo e o substrato resultando, desta forma, em uma melhora da eficiência catalítica da esterase (Almeida *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2008).

O efeito de solventes polares pode ser prejudicial, mesmo sobre lipases imobilizadas, podendo haver perda de atividade por desnaturação. Desta forma, para evitar o contato direto entre a enzima e os solventes, um novo protocolo de imobilização lipásica foi desenvolvido por Guisán e col. (2001) para aplicações de biocatálise em meio orgânico. A técnica proposta constituiu da adsorção seletiva da lipase de *Candida rugosa* sobre o suporte hidrofóbico octadecil-sepabeads. Após a imobilização propriamente dita, foi feito o recobrimento da enzima por poli (etileno imina) capaz de protegê-la dos efeitos deletérios de solventes orgânicos.

A Tabela 2.5 apresenta alguns trabalhos desenvolvidos envolvendo imobilização de enzimas nos últimos anos.

Tabela 2.5: Imobilização de lipases via adsorção física.

<i>Suporte</i>	<i>Características do suporte</i>	<i>Reação</i>	<i>Referência</i>
Polimetil metacriato		Esterificação	Basri <i>et al.</i> , 1996
Accurel® EP 100		Esterificação	Gitlesen <i>et al.</i> , 1997
Eupergit C250L			
Celite		Esterificação e hidrólise	Ivanov e Schneider, 1997
Octil-silica			
Octil-sepharose	Agarose octil ligada ao suporte	Hidrólise enantiosseletiva	Sanchez <i>et al.</i> , 1999
Óxido de “hidrous niobium” amorfo			
Óxido de “hidrous niobium” cristalino		Esterificação	Castro <i>et al.</i> , 2000
Fosfato de zircônio amorfo			
Accurel® EP 100		Esterificação	Persson <i>et al.</i> , 2000
Celite 535	Terra diatomácea	Hidrólise	Akova e Ustun, 2000

	Polimetacrilato		
Octadecil-sepabeads	funcionalizado com grupo octadecil	Hidrólise enantiosseletiva	Fernández-Lorente <i>et al.</i> (2001)
Octadecil Sílica		Imobilização in situ. Emprego no estudo de reações enantiosseletivas	Calleri <i>et al.</i> , 2003 citado em Cardoso, 2009
MCM-36	Aluminossilicato	Transesterificação	Dimitriu <i>et al.</i> , 2003
	Sílica macroporosa		
Sílica funcionalizada	funcionalizada com grupo octil	Esterificação	Blanco <i>et al.</i> , 2004
Celulose octato			
Celulose palmitato			
Terra diatomácea			
Vidro octil		Esterificação	Mirolawa <i>et al.</i> , 2004
Vidro octadecil			
Vidro silanizado			
PVA-C12			
Polifenilacetileno Octadecil-sepabeads Accurel® EP 100	PVA funcionalizada com ácido láurico	Transesterificação enantiosseletiva	Panzavolta <i>et al.</i> , 2004
Poli-acrilonitrila-co-ácido		Hidrólise	Ye <i>et al.</i> , 2006

DEAE-agarose	Agarose funcionalizada com grupos amino	Hidrólise enantiosseletiva	Palomo <i>et al.</i> , 2005
Membrana de poliacrilonitrila		Hidrólise enantiosseletiva	Long <i>et al.</i> , 2005
Accurel® MP 1000	Polímero de polipropileno	Esterificação	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
PEI-agarose	Agarose recoberta com polietilenoimina	Hidrólise enantiosseletiva	Wilson <i>et al.</i> , 2006
PEI-agarose	Agarose recoberta com polietilenoimina	Hidrólise enantiosseletiva	Torres, 2006
Celulose Polisulfona		Esterificação	Hilal <i>et al.</i> , 2006
Accurel® EP 100	Polímero de polipropileno	Esterificação	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
Membrana de acetato de celulose com politetrafluor etileno		Hidrólise enantiosseletiva	Wang <i>et al.</i> , 2007
Accurel® EP 100		Hidrólise	Almeida <i>et al.</i> , 2008
Octadecil-sepabeads Octil-agarose		Hidrólise	Cunha <i>et al.</i> , 2008
Octil-agarose Hexil-toyopearl Octadecil-sepabeads Poli-hidroxibutirato (PHB)		Etanolise do óleo de babaçu	Mendes, 2009

Membrana de poliacrilonitrila	Transesterificação	Sakai <i>et al.</i> , 2010
Fibra de coco	Hidrólise	Brigida, 2010
Suporte com ácido fenilboroníco e grupos aldeídos	Hidrólise	Gutarra <i>et al.</i> , 2011

A imobilização seletiva de enzimas é muito importante no desenvolvimento de biossensores, kits imunológicos e colunas cromatográficas. Questões como velocidade de adsorção, as forças motrizes responsáveis pela imobilização e as mudanças conformacionais são fatores de extrema importância para a determinação da quantidade de proteína que se adsorve em um determinado suporte, principalmente para que não haja perda de enzima (Pancera, 2006).

A adsorção pode ser avaliada quantitativamente através de isotermas, as quais mostram a relação existente entre a concentração das lipases em solução após o equilíbrio e a concentração das mesmas adsorvida nos suportes numa mesma temperatura. O equilíbrio da adsorção de lipases em suportes com diferentes graus de hidrofobicidade pode ser descrito por modelos de equilíbrio clássicos, que correlacionam matematicamente as quantidades adsorvidas em equilíbrio com o meio circundante, tais como: Langmuir, Langmuir multicamada, Freundlich ou ainda Redlich-Kwong (Al-Duri e Yong, 2000). Entretanto, devido à natureza complexa das biomoléculas, o desenvolvimento de um mecanismo geral para descrever a adsorção das mesmas sobre suportes sólidos não é uma tarefa trivial e nenhum dos modelos acima citados foi capaz de explicar todos os resultados encontrados na literatura (Pancera, 2006). Cabe dizer que o modelo que melhor descreve o equilíbrio de adsorção dependerá da interação enzima-suporte (Sharma & Agarwal, 2001b).

2.2.1.1.1. Modelo de Langmuir

A isoterma de Langmuir é capaz de descrever o comportamento de adsorção de várias substâncias e diversos pesquisadores já demonstraram isso. Este tipo de isoterma

foi inicialmente desenvolvida para descrever a adsorção de gases e é descrita pela equação 2.9 (Al-Dury e Yong, 2000).

O modelo baseia-se nas seguintes premissas: (i) a adsorção não excede uma monocamada, (ii) todos os sítios de adsorção são equivalentes e a superfície do substrato é uniforme (perfeitamente plana em escala microscópica), (iii) uma molécula de adsorbato pode interagir somente com um sítio de adsorção e (iv) as moléculas adsorvidas não interagem entre si.

$$Q^* = \frac{Q_{\max} \cdot K_A \cdot C^*}{1 + K_A \cdot C^*} \quad \text{Eq. 2.9}$$

C^* é a concentração da espécie em solução que está em equilíbrio com a fração adsorvida Q^* (mg de proteína/g de suporte), K_A é a constante de equilíbrio da reação de adsorção e Q_{\max} é a máxima capacidade de adsorção.

2.2.1.1.2. Modelo de Langmuir multicamada

Muitas vezes diversas proteínas apresentam processos de adsorção que não são completamente descritos pelo modelo de Langmuir monocamada, pois há interação entre as moléculas, ocasionando a geração de multicamadas. A equação 2.10 descreve esse modelo.

$$Q^* = \frac{Q_{\max} \cdot K_A}{\left[(1/C^*) + K_A - 2 \cdot K_{AA} + (K_{AA} - K_A) \cdot K_{AA} \cdot C^* \right]} \quad \text{Eq. 2.10}$$

Onde os parâmetros são os mesmos da isoterma de Langmuir, porém essa isoterma apresenta um parâmetro a mais, o K_{AA} que descreve a interação entre as moléculas de adsorbato, de forma que, quando todos os sítios de adsorção são saturados, outras camadas são formadas (Castilho, 2001).

2.2.1.1.3. Modelo de Freundlich

A isoterma de Freundlich corresponde a adsorção em sítios não uniformes. Neste caso, calor de adsorção freqüentemente diminui com o aumento da cobertura na

superfície. A falta de uniformidade pode existir previamente nos diferentes sítios de adsorção ou ser causada pelas forças repulsivas entre os átomos ou moléculas adsorvidas. A equação 2.11 descreve matematicamente esta isoterma.

$$Q^* = K \cdot (C^*)^n \quad \text{Eq. 2.11}$$

K é a constante da isoterma de Freundlich e n é um índice desta isoterma (determinado experimentalmente).

Embora normalmente aplicado num sentido estritamente empírico, isto pode ser de interesse teórico em termos de adsorção em superfície energeticamente heterogênea. Como o montante de adsorção aumenta indefinidamente, a isoterma de Freundlich apresenta como inconveniente o fato de não prever a capacidade máxima de adsorção (Sharma & Agarwal, 2001a).

2.2.1.1.4. Modelo de Langmuir-Freundlich

Outra aproximação para explicar a natureza heterogênea das interações entre a proteína e o adsorvente envolve a equação (2.12).

$$Q^* = \frac{Q_{\max} \cdot (C^*)^n}{K_D + (C^*)^n} \quad \text{Eq.2.12}$$

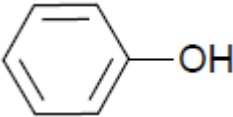
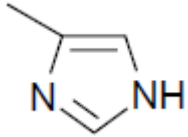
K_D é a constante de dissociação aparente que inclui contribuições de ligações entre ligante e forma monomérica, n é o coeficiente numérico de Langmuir - Freundlich.

A inclusão do terceiro parâmetro “n”, a ser ajustado, permite que esta equação possa representar melhor a natureza heterogênea da adsorção e as interações cooperativas, uma vez que o coeficiente “n” é classicamente um indicativo do tipo de cooperatividade presente no mecanismo de adsorção. Quando $n=1$, não há cooperatividade entre as proteínas, ou os sítios são independentes. Para $n>1$, uma cooperatividade positiva é sugerida e quando $0 < n < 1$, uma cooperatividade negativa é atribuída ao processo (Sharma & Agarwal, 2001a). O valor de n pode, assim, ser empregado como um coeficiente empírico, representando o tipo e a extensão da presente cooperatividade na interação.

2.2.1.2. Imobilização de lipase via Ligação Covalente

A utilização de proteínas imobilizadas covalentemente teve início no final da década de 50, sendo que a técnica foi originalmente desenvolvida para auxiliar na elucidação da estrutura de proteínas. Desde o final da década de 70, diversos trabalhos vêm utilizando esta técnica de imobilização a fim de alterar e melhorar as propriedades da lipase nativa (Matsushima *et al.*, 1996). A ligação covalente em uma matriz baseia-se na retenção da enzima à superfície do suporte através de ligações covalentes entre grupos funcionais presentes na enzima (Tabela 2.6) e na superfície do suporte (Cunha *et al.*, 2009; Brigida, 2010).

Tabela 2.6: Grupos funcionais presentes na enzima disponíveis para ligação covalente com um dado suporte (Brígida, 2010)

-NH ₂	T-amino de L-lisina e grupamento amino N-terminal
-SH	Tiol de L-Cisteína
-COOH	Carboxila de L-aspartato e L-glutamato e grupamento carboxílico C-terminal
	Grupamento fenólico de L-Tirosina
-S-S-	Pontes dissulfídicas de L-cisteína
CH ₃ -S-	Tioéter de L-metionina
-CH ₂ -OH	Hidroxíla de L-serina e L-treonina
	Imidazol de L-histidina
-NH-C(N ₂ H ₃)	Guanidino de L-arginina

A imobilização por esta técnica é dividida em duas etapas: i. funcionalização do suporte, a fim de torná-lo apto a ligar-se covalentemente à enzima e ii) contato enzima-suporte para que a reação ocorra. As características do suporte definem os

procedimentos a serem adotados na primeira etapa do processo de imobilização. A presença de grupos hidroxilas, aldeídos e/ou grupos carboxilas, por exemplo, vai definir o tipo de ativação possível de ser realizada e/ou grupamento ligante a ser adicionado.

A ativação do suporte com glutaraldeído gera grupos aldeídos que irão reagir com os grupos aminos da enzima por meio de ligações covalentes instáveis (base de Schiff) como mostra a Figura 2.14.

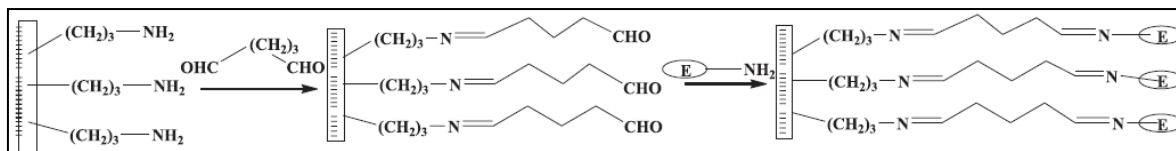


Figura 2.14: Exemplo da formação de base de Schiff utilizando suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando o glutaraldeído como agente de ativação (Cardoso, 2009).

Embora seja um método mais complexo e de maior custo operacional, algumas vantagens podem ser citadas, dentre elas: grande força de ligação com conseqüente estabilização do complexo enzima-suporte (evita o fenômeno de dessorção); pode-se obter elevada atividade enzimática após a imobilização e, além disso, a modificação conformacional sofrida pela enzima pode ser favorável (alteração das faixas de temperatura e pH ótimos), embora a alteração de sua estrutura normalmente possa gerar uma redução de atividade catalítica. Porém, é essencial que as condições usadas para a formação das ligações covalentes sejam brandas para evitar perda da atividade catalítica e o sítio ativo também deve permanecer livre de ligações covalentes e assim é às vezes protegido por um substrato ou composto análogo durante o processo de imobilização.

Após a imobilização e bloqueio dos grupos ativos remanescentes no suporte, as moléculas de enzima tornam-se ligadas ao suporte de forma bem definida e estável sem que ocorra desligamento nem interação adicional enzima-suporte. Além disso, a imobilização por esta técnica também pode ser utilizada como ferramenta na engenharia de proteínas, como, por exemplo, estabilização de enzimas monoméricas por imobilização covalente multipontual e estabilização de enzimas oligoméricas por imobilização das sub-unidades (Guisán *et al.*, 2001; Cardoso, 2009).

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter sua estrutura tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte, pois a água contribui para sua integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da enzima, além de limitar a solubilidade dos substratos hidrofóbicos em

torno da enzima (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Assim, quando a utilização da enzima covalentemente imobilizada é feita em sistemas com baixa atividade de água, o solvente penetra dentro da estrutura porosa do suporte e as moléculas de lipase sofrem ativação interfacial sobre a interface do solvente. Neste caso, a imobilização covalente se torna uma técnica adequada para uma correta elucidação da interação entre a lipase e a interface do solvente, sem que ocorram interações adicionais entre proteína-proteína e proteína-suporte (Fernandez- Lafuente *et al.*, 1998).

Bruno e col. (2004) imobilizaram via ligação covalente a enzima de *Mucor miehei* em membranas de Nylon através da ativação com glutaraldeído. Segundo os autores bons resultados foram obtidos na reação de hidrólise do p-nitrofenolpalmitato (pNPP), entretanto os mesmos não dosaram a atividade real do suporte, gerando desta forma, um grande erro de análise.

Torres e col. (2006) imobilizaram a enzima proveniente de *Candida antarctica* em suporte de brometo cianogênico (CNBr) a fim de efetuar a hidrólise enantiosseletiva do éster derivado do (*R,S*) ácido mandélico.

Gutarra e col. (2011) imobilizaram a lipase de *Candida antarctica* Fração B (gen sintético) expressa em *Pichia pastoris* em um novo suporte heterofuncional composto de ácido fenilborônico e grupos aldeídos. Segundo os autores o biocatalisador gerado foi muito estável na presença de elevadas quantidades de solvente e alta temperatura (50°C). Além disso, os autores verificaram melhora de pelo menos 5 vezes em relação a atividade enzimática específica quando compararam este método de imobilização com o tradicional método de ligação covalente. Um $ee(P) = 89\%$ pelo enantiômero *R* foi obtido quando efetuou-se a hidrólise enantiosseletiva do (*R,S*) mandelato de metila com este novo biocatalisador.

Tan e col. (2002) obtiveram monoglicerídeos (MAG) por hidrólise do óleo de palma utilizando lipases imobilizadas em membranas de quitosana (QTS), poli-álcool vinílico (PVA) e QTS/PVA, utilizando glutaraldeído ou epícloridrina como agente “de ligação cruzada”. A lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada na membrana QTS/PVA foi mais ativa na reação de hidrólise, quando comparada com as de QTS e PVA. Os rendimentos de MAG foram de 35-52%.

2.3. *Reatores Multifásicos*

A seleção do reator mais apropriado para um dado bioprocessamento depende das características da bioconversão (propriedades dos substratos/produtos), limitações reacionais (pH, temperatura, controle de atividade de água), cinéticas (inibição por substrato e/ou produtos) e do próprio biocatalisador (interações com o meio reacional), pois o conjunto destas informações determina o modo de operação e as características do fluxo (Figura 2.15) (Aires-Barros, 2007).

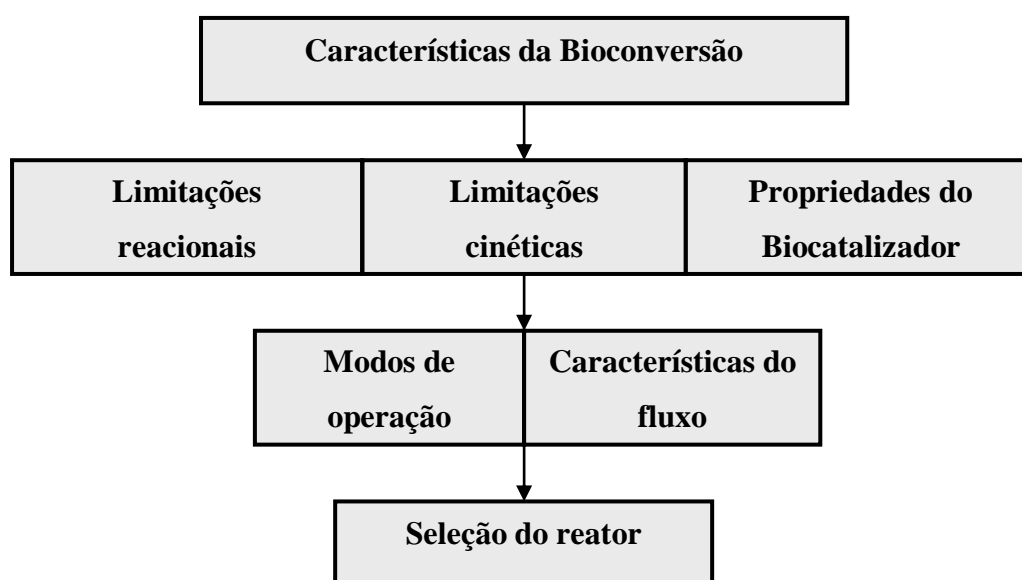


Figura 2.15: Seleção de reatores multifásicos (Aires-Barros, 2007).

De uma maneira geral, os requisitos essenciais para a seleção do reator mais apropriado para uma dada bioconversão são uma área interfacial elevada, de modo a permitir uma transferência adequada de substratos/produtos através da interface e produtividade volumétrica no reator (Aires-Barros, 2007).

Dentre os reatores usados em sistemas multifásicos destacam-se os agitados mecanicamente (contínuos ou descontínuos), os de membrana (também chamados de contactores), leito fixo e os reatores agitados por uma fase líquida.

Quando se opta por sistemas onde o catalisador é biológico, como por exemplo, enzimas, a escolha do reator deve levar em consideração as seguintes proposições:

- ✓ modo de operação: descontínuo (mais barato e de multiuso) e contínuo (mais caro e desenhado para um processo específico);

- ✓ custo do biocatalisador frente ao custo total do processo;
- ✓ estabilidade da enzima ao longo do processo;
- ✓ requisitos operacionais, a saber, possibilitar pleno controle do pH e da temperatura, permitir operar em concentrações não inibitórias de substrato, ser adequado frente às características da matéria-prima (por exemplo, o reator contínuo de leito fixo pode ser inadequado se a matéria-prima a ser processada contiver sólidos insolúveis);
- ✓ permitir a substituição do catalisador desativado sem interrupção do processo (por exemplo, o reator continuamente agitado é muito versátil nesta situação).

2.3.1. Contactores de membrana

Em qualquer processo biotecnológico é importante conhecer tanto o biocatalisador e seu mecanismo de atuação, como a separação dos bioprodutos gerados. Normalmente o mecanismo de atuação está associado à atividade do biocatalisador e, portanto, a quantidade de produto gerada, enquanto que as etapas de separação com a pureza do produto.

A maior parte das reações enzimáticas, em geral, são conduzidas em reatores simples operando em batelada, com controle de temperatura e eventualmente de pH. No final da reação, antes da recuperação do produto desejado, em geral, a enzima é inativada, ocasionando um aumento no custo total do processo (Rios *et al.*, 2004). Esta forma de operação dos biorreatores apresenta uma série de desvantagens como: baixa produtividade, altos custos de funcionamento, inativação enzimática, grande variabilidade de produtos, formação de emulsões, espuma, dentre outras (Rios *et al.*, 2004; Gabelman *et al.*, 2006).

Uma alternativa tecnológica para contornar estes problemas é a separação contínua dos produtos durante a reação. Entretanto, dependendo do sistema reacional, o modo de conduzir a separação pode ser a etapa limitante. Neste sentido, a utilização dos processos de separação com membranas tem sido apontada como uma forma eficiente de remover os produtos com mínima alteração das condições reacionais.

Em sistemas reacionais bifásicos solvente-água, por exemplo, a membrana pode atuar como uma barreira seletiva, confinando a enzima e permitindo a permeação de apenas um componente, normalmente o produto, o que aumenta a eficiência da reação e,

ao mesmo tempo, possibilita a separação e purificação do produto (Trusek-Holownia e Noworyta, 2002; Hilal *et al.*, 2006). Neste tipo de sistema as membranas são utilizadas em módulos denominados como contactores. A força motriz para permeação é gerada pelo gradiente do potencial químico através da membrana, que pode ser obtido por uma diferença de concentração, pressão, campo elétrico, dentre outras.

O contato não dispersivo de duas fases através de um contactor é uma alternativa tecnológica que também oferece substancialmente mais área interfacial por volume, quando comparada com outras operação de separação mais convencionais. Eficiências elevadas podem ser alcançadas usando a configuração adequada para a membrana, como por exemplo, fibras ocas ou membranas planas. As fases circulam em lados opostos da membrana e o contato interfacial entre estas fases é obtido na entrada de cada poro (Gabelman *et al.*, 2006). A Figura 2.16 representa um contactor com membranas na forma de fibras ocas, comercializado pela CELGARD LLC, mais conhecido como Liqui-Cel™.

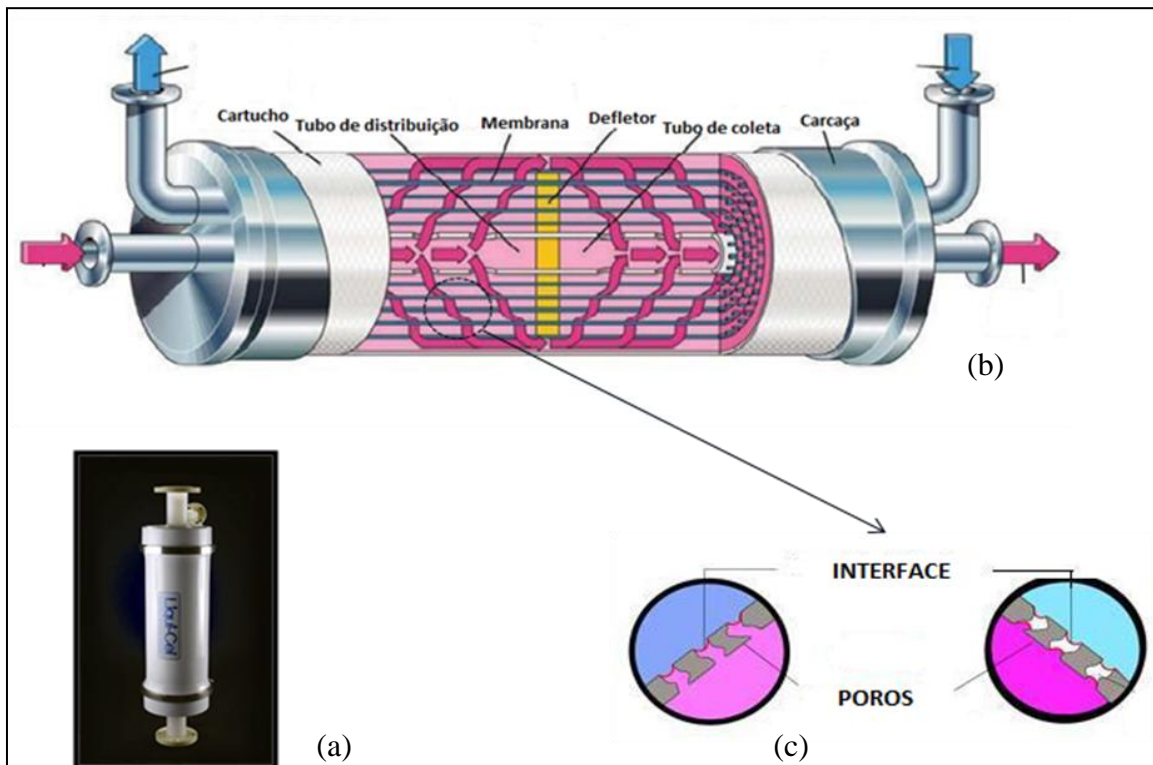


Figura 2.16: (a) Contactor de membrana de fluxo paralelo comercializado pela CELGARD LLC (b) Esquema básico de funcionamento de um contactor e (c) Geração da interface nos poros da membrana (Gabelman *et al.*, 1999).

Além deste tipo de módulo não estar sujeito à formação de emulsão e espuma, visto que não há dispersão líquido-líquido, não é necessário que os líquidos

apresentem densidades diferentes, condição necessária quando se trabalha com coluna ou torre, ampliando, assim, a faixa de operação do sistema. Os contactores vêm sendo utilizados para extração e recuperação de poluentes orgânicos, proteínas, produtos farmacêuticos e produtos de fermentação voláteis e não voláteis (Bothun *et al.*, 2003). Além disso, os contactores possibilitam operação em condições assépticas e também ser utilizados em processos fermentativos (Gabelman *et al.*, 1999).

Industrialmente a separação dos produtos, bem como a recuperação e reuso de catalisadores da mistura reacional, constitui uma etapa de grande importância econômica do processo (Prazeres e Cabral, 1994 citado em Moura *et al.*, 2007). Assim, processos enzimáticos conduzidos através do contato não dispersivo em contactores com membranas aumentam a atratividade econômica do processo, pois possibilitam a utilização da enzima livre ou imobilizada nos poros da membrana (a escolha depende da atividade desejada no volume reacional), retenção e reuso do catalisador, redução da inibição por substrato e/ou produto, purificação simultânea com a síntese do produto, controle das propriedades de produto através da enzima (especificidade) e/ou membrana (seletividade) e possibilidade de integração com outros processos dentro de uma planta industrial (Rios *et al.*, 2004; Prazeres e Cabral, 1994 citado em Moura *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Além das vantagens mencionadas anteriormente, a utilização de contactores torna-se ainda mais vantajosa, visto que o sistema opera de forma contínua e o escalonamento é simples e fácil através da adição de outros módulos. É também de extrema importância mencionar que por não apresentarem partes móveis, a limpeza e manutenção destes módulos ficam facilitadas, além de que, quando se trabalha com solventes muito voláteis, o uso destes módulos minimiza a perda dos mesmos (Gabelman *et al.*, 1999).

As membranas de ultrafiltração apresentam distribuição de tamanho de poros entre 1 a 100 nm, correspondendo a retenções de compostos com massa molar entre 500 a 100.000 Da, respectivamente, e são mais adequadas para retenção da maioria das enzimas, nativas ou modificadas. O limite de exclusão de massa molar de uma membrana é dado pela massa molar da menor molécula retida em pelo menos 90% pela membrana (Prazeres e Cabral, 1994 citado em Moura *et al.*, 2007).

A seleção da membrana a ser utilizada em reatores enzimáticos deve levar em consideração o tamanho da enzima (geralmente apresentam massa molar entre 10 e 80kDa), substratos e produtos, bem como a natureza química das substâncias e do material da membrana, já que seletividade em relação às várias substâncias no meio reacional, em um contactor, depende do tamanho relativo entre as moléculas e os poros da membrana (Rios *et al.*, 2004; Prazeres e Cabral, 1994 citado em Moura *et al.*, 2007). Um importante parâmetro a ser utilizado nesta seleção é o coeficiente de rejeição de solutos, que idealmente deve ser zero para o produto e 100% para a enzima, permitindo completa retenção do catalisador no sistema reacional (Prazeres e Cabral, 1994 citado em Moura *et al.*, 2007).

Na última década, imobilização de enzimas, em especial, lipases, na superfície ou dentro dos poros de membranas semi-permeáveis tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisas.

Enzimas imobilizadas em reatores de membranas operam simultaneamente como um suporte catalítico e barreira seletiva. Além disso, estabilidades mais elevadas e maior resistência a solventes orgânicos são obtidas ao se optar em trabalhar com a enzima imobilizada (Molinari *et al.*, 1994; Giorno *et al.*, 1997; Rios *et al.*, 2004). As características inerentes aos contactores com membranas os tornam como excelentes ferramentas para a separação via enzimática de misturas racêmicas, já que a enzima apresenta melhor desempenho no meio reacional (solvente/tampão, por exemplo) livre da geração de uma emulsão.

Apesar das inúmeras vantagens mencionadas anteriormente, os contactores de membranas introduzem outra resistência à transferência de massa, a resistência da própria membrana. Além disso, membranas estão sujeitas a incrustações e podem ter vida útil limitada, o que aumenta os custos operacionais. Estes módulos também estão sujeitos a diminuição de eficiência, devido a heterogeneidade da reação no seio e na superfície da membrana, variação da concentração dos componentes do sistema reacional na superfície da membrana e decaimento da atividade enzimática ao longo do tempo (Gabelman *et al.*, 1999; Rios *et al.*, 2004; Kneifel *et al.*, 2006).

Um outro problema, também relacionado a estes módulos, muito comum na escala de laboratório, é o adesivo utilizado na colagem das fibras ocas ser atacado por solventes químicos e interferir diretamente no processo (Gabelman *et al.*, 1999).

2.3.1.1. Transferência de massa em contactores de membranas

O decaimento do fluxo é o maior problema em muitos processos com membranas, como osmose inversa e ultrafiltração. Nestes processos, o fluxo decai quando a resistência ao transporte aumenta e isto, normalmente, é causado pelo acúmulo de material retido próximo da superfície ou dentro da própria membrana (Mavroudi *et al.*, 2003). Assim, tem-se utilizado o modelo de resistência em série para analisar o decaimento do fluxo devido à formação de incrustações na membrana, que pode gerar tanto um bloqueio reversível como irreversível (Mavroudi *et al.*, 2006). A Figura 2.17 representa um o perfil de concentração do soluto em uma extração líquido-líquido em um contactor de membrana hidrofóbica.

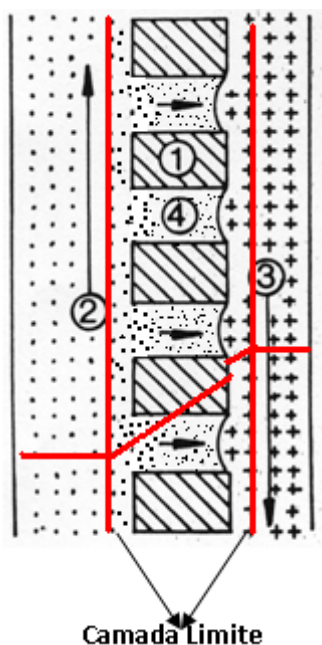


Figura 2.17: Perfil de concentração de um dado soluto para uma membrana hidrofóbica. Onde: 1: Membrana hidrofóbica, 2: Fase orgânica, 3: Fase aquosa e 4: Poros da membrana. (adaptado de Galbeman *et al.*, 1999).

2.3.1.1.1. Equações para transferência de massa em contactores de membranas

De acordo com o modelo de resistência em série, um determinado soluto encontra, pelo menos, três resistências a sua passagem de uma fase para outra: a camada limite da fase aquosa, a membrana e a camada limite da fase orgânica (Gabelman *et al.*, 1999). O modelo de resistência em série é baseado nas seguintes suposições: (i) Os dois fluidos são imiscíveis, (ii) existe equilíbrio na interface líquido/líquido, (iii) transferência de massa pode ser descrita pela teoria do filme, (iv) o coeficiente de partição é constante ao longo de toda a faixa de condições investigadas, (v) o sistema encontra-se em estado estacionário, (vi) a curvatura da interface líquido/líquido não afeta significativamente a taxa de transferência de massa, o equilíbrio de distribuição de soluto ou a área interfacial e (vii) transporte de soluto não ocorre através das partes não porosas da membrana. (Bothun *et al.*, 2003; Gabelman *et al.*, 1999). Os coeficientes de transferência de massa global e individual podem ser determinados experimentalmente.

Assim, por exemplo, para membranas hidrofóbicas, com a fase orgânica escoando do lado externo das fibras e sem reação química, podemos escrever duas equações distintas relacionando os coeficientes de transferência de massa global e os relativos a cada fase, baseadas na utilização da força motriz a partir da concentração da fase orgânica, Eq. (1.13) ou da concentração da concentração da fase aquosa, Eq. (1.14).

$$\frac{1}{K_o} = \frac{m_i}{\beta_w} + \frac{d_i}{d_e \beta_o} + \frac{d_i}{d_m \beta_m}$$

Eq.1.13

$$\frac{1}{K_w} = \frac{1}{\beta_w} + \frac{d_i}{m_e d_e \beta_o} + \frac{d_i}{m_e d_m \beta_m}$$

Eq.1.14

Onde: **K** é o coeficiente de transferência de massa global baseado na concentração da fase orgânica (o) e na concentração da fase aquosa (w), m/s; **β** é o coeficiente de transferência de massa individual associado com a fase aquosa (w), com a fase orgânica (o) e com a membrana (m), m/s. O termo **d** refere-se ao diâmetro interno (i), externo (e) e a média logarítmica (lm) da fibra, m.

O coeficiente de partição, m_i é definido na interface de acordo com a seguinte relação de equilíbrio:

$$C_{i0} = m_i * C_{iw}$$

Eq.1.15

C_{i0} e C_{iw} são as concentrações em gmol/m^3 de soluto na fase orgânica e aquosa, respectivamente.

As equações (1.13) e (1.14) são utilizadas quando a transferência de massa é limitada pela fase orgânica ($m_i \ll 1$) e pela fase aquosa ($m_i \gg 1$), respectivamente (Bothun *et al.*, 2003). Quando a membrana é hidrofílica e a fase aquosa percola o interior das fibras, sem reação química, equações similares às equações (1.13) e (1.14) podem ser escritas.

É importante mencionar que apesar de os modelos apresentados até o momento serem para um contactor de membranas do tipo líquido-líquido, o processo para um contactor gás-líquido é análogo se o coeficiente de partição for substituído pela constante da lei de Henry (Gabelman *et al.*, 1999).

Em um contactor com membranas há variação da concentração das espécies ao longo do sentido do escoamento. Neste caso, o fluxo das espécies i (J_i em $\text{g/m}^2.\text{s}$) através da membrana pode ser definido segundo a equação (1.16) e pode ser relacionado com o coeficiente global de transferência de massa pela equação (1.17).

$$J_i = \frac{Q_{aq} \rho_F (C_{f,i0} - C_{r,i})}{A}$$

Eq. 1.16

$$J_i = K \cdot \Delta C_{lm}$$

Eq. 1.17

Onde: Q_{aq} é a vazão volumétrica de alimentação da fase aquosa, m^3/s ; ρ_F é a densidade da alimentação, g/m^3 ; C representa a concentração do soluto i (fração massa) na alimentação (f) e permeado (r), e A é a área interfacial de contato, m^2 . ΔC_{lm} é a média logarítmica das concentrações, que pode ser determinada através da equação (1.18):

$$\Delta C_{lm} = \frac{(\Delta C_{i1} - \Delta C_{i2})}{\ln\left(\frac{\Delta C_{i1}}{\Delta C_{i2}}\right)}$$

Eq. 1.18

Os subscritos 1 e 2 referem-se as extremidades do módulo, e:

$$\Delta C_i = m_i C_{iw} - \Delta C_{i0}$$

Eq. 1.19

Trusek-Holownia e Noworyta (2004) utilizaram um contactor com membranas planas e as equações para a determinação do coeficiente de transferência de massa, para sistemas com membranas hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente, foram re-escritas como:

$$\frac{1}{K_0} = \frac{m_i}{\beta_w} + \frac{1}{\beta_m} + \frac{1}{\beta_o} \quad \text{Eq. 1.20}$$

$$\frac{1}{K_0} = \frac{m_i}{\beta_w} + \frac{m_i}{\beta_m} + \frac{1}{\beta_o} \quad \text{Eq. 1.21}$$

k_m é o coeficiente de transferência de massa na membrana, m/s, definido pela relação 1.22.

$$\beta_m = \frac{D_F}{\kappa \cdot d_m} \quad \text{Eq. 1.22}$$

Onde D_F é o coeficiente de difusão do soluto na fase orgânica ou aquosa, m^2/s ; κ é a tortuosidade e d_m é a espessura da membrana, m.

Os coeficientes de transferência de massa nas fases orgânica e aquosa podem ser determinados experimentalmente ou estimado através das equações de Sherwood, conforme apresentado nas equações (1.23) e (1.24):

$$Sh_F = 6(Gr)^{0,35} = \frac{\beta_F \cdot b}{D_F} \quad Gr > 11 \quad \text{Eq. 1.23}$$

$$Sh_F = 1,25(Gr)^{0,35} = \frac{\beta_F \cdot b}{D_F} \quad Gr < 11 \quad \text{Eq. 1.24}$$

Sh_F : número de Sherwood; Gr : número de Grashov (=Razão entre empuxo e forças viscosas); b : largura do canal no módulo; sub-índice F representa qualquer uma das duas fases.

2.3.2. Aplicações dos contactores de membrana

Algumas aplicações especiais dos contactores de membrana como destilação por membrana ou evaporação osmótica são descritas e estão sendo bastante estudadas na literatura, tais como concentração de suco, sistemas de desumidificação de ar e

oxigenação de meio de cultivo (Kronenberger *et al.*, 2008; Albrecht *et al.*, 2005). De acordo com Gabelman e Hwang (1999) contactores de membrana podem ser utilizados para: extração líquido/líquido simples, absorção de gás e degaseificação (stripping), extração de gás denso, separações quirais, fermentações e transformações enzimáticas, extração de proteínas, tratamento de água, extração de metais e semicondutores, separações quirais.

2.3.2.1. Extração líquido/líquido

O sistema de contato líquido/líquido via uma membrana porosa é utilizado com sucesso para uma ampla faixa de valores para os coeficientes de partição usando diferentes geometrias e materiais de membrana, além de configurações de fluxo distintas. Neste processo, diversos fatores determinam qual o líquido que passará pelo lado externo ou interno das fibras. Por exemplo, o lado externo das fibras está sujeito à formação de caminhos preferenciais, o que reduz a eficiência de extração do soluto contido na alimentação. Além disso, é muito difícil obter um elevado grau de extração quando o soluto é alimentado pelo lado externo das fibras.

Na maior parte das aplicações da extração líquido-líquido, a resistência à transferência de massa é menor quando os poros da membrana são preenchidos com o fluido em que o soluto é mais solúvel. Isto sugere o uso de membranas hidrofílicas ou hidrofóbicas para solutos com baixo ou alto coeficiente de partição, respectivamente. Em geral, um soluto com baixa massa molar apresenta maior solubilidade em solventes polares, portanto, um solvente polar deverá ser utilizado para molhar os poros de uma membrana hidrofílica. A situação oposta é obtida para altos valores da massa molar, quando se deve usar uma membrana hidrofóbica. Entretanto, o pré-tratamento da membrana pode ser utilizado, possibilitando que um solvente polar consiga molhar uma membrana hidrofóbica, reduzindo a resistência à transferência de massa; similarmente, os poros de uma membrana hidrofílica podem ser preenchidos por um solvente não polar (Gabelman *et al.*, 1999).

A separação de uma mistura racêmica através de um contactor de membrana e de extração líquido-líquido pode ser realizada por dois processos distintos: a separação indireta, na qual a membrana faz parte do processo enantiosseletivo, mas não apresenta

seletividade entre os enantiômeros, ou por separação direta utilizando membranas quirais enantiosseletivas.

No processo de separação indireta a solução contém a mistura racêmica e os agentes quirais, que podem ser enzimas livres. Choi e col. (2007) efetuaram a separação do (*R,S*) ácido mandélico (Figura 2.18), intermediário quiral usado na produção da semi-sintética cefalosporina e penicilina, através de um contactor de membranas atuando de forma indireta via reação de esterificação.

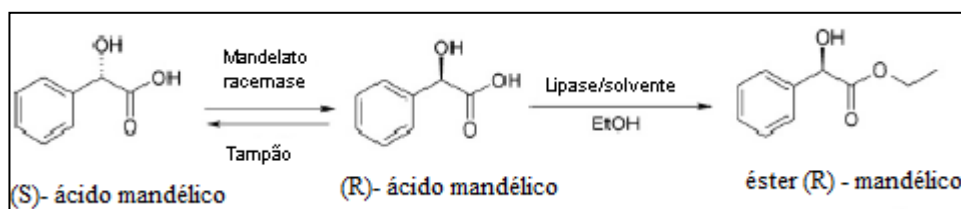


Figura 2.18: Esterificação do ácido mandélico via contactor de membranas (Choi *et al.*, 2007).

A fim de ultrapassar 50% de rendimento, o máximo permitido através de uma resolução cinética, os autores propuseram uma resolução cinética dinâmica, clonando e super-expressando a enzima mandelato racemase proveniente de *Pseudomonas putida* em *E. coli* Top 10, que atuou na conversão do *S*-ácido mandélico em *R*-ácido mandélico, alcançando desta forma melhores resultados de conversão. Assim, pelo lado externo das fibras foi recirculado o solvente orgânico com a lipase (ambos definidos por testes investigativos iniciais), que atuou na reação de esterificação transformando o (*R,S*)-ácido mandélico em *R*-mandelato de etila. Por questões de afinidade, a enzima contida na fase orgânica atuou somente sobre o enantiômero *R*, desta forma o outro enantiômero migrava para o interior das fibras, onde recirculava-se solução tampão com a mandelato racemase. Assim, após a reação de racemização na interface entre as soluções, o *R*-ácido mandélico migrava novamente para o exterior das fibras e desta forma era convertido no seu respectivo éster (*R*- mandelato de etila). A Figura 2.19 representa o esquema reacional no contactor.



Figura 2.19: Esquema de separação do ácido mandélico através de resolução cinética dinâmica (Choi *et al.*, 2007).

As análises para a determinação dos parâmetros de interesse foram efetuadas através de cromatografia gasosa e o melhor sistema proposto atingiu 65% de conversão e 98% de excesso enantiomérico com a lipase de *Candida antarctica* (fração B) em dicloreto de etileno após 48 horas.

O ibuprofeno (ácido 2-[4-(2-metilpropil)fenil] propanóico) (Figura 2.20), fármaco quiral muito usado no tratamento de artrite reumatóide e também como anti-inflamatório, foi separado em contactor de membranas por Long e col. (2005).

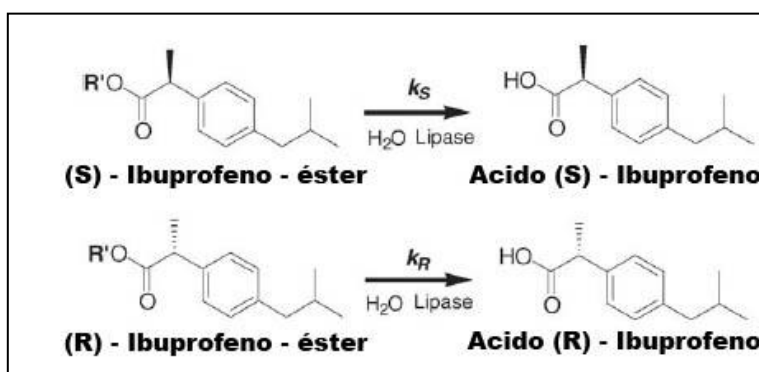


Figura 2.20: Resolução cinética do ibuprofeno éster racêmico via lipase catalisando a reação de hidrólise, R' designa um grupo alquil (Long *et al.*, 2005).

Os objetivos dos autores foram: comparar a hidrólise enzimática de dois diferentes ésteres do ibuprofeno, 1-heptil-ibuprofeno éster e 2-etóxi-ibuprofeno éster (Figura 2.21) e identificar as condições ótimas de operação para a estereoespecificidade da enzima para obter os enantiômeros puros. Como o enantiômero (S) do ácido ibuprofeno tem uma taxa de formação mais rápida do que o enantiômero (R), a forma (S) é transportada através dos poros da membrana até a fase aquosa onde sua solubilidade também é maior do que a do enantiômero (R).

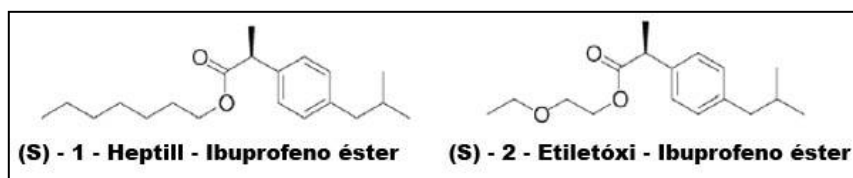


Figura 2.21: Estruturas químicas do (S)-1-heptil-ibuprofeno éster e (S)-2-etóxi-ibuprofeno éster (Long *et al.*, 2005).

O módulo utilizado no trabalho citado foi composto de membranas de poliacrilonitrila contendo lipase de *Candida rugosa* imobilizada através de adsorção hidrofóbica. O substrato orgânico foi mantido escoando pelo lado externo das fibras, e não foi observada passagem para o interior das mesmas em função da sua polaridade e hidrofobicidade, que é molhada pela fase aquosa (a qual escoo no interior das fibras), facilitando assim a permeação do produto, (S)-ibuprofeno ácido, que este é muito solúvel em água e difunde através da membrana até o interior da fibra (Figura 2.22).

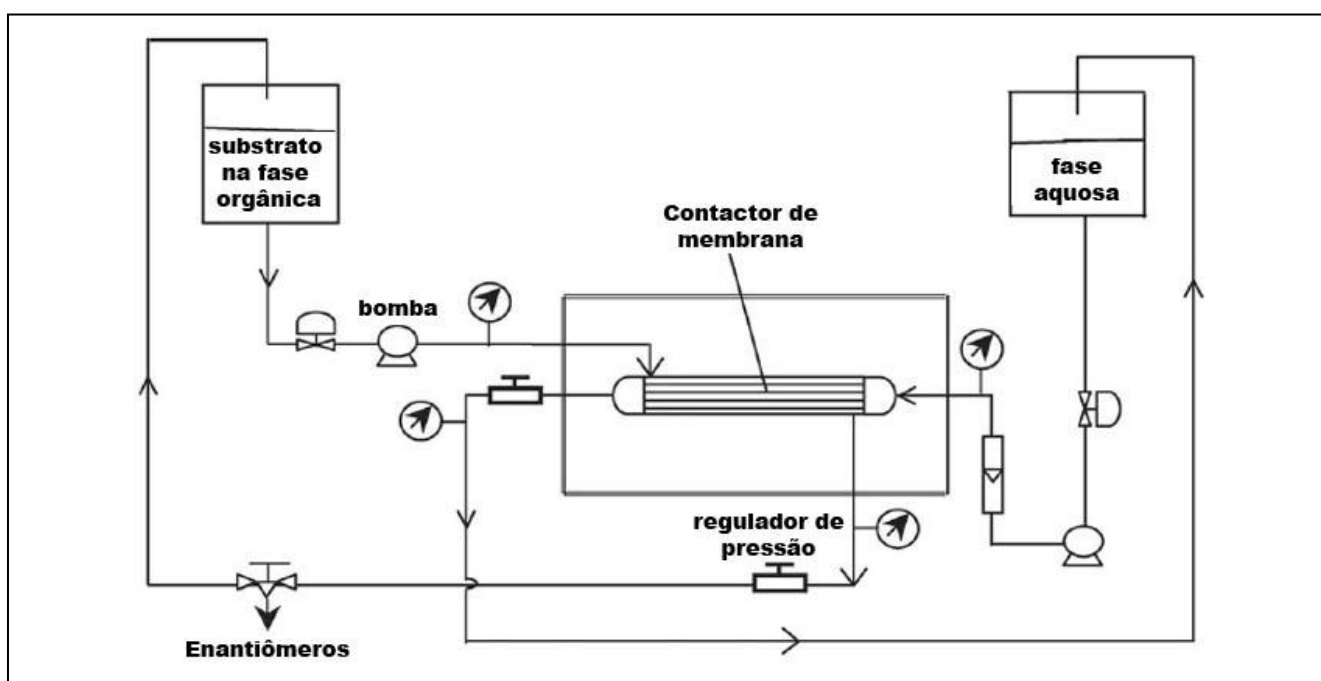


Figura 2.22: Sistema utilizado para separação de misturas racêmicas com um contactor de membranas (Long *et al.*, 2005).

Os autores concluíram que elevadas enantiosseletividades da enzima foram observadas em tampão fosfato com pH = 8 e temperatura de 40°C, além de uma baixa vazão para a fase orgânica. Além disso, o sistema de contactor de membrana contendo

lipase do tipo *C. rugosa* imobilizada foi mais eficiente para a obtenção do ácido (*S*)-etóxietil-ibuprofeno, visto que a atividade desta enzima diminuiu com o aumento da cadeia alifática do álcool.

Ding e col. (1992) demonstraram a extração seletiva de *D*-leucina partir de uma mistura racêmica em água usando uma solução de 1-octanol com *N-N*-dodecil-*L*-hidroxiprolina. Neste caso, os autores utilizaram o sistema como apenas um extrator que foi capaz de conseguir uma separação quase completa dos dois enantiômeros.

Lopez e Madson (1997) utilizaram um contactor de membranas com fibras de poliacrilonitrila a fim de separar o (*R,S*)-*trans*-4metóxi-3-ácido fenilglicídico (MMPG), droga utilizada no tratamento da hipertensão e angina. Assim, primeiramente a enzima de trabalho foi imobilizada nos poros das fibras e a interface foi resultante da imiscibilidade das fases orgânica (substrato em tolueno escoando no lado externo das fibras) e aquosa (solução aquosa de bissulfito de sódio). Os autores concluíram que elevadas enantiosseletividades da enzima foram observadas em tampão fosfato com pH 8 e temperatura de 40°C, além de uma baixa vazão para a fase orgânica. Além disso, o sistema de contactor de membrana contendo lipase do tipo *Candida. rugosa* imobilizada foi mais eficiente para a obtenção do ácido (*S*)-etóxietil-ibuprofeno, visto que a atividade desta enzima diminuiu com o aumento da cadeia alifática do álcool.

Trusek-Holownia e Noworyta (2004) avaliaram em seu trabalho a influência da camada formada pela enzima imobilizada na membrana, e como ela influenciou a transferência de massa, através do coeficiente global e dos individuais de transferência de massa. Neste trabalho um contactor de membranas planas foi escolhido apenas para facilitar o estudo, já que como discutido acima as equações ficam simplificadas.

Wang e col. (2007) utilizaram um contactor de membranas na forma de fibras ocas a fim de separar o (*R,S*) ibuprofeno através de uma reação de hidrólise. Neste caso, os autores utilizaram uma membrana especial composta de acetato de celulose hidrofílico (CA) e politetrafluoretileno hidrofóbico (PTFE) contendo lipase de *Candida rugosa* imobilizada na camada hidrofóbica da membrana. Segundo os autores os aspectos relevantes foram: a atividade lipásica que apresentou aproximadamente 100% de retenção de atividade; enantiosseletividade que foi avaliada através do *E*, que neste caso variou entre 9,4 e 10,9; e a estabilidade que foi avaliada através do tempo de meia vida, obtendo-se 373% maior para a lipase imobilizada em relação à lipase liofilizada.

CAPÍTULO 3

Material e métodos

3.1. Material

As lipases *Pseudomonas cepacia* (Amano PS), *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Aspergillus niger* (Amano A), *Candida rugosa* (Amano AY) e *Rhizopus oryzae* (Amano F) foram adquiridas da Sigma Chemical Co (St. Louis, USA), Novozyme 435, CAL-B e Lipozyme 100TL foram cedidas pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca).

Os substratos butirato de p-nitrofenila (pNPB), (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol, bem como os substratos R e S purificados foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Os substratos derivados do álcool (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol, ou seja, acetato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno e octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno foram preparados no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) no Laboratório do Professor Alessandro Bolis Costa Simas. Os solventes: NMP (N-metil-2-pirrolidona), hexano, acetato de etila, tolueno, acetonitrila, decano, iso-octano, heptano, etanol, ácido clorídrico e glutaraldeído foram comprados da Vetec Química Fina Ltda. Os reagentes sólidos, a saber, nitrato de lítio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico também foram comprados na Vetec Química Fina Ltda. PVP (Polivinilpirrolidona) K10 e K90 foram adquiridos da Fluka Chemica Co e a poli(éter imida) (PEI) foi fornecida pela General Electric. As membranas de nylon 6,6 e de polipropileno (PP) foram adquiridas da Pall Corporation. A Figura 3.1 representa as estruturas dos polímeros que foram utilizados no decorrer da tese. Polipropileno microporoso (Accurel MP 1000) foi comprado da Uderlining Performance.

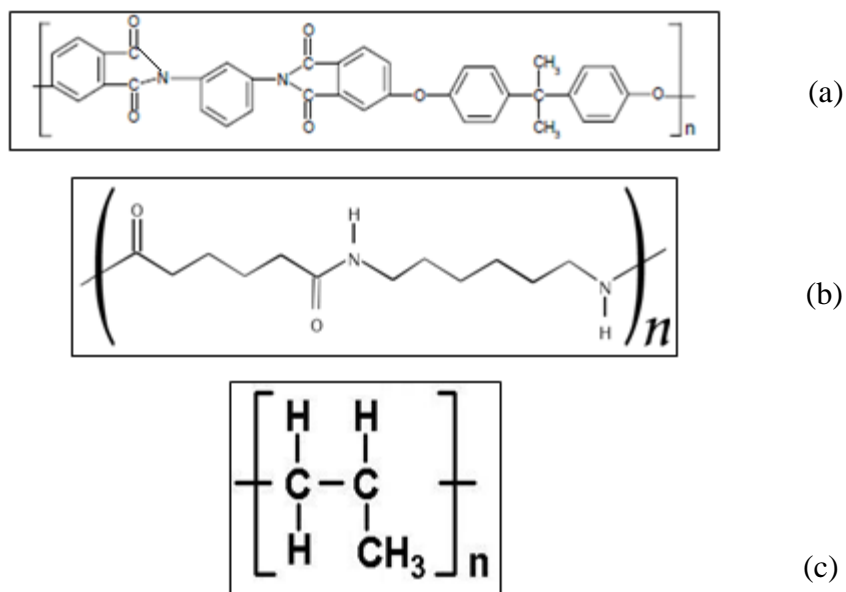


Figura 3.1: Estruturas dos polímeros usados para preparar as membranas, (a) PEI, (b) Nylon 6,6 e (c) PP.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo das soluções poliméricas de poli(éter-imida) (PEI)

As soluções (15% m/m) foram preparadas pesando-se por adição o polímero (seco a 60°C por no mínimo 24 horas) e com o auxílio de uma proveta o NMP em um erlenmeyer de vidro com tampa esmerilhada. Após a pesagem do PEI e do NMP, o erlenmeyer foi fechado e vedado com Parafilm®, sendo a mistura resultante submetida à agitação magnética e com aquecimento constante (70°C) até a total solubilização, a qual ocorreu em aproximadamente 24 horas. A solução obtida foi colocada em repouso por um dia, para garantir a total eliminação das bolhas de ar formadas durante a agitação. Após a solubilização adicionou-se o aditivo (nitrato de lítio ou PVP, ambos deixados em estufa a 60°C) para auxiliar na formação da estrutura da membrana. As soluções poliméricas, após dissolução completa do aditivo foram deixadas em repouso a fim de eliminar as bolhas ainda presentes em virtude da agitação vigorosa da solução polimérica viscosa.

3.2.2. Preparo de membranas planas por espalhamento simples

Após a dissolução do aditivo, a solução foi espalhada sob uma placa de vidro (17 x 11cm) previamente lavada, seca e isenta de material aderido, com o auxílio de uma faca de espalhamento (0,15mm de espessura em aço inoxidável). Após a etapa de espalhamento, o filme polimérico foi exposto ao ambiente (umidade relativa entre 62 e 78 % a 25 °C) por 4 minutos e em seguida, imerso no banho de precipitação de água até desprendimento total da membrana da placa.

Lavagens consecutivas em estufa a 50°C por 24 horas foram efetuadas para remoção do solvente e aditivos residuais na matriz polimérica. Então, as membranas foram submetidas à troca de solvente, a fim de evitar colapso nos poros, em função da elevada tensão superficial da água. Assim, as membranas foram transferidas inicialmente para um banho contendo etanol, onde permaneceram por cerca de 2 horas, e em seguida para um contendo hexano (menor tensão superficial), onde permaneceram imersas por mais um período de, no mínimo, duas horas. Somente após a troca de solvente pode-se secar e armazenar as membranas geradas. A Figura 3.2 representa o processo descrito acima.

Na maior parte das preparações foram utilizados 5% de aditivo, nitrato de lítio e/ou PVP K90, entretanto testou-se também o PVP K10.

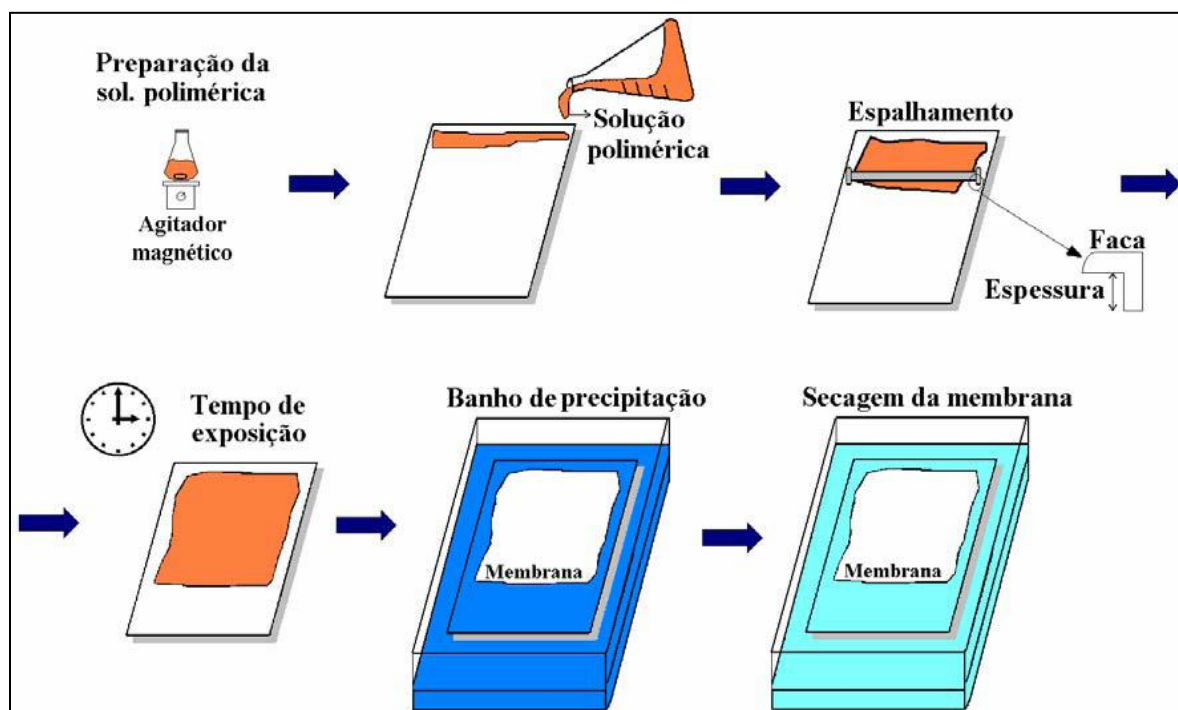


Figura 3.2: Representação esquemática da preparação de membranas planas.

3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Todas as membranas planas de camada simples, além do suporte microporoso de polipropileno, foram caracterizadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV), tendo-se utilizado os microscópios da marca Jeol, modelos JSM 5300 ou 5310. Antes de serem caracterizadas por MEV, as amostras das membranas secas pela técnica de troca de não-solvente foram quebradas em nitrogênio líquido. O congelamento rápido da membrana facilita a fratura e evita uma deformação dos poros da seção transversal. As amostras fraturadas foram colocadas em suportes metálicos e cobertas com uma espessura de aproximadamente 300Å de ouro, num metalizador da Jeol, modelo JFC 1500. Na análise das membranas planas foram observadas as seguintes regiões: a seção transversal (ST) e a área específica (AS).

3.2.4. Determinação da área específica

3.2.4.1. Isoterma de BET

Suporte microporoso de polipropileno foi submetido ao teste de determinação de área específica através do método de BET, utilizando o nitrogênio como molécula sonda. A determinação das propriedades texturais dos suportes foi feita através da técnica de isotermas de adsorção/dessorção de N₂ a -196°C, em equipamento Micromeritics ASAP (Accelerated Surface Area and Porosimetry) modelo 2000. A amostra foi pré-tratada a vácuo a uma temperatura de 100°C, por 2 horas.

3.2.4.2. Picnometria

Por serem menos porosas que um suporte microporoso, microporos de polipropileno, por exemplo, as áreas específicas das membranas não puderam ser determinadas pelo método de BET, já que valores abaixo do limite de detecção do aparelho foram obtidos. Assim, as áreas específicas destes materiais foram calculadas através de um método indireto, picnometria. Este método pode ser dividido em duas etapas:

3.2.4.2.1. Volume total do sólido (matriz e poros)

Pesou-se o picnômetro vazio ($m_{pic.}$), cujo volume era de 50 mL ($V_{pic.}$), e em seguida o mesmo com uma determinada massa de membrana (m_1 , onde m_1 é a massa do picnômetro vazio com a membrana pesada), assim por diferença determinou-se a massa de suporte testada ($m_m = m_1 - m_{pic.}$). Em seguida completou-se o sistema com o líquido de Culter e o mesmo foi pesado. Entretanto é necessário um tempo de preenchimento, ou seja, tempo para o líquido penetrar completamente no material mais poroso, logo, após este tempo foi necessário completar novamente o picnômetro com o líquido de Culter obtendo-se, desta forma, a massa total do sistema após 3 horas (m_T). Para a determinação da densidade total de sólidos foi necessário também o conhecimento da massa de líquido que ocupam os 50mL do picnômetro, assim com a densidade de

1,93g/cm³(ρ_L) a 26 °C, obteve-se uma massa de 96,62g (mL) de líquido de Culter no picnômetro vazio. A equação 3.1 foi utilizada para calcular a densidade do sólido total (ρ_s : [g de membrana/ cm³]).

$$\rho_s = \frac{m_m}{m_L - (m_T - m_1)} \cdot \rho_L \quad \text{Eq. 3.1}$$

A equação 3.2 representa o cálculo do volume específico total (cm³/g de membrana), valor que deve ser utilizado na determinação da área superficial.

$$V_s = \frac{1}{\rho_s} \quad \text{Eq.3.2}$$

3.2.4.2.2. Volume total da matriz

A matriz representa somente a parte densa da membrana (VM) e, neste caso, foram utilizadas as mesmas equações acima definidas, entretanto, o líquido utilizado nos testes foi o mercúrio (Hg), já que, por apresentar uma elevada tensão superficial não penetrou nos poros do material. Definiu-se inicialmente que 50mL do picnômetro era ocupado por cerca de 677mL de Hg com densidade de 13,6 g/cm³.

A diferença entre o volume específico total (VS) e o volume da matriz (VM) forneceu o valor do volume poroso do suporte (VP) e, este valor foi utilizado posteriormente na determinação da área específica dos suportes.

3.2.4.2.3. Determinação do raio médio (RMP) dos poros e área específica

Através da fotomicrografia de cada material foi possível determinar através de uma ferramenta do MEV o diâmetro de cada poro do material. Esta determinação foi aleatória e diferentes poros foram escolhidos, dos quais se obteve uma média aritmética. A equação 3.3 representa o cálculo da área específica estimada através do método de picnometria.

$$A_S = \frac{2.V_P}{R_{MP}}$$

Eq.3.3

3.2.5. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

As análises de infravermelho foram conduzidas em um espectrômetro FTIR da Perkin-Elmer, modelo Spectrum 100, utilizando refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram analisados na região de 5.000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando em média 16 varreduras para cada amostra. As análises de FTIR permitiram avaliar a diferença estrutural entre as amostras, antes e após a imobilização enzimática.

3.2.6. Termogravimetria (TG)

As curvas de TG das amostras foram obtidas em um analisador termogravimétrico da Perkin-Elmer, modelo TGA. A amostra (aproximadamente 5 mg) foi colocada em uma cápsula de platina e submetida a aquecimento na razão de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio, no intervalo de temperatura de 50 a 900°C. O acompanhamento da perda de massa com a temperatura possibilitou avaliar as mudanças ocorridas na degradação térmica de cada amostra.

3.2.7. Imobilização via adsorção hidrofóbica

3.2.7.1. Preparo dos suportes

As membranas de PEI com diferentes concentrações de nitrato de lítio e PVP, bem como as membranas de nylon e polipropileno foram cortadas na forma de quadrados com aproximadamente 2 x 2mm de comprimento a fim de gerar maior área específica para a imobilização. No caso do accurel não houve tal necessidade, pois o suporte já se apresentava na forma adequada para os experimentos.

Todos os suportes foram submetidos a uma etapa de pré-tratamento, a fim de diminuir a tensão superficial dos poros e permitir a entrada da solução aquosa por toda a extensão do suporte. Assim, primeiramente 50mg dos diversos suportes foram imersos em 1 mL etanol por aproximadamente 30 minutos e depois, com posterior remoção do solvente, mais 30 minutos em 1 mL de água. Além disso, a fim de evitar a presença de etanol residual durante o processo de imobilização, os suportes foram lavados 3 vezes consecutivas com água destilada.

3.2.7.2. Imobilização

Após o processo de hidratação e remoção completa do etanol, ao suporte foram adicionados 500µl de solução enzimática em diferentes concentrações. A mistura permaneceu em contato por 24 horas a 4°C em sistema sob constante agitação (200rpm). O processo de imobilização foi acompanhado pela determinação da atividade hidrolítica com p-NFB do suporte e do sobrenadante.

3.2.7.3. Dosagem de atividade hidrolítica por método espectrofotométrico

Esta atividade baseia-se na formação de um produto cromóforo, p-nitro fenol, a partir da hidrólise de uma solução de butirato de p- nitrofenila (p-NFB) catalisada pelas lipases. As reações foram conduzidas a 30°C e iniciadas pela adição de 25µL de uma solução 25mM de p-NFB ao sistema reacional composto de 50mg de suporte seco (após o processo de imobilização) ou 25µL das soluções enzimáticas inicial (antes do processo de imobilização) e final (depois do processo de imobilização) juntamente com 2,3mL de tampão fosfato de sódio 20mM. O progresso das reações foi acompanhado em espectrofotômetro com leituras de absorbância a 412nm. Uma unidade internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a hidrólise de um micromol de p-NPB por minuto nas condições do ensaio.

O cálculo da atividade foi realizado utilizando-se a equação 3.4:

$$A = \frac{(Abs / \text{min}) V_{final}}{f \cdot V_{am}}$$

Eq. 3.4

Onde:

A = atividade lipásica (UI/mL) ou (UI/g)

V_{final} = volume final de meio reacional (mL)

V_{am} = volume de amostra (mL) ou massa de enzima imobilizada (mg)

f = 0,1293 mM/Abs (fator obtido na curva de calibração de p-nitro fenol)

3.2.8. Imobilização via ligação covalente

3.2.8.1. Ativação dos suportes com glutaraldeído

Inicialmente 50mg dos suportes, com exceção do polipropileno, foram pesados e deixados em contato com metanol a 50°C por cerca de 20 min e em seguida foram tratados com ácido clorídrico 9M a 40 °C por 40 min conforme metodologia descrita por Bruno e col. (2004). Na etapa posterior, os suportes foram lavados e postos em contato com uma solução 2,5% de glutaraldeído por 1h a temperatura ambiente e após o processo os suportes foram exaustivamente lavados.

3.2.8.2. Imobilização

Finalizada a etapa de ativação dos suportes, aos mesmos foram adicionadas soluções enzimáticas em diferentes concentrações assim como na imobilização por adsorção hidrofóbica, inclusive utilizando-se as mesmas condições de agitação e temperatura. Após o processo de imobilização efetuaram-se as mesmas dosagens do processo *via* adsorção hidrofóbica.

3.2.8.2.1. Cálculo dos parâmetros de imobilização

O processo de imobilização foi acompanhado pela determinação da atividade hidrolítica com p-NPB das soluções enzimáticas antes e após o processo de

imobilização em tempos determinados. Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com as equações a seguir:

A eficiência de imobilização (E_{imo}) foi calculada pela equação (3.5):

$$E_{imo} (\%) = \frac{U_{Teo} \cdot 100}{U_c}$$

Eq. 3.5

Em relação à eficiência de imobilização, pode-se afirmar que este parâmetro é um indicativo da quantidade de proteína adsorvida no suporte, e durante a seleção de uma metodologia de imobilização não deve ser o parâmetro mais importante a ser considerado, visto que se pode ter um suporte onde a eficiência de imobilização seja alta, entretanto, a atividade da enzima imobilizada tenha sido perdida, em virtude de diversos fatores, tais como: perda da conformação original da proteína, oclusão do sítio ativo, impedimento estérico, limitações difusionais, sendo este último, mais importante, para o caso do suporte ser uma membrana polimérica.

O rendimento de imobilização em atividade (η) calculado pela equação (3.6)

$$\eta(\%) = \frac{U_{imo} \cdot 100}{U_c}$$

Eq. 3.6

A retenção de atividade (R_a) foi calculada pela equação (3.7):

$$R_a (\%) = \frac{U_{imo} \cdot 100}{U_{Teo}}$$

Eq. 3.7

Onde:

U_{imo} = unidades de enzima real imobilizada

U_c = unidades totais de enzima que são colocadas na etapa de imobilização.

U_s = unidades de enzima que não reagiram com o suporte e que saíram nas primeiras lavagens.

$U_{Teo} = (U_c - U_s)$ unidades de enzima teoricamente imobilizada.

Em relação ao rendimento de imobilização e à retenção de atividade, observa-se que ambos os parâmetros dependem da atividade real do suporte, logo, ambos podem ser maior que 100%, em virtude de fenômenos associados a hiperativação da enzima.

O rendimento de imobilização fornece uma idéia da quantidade de atividade “aproveitada” pelo suporte quando comparada à solução de entrada.

Já a retenção de atividade é um parâmetro que traduz a retenção, perda ou desativação da atividade da enzima imobilizada, visto que, a sua definição é a razão da atividade real imobilizada sobre a atividade teórica.

3.2.9. Dosagem de proteínas

A dosagem do teor de proteínas foi realizada segundo metodologia estabelecida por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.2.10. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As enzimas foram analisadas por SDS-PAGE utilizando o método segundo Laemmli (1970) em uma unidade de eletroforese SE 250-Mighty Small II (Hoefer Co.) usando gel de 12% poliacrilamida na zona de separação de 9 cm × 6 cm e na zona de concentração 5% poliacrilamida. Os géis foram revelados pelo método de Coomassie blue.

3.2.11. Resolução dos derivados do (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol

Na forma racêmica o (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol não apresenta muitas aplicações, assim é necessário separá-lo em seus enantiômeros puros (Hof e Kellog, 1996; Fai Liu, 1999). Primeiramente foi necessário verificar qual dos enantiômeros era o mais útil à síntese de substâncias bioativas, neste caso o S-1,2-O-isopropilideno. No caso específico deste substrato, o antípoda ótico não causa efeitos deletérios, entretanto é o S-1,2-O-isopropilideno glicerol que pode ser utilizado como sinton quiral para a síntese de diglicerios, glicertil fosfatos e muitos outros compostos biologicamente

ativos, tais como fosfolípidos, fatores de agregação plaquetária, β - adrenoceptores, dentre outros (Fai Liu, 1999).

Inicialmente foram testados diferentes substratos derivados deste álcool, a saber, acetato de (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno e octanoato de (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno, além do éster proveniente da reação do álcool com o tolueno.

Na etapa inicial dos estudos com este substrato todos os experimentos de hidrólise enzimática foram conduzidos em batelada em frascos fechados, termostatizados a 35°C e agitados a 250 rpm. Em alguns meios reacionais, optou-se em se fazer a extração do álcool diretamente para uma fase aquosa, sistema bifásico. Assim, utilizou-se 3mL de tampão fosfato (50mM e pH = 7,0) juntamente com 3 mL do solvente testado. Além desta metodologia, investigou-se também o sistema monofásico. Neste caso, os solventes escolhidos foram submetidos a um processo de hidratação com água destilada. A quantidade de substrato usada em todos os experimentos foi a mesma, ou seja, 10 μ L e as reações foram inicializadas pela adição de 0,05g de enzima. As Figuras 3.3 e 3.4 representam o esquema reacional esperado para hidrólise dos diferentes substratos testados.

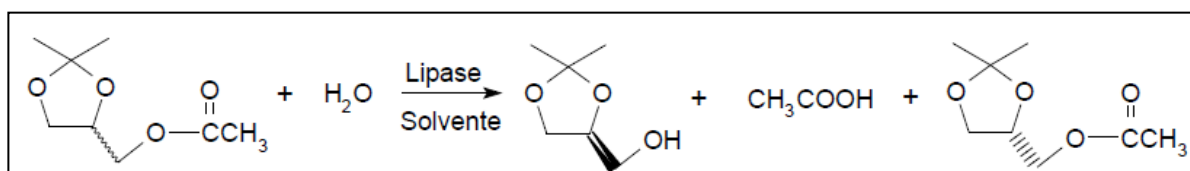


Figura 3.3: Reação de hidrólise do acetato de (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno.

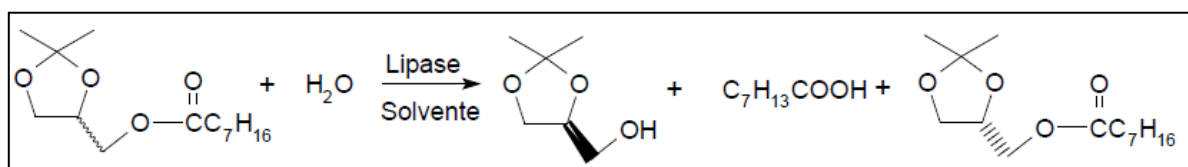


Figura 3.4: Reação de hidrólise do octanoato de (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno.

O excesso enantiomérico do (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno glicerol foi determinado através de Cromatografia gasosa (CG) em um cromatógrafo gasoso CHROMPACK CP 9000 equipado com coluna quiral, nas seguintes condições cromatográficas: coluna Hydrodex®- β -6TBDM, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 280°C, temperatura inicial: 100°C por 1 minuto, taxa de aquecimento 1: 2°C/min até 106°C, taxa de aquecimento 2: 40°C/min até 160°C, taxa de aquecimento 3: 1°C/min até 165°C. Durante 15 min o sistema foi mantido a 165 °C.

O excesso enantiomérico do produto ($ee(P)$) foi determinado através da equação 3.8:

$$ee(P) = \frac{(P_1 - P_2)}{(P_1 + P_2)} \quad \text{Eq. 3.8}$$

Onde, P_1 e P_2 são as áreas dos cromatogramas dos isômeros R e S no produto formado.

Já o excesso enantiomérico do substrato ($ee(S)$) foi determinado pela equação 3.9:

$$ee(S) = \frac{(S_1 - S_2)}{(S_1 + S_2)} \quad \text{Eq.3.9}$$

S_1 e S_2 são as áreas dos cromatogramas dos isômeros R e S no substrato residual.

A razão enantiomérica foi determinada pela equação 3.10 de acordo com Chen e col. (1982):

$$E = \frac{\ln((1-c)(1-ee(S)))}{\ln((1-c)(1+ee(S)))} \quad \text{Eq. 3.10}$$

Onde: c é a extensão da conversão.

Definidas as condições reacionais, propôs-se inicialmente um reator contendo dois compartimentos, um para cada fase, onde o contato entre ambos era efetuado via uma interface criada por uma membrana de 5 cm de diâmetro. Os estudos iniciais foram desenvolvidos neste sistema a fim de se determinar as melhores condições reacionais do sistema contendo maior área de membrana, além de recirculação das fases, favorecendo a transferência de massa. Assim, em cada compartimento era adicionado cerca de 140 mL de cada fase, solvente e tampão, e tanto o (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol puro quanto o éster que estavam sendo estudados foram usados em concentrações em torno de 4,8 mM. Ambos eram adicionados a fase orgânica. Por meio de cromatografia gasosa acompanhava-se a migração do álcool para fase aquosa. A Figura 3.5 representa o esquema de funcionamento deste sistema com maior volume.

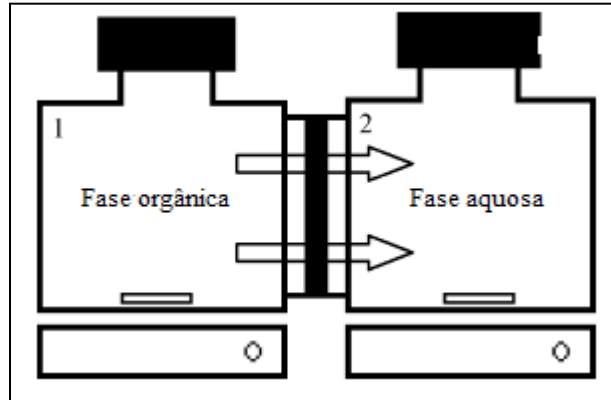


Figura 3.5: Sistema de transferência de massa da fase orgânica para fase aquosa.

Após a determinação dos parâmetros necessários para o dimensionamento do sistema de membranas planas de nylon com recirculação das fases orgânica e aquosa. A Figura 3.6 representa o sistema de membranas planas desenvolvido para contactar de forma não dispersiva as fases orgânica e aquosa.

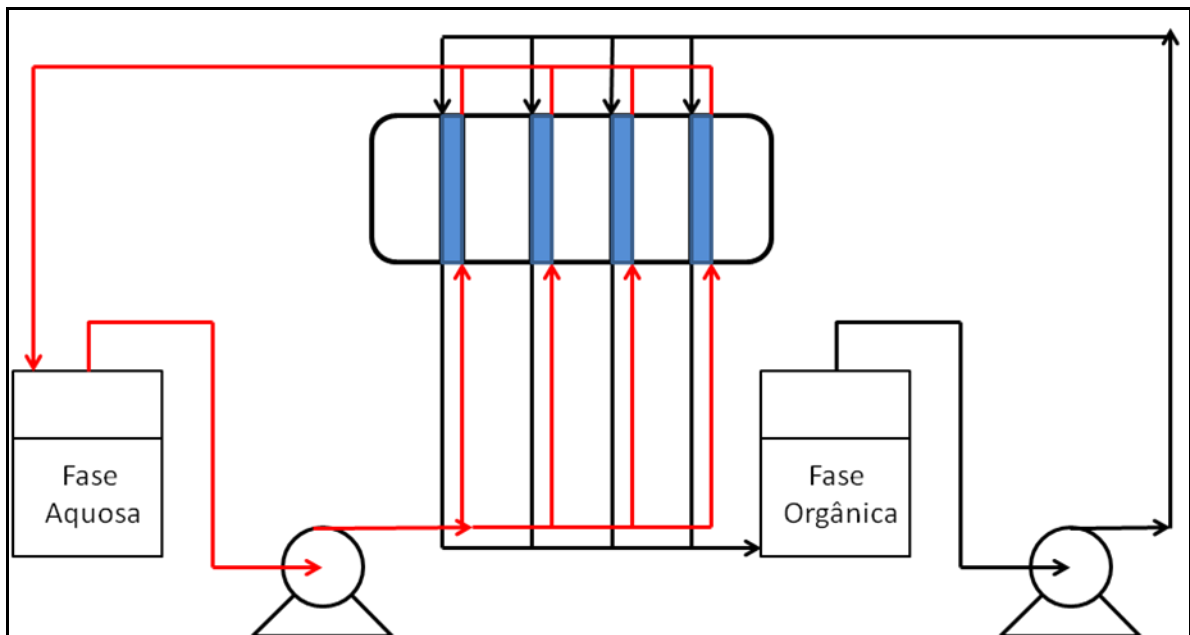


Figura 3.6: Sistema de recirculação com contactor de membrana plana.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

4.1. Reações enzimáticas enantiosseletivas

4.1.1. Resolução dos ésteres derivados do (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol

A partir do (R,S)-1,2-O-isopropilideno-glicerol (IPG) foram sintetizados dois diferentes ésteres com hidrofobicidades distintas, a saber: acetato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno e octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno que foram submetidos à reação de hidrólise catalisada pelas lipases provenientes de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) e *Candida antarctica* fração B (Novozyme 435), esta última imobilizada em resina acrílica. Além disso, foram utilizados como solventes hexano ($\text{Log } P = 3,5$) e acetato de etila ($\text{Log } P = 0,7$) e o tempo de reação foi fixado em 2 horas, visto que foi possível obter maior estereosseletividade, ou seja, elevados valores de excessos enantioméricos.

Nesta etapa os ésteres foram utilizados na concentração de 4.1 mM com 9 U de atividade enzimática colocada em um volume reacional de 6mL (1:1 água e solvente orgânico). As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam as conversões e os excessos gerados (equações na página 73) para os substratos testados. É importante ressaltar que há preferência pela formação do (S)-IPG em todos os ensaios.

Tabela 4.1: Hidrólise dos ésteres derivados do IPG catalisado pela lipase Novozyme 435.

Substrato	Solvente	X (%)	ee (P) (%)	ee (S) (%)
Acetato de (R,S)-isopropilideno	Hexano	50	0,4	0,4
Octanoato de (R,S)-isopropilideno	Hexano	30,4	5,1	2,6
Acetato de (R,S)-isopropilideno	Acetato de etila	8,8	4,3	30
Octanoato de (R,S)-isopropilideno	Acetato de etila	6,6	5,8	0,41

Tabela 4.2: Hidrólise dos ésteres derivados do IPG catalisado pela lipase Amano AK.

Substrato	Solvente	X (%)	ee (P) (%)	ee (S) (%)
Acetato de (R,S)-isopropilideno	Hexano	11	23	4,2
Octanoato de (R,S)-isopropilideno	Hexano	50	28	28
Acetato de (R,S)-isopropilideno	Acetato de etila	16	2,3	0,4
Octanoato de (R,S)-isopropilideno	Acetato de etila	5,6	99	5,9

Sabe-se que muitas lipases apresentam elevada enantiosseletividade para álcoois secundários ou seus respectivos ésteres, entretanto baixos valores para este parâmetro são obtidos quando se utiliza substratos primários, como o (R,S)-IPG, por exemplo. Poucas lipases demonstram alguma enantiopreferência para álcoois primários e normalmente a enantiosseletividade é de baixa a moderada (Mezzetti *et al.*, 2003).

A escolha inicial pela utilização da Novozyme 435 de *Candida antarctica* se refere ao fato desta enzima comercial ser muito conhecida e utilizada na literatura para resolução de diversos racematos. Entretanto, segundo as Tabelas 4.1 e 4.2 é possível verificar que apesar de apresentar conversões razoáveis no solvente mais hidrofóbico (hexano), a enzima foi incapaz de diferenciar enantiosseletivamente os ésteres derivados do IPG.

Já a Amano AK, lipase de *Pseudomonas fluorescens* demonstrou ser mais enantiosseletiva quando submetida às mesmas condições reacionais. Na reação com o octanoato de (R,S)-IPG em acetato de etila, apesar da baixa conversão (5,6 %) foi alcançado elevado valor de ee(P), em torno de 99%, indicando que de fato é possível obter o produto ((S)-IPG) de forma pura..

Alguns autores já avaliaram (Mezzetti *et al.*, 2003; Koskinen *et al.*, 1996) a influência do tamanho da cadeia carbônica do éster na enantiosseletividade da enzima,

segundo estes, o tamanho da cadeia do éster influencia o tipo de estrutura (enzima-éster), gerada no estado de transição, responsável pela enantiosseletividade da enzima.

Miyazawa e col. (2001) aperfeiçoaram o processo de esterificação enantiosseletiva do 2-fenóxi-1-propanol com a lipase proveniente de *Achromobacter sp.*, denominada comercialmente por AL. Segundo os autores houve um aumento de cerca de 15% no valor de E quando se utilizou o propionato ao invés do trifluoracetato de vinila como substrato. Além disso, os valores de ee(S) gerados foram 2% para o éster trifluoracetato de vinila e 78% para o propionato de vinila. É importante mencionar que, além do aumento da cadeia em relação ao carbono, há a introdução de flúor na molécula de um dos ésteres testados, o que pode também gerar essa elevada diferença nos valores mencionados acima. Ainda segundo os autores, os ésteres de maior cadeia serviram como melhores doadores acila, provavelmente em função da maior afinidade das lipases por ésteres de maior cadeia carbônica.

Liu e col. (2001) mostraram que a enzima de *Bacillus thermocatenuanatus* apresentou maior enantiosseletividade por substratos menores, ou seja, o valor de E foi 69% mais elevado quando utilizou-se o butirato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno comparativamente ao octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno na reação de hidrólise enzimática. Por outro lado, os autores mostraram que tanto com acetato quanto com butanoato de vinila, valores maiores que 100 foram encontrados para a razão enantiomérica da mesma enzima catalisando reações de esterificação com o (R,S)-1-feniletanol.

Molinari e col. (2004) realizaram em seu trabalho uma série de reações de hidrólise, catalisadas por células de *Streptomyces sp* liofilizadas, com diversos ésteres derivados do IPG. Os autores verificaram que o crescimento da cadeia do éster favoreceu um aumento no valor do ee(P), entretanto esse aumento não foi linear, já que passou de 28% (acetato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno) para 50% (butirato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno) diminuindo para 25% (heptanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno) mantendo uma conversão de 33% em aproximadamente 6 horas. Segundo os autores os piores resultados (ee(P) < 5% e X = 35%) foram obtidos quando o benzoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno foi utilizado como substrato.

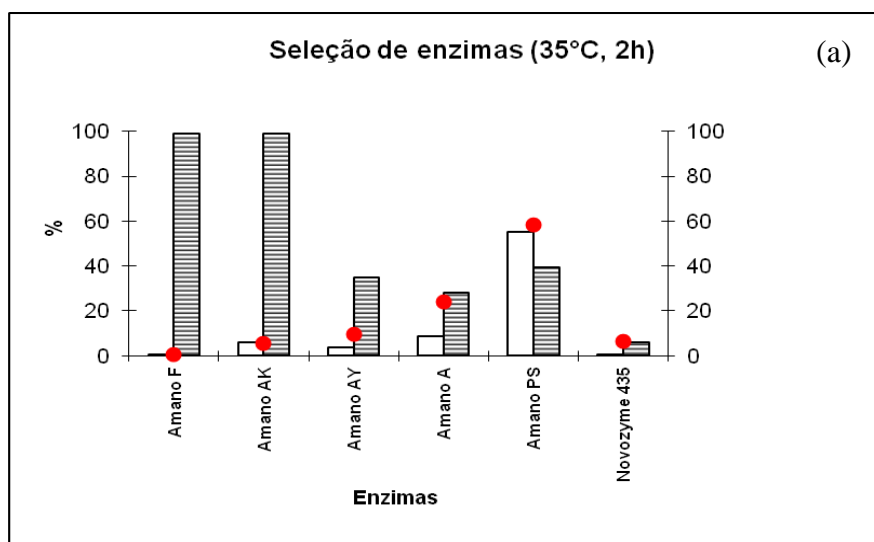
Neste trabalho, o benzoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno também foi testado e assim como no trabalho de Molinari e col. (2004), e baixas conversões (30%) e ee(P) (< 3%) foram obtidos. O fato de se ter um grupamento benzoila pode causar algum tipo

de dificuldade ao reconhecimento do substrato pela enzima, com reflexos sobre a enantiosseletividade.

Além do tamanho da cadeia carbônica do substrato, a atividade enzimática é dependente da quantidade de água associada à enzima, e, em menor grau, da quantidade de água contida em todo sistema. Assim, solventes hidrofílicos (baixos valores de $\text{Log}(P)$) podem desativar enzimas pela remoção de moléculas de água aderidas a sua estrutura que seriam essenciais para manutenção da atividade catalítica (Koskinen e Klibanov, 1996). Entretanto, diferentes lipases apresentam comportamentos distintos em relação ao tipo de solvente utilizado na reação. No caso da lipase Amano AK (Tabela 4.2) apesar da taxa de hidrólise ser maior com hexano, foi em acetato de etila que houve diferenciação do substrato, (S)-IPG.

4.1.1.1. Seleção de enzimas

Definido o substrato, uma etapa de seleção de biocatalisadores foi realizada com acetato etila como solvente. Inicialmente foram utilizadas 50mg de enzima no meio reacional não levando em consideração a atividade específica de cada uma, já que a intenção nesta etapa era somente identificar qual das enzimas seria capaz de hidrolisar enantiosseletivamente o éster testado. Assim, definida a enzima, testes de caracterização foram efetuados a fim de padronizar os ensaios em relação à atividade enzimática colocada. A Figura 4.1 representa os ensaios de hidrólise efetuados a 35°C com retirada de amostras em 2 horas (a) e 24 horas (b).



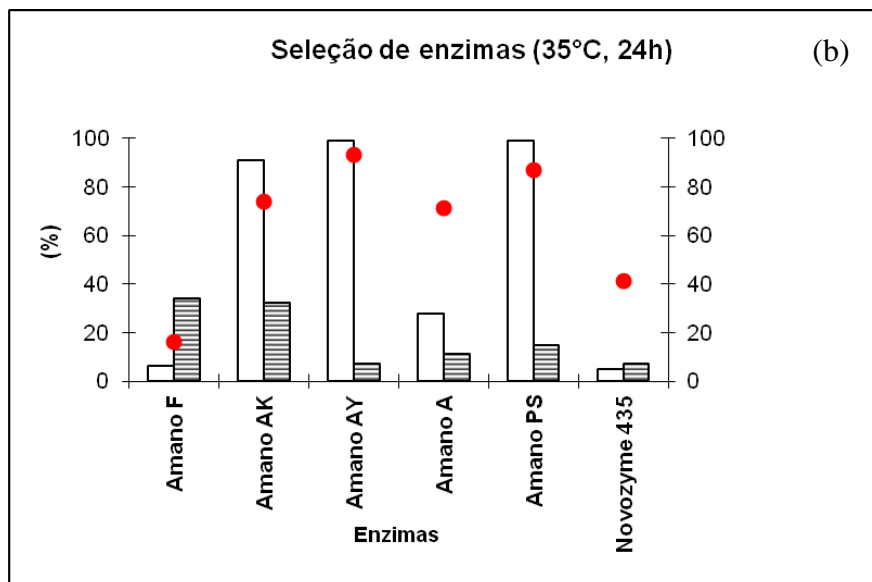


Figura 4.1: X (%) (●), ee(S) (□) e ee(P) (▨) nas reações de hidrólise do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) catalisada por diferentes lipases (50 mg) a 35°C em acetato de etila em (a) 2 horas e (b) 24h de reação.

As Figuras 4.1 (a) e (b) mostram que é possível obter-se tanto o éster (elevadas conversões) quanto o álcool (baixas conversões) com elevado grau de enantio pureza. Em 24 horas de reação elevadas conversões foram obtidas para as enzimas Amano AY (93,4 %) e Amano PS (86,9 %) e em 48 horas de reação conversões de 100% foram obtidas com ambas as enzimas.

No caso da lipase Amano F de *Rhizopus oryzae*, a baixa conversão (em torno de 4%) e o elevado excesso enantiomérico (> 99%) em 2h de reação (Figura 4.1(a)) levaram a um valor da razão enantiomérica (E) sem significado físico uma vez que valor de conversão (X) obtido foi inferior a 1 %. Entretanto em 24 (Figura 4.1 (b)) e em 48h de reação, a conversão atingiu 16% e 30%, respectivamente, mas com completa perda de enantiosseletividade. Este fenômeno pode ser explicado com base na perda de atividade desta enzima em acetato de etila, já que o mesmo pode estar removendo água necessária para manutenção de atividade. Além disso, está foi a única lipase testada que resultou na obtenção do (R)-IPG.

De uma maneira geral, verificou-se que em 24 horas há uma diminuição drástica do excesso enantiomérico em relação ao produto (ee(P)). Além disso, acima de um determinado valor de conversão, cerca de 15% a lipase passa a não diferenciar mais o substrato, gerando desta forma o álcool também na forma racêmica.

Em tempos superiores, conduzindo-se o processo acima de 24 horas houve um aumento do ee(S), o que mostra que um dos substratos apresenta velocidade específica de consumo maior que o outro, já que é completamente consumido durante a reação. Desta forma, o substrato residual, obtido ao final da reação e caracterizado por apenas um pico mostra que há a possibilidade de obter na forma enantiopura, também, o substrato (octanoato de (R)-1,2-O-isopropilideno).

Além disso, as enzimas comerciais utilizadas neste trabalho são preparados enzimáticos que podem conter outras proteínas, além da de interesse, e podem, portanto, interferir na reação tanto de forma favorável quanto desfavorável. Por apresentar um comportamento mais eficaz na resolução do enantiômero testado (octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno) a lipase proveniente de *Pseudomonas fluorescens* (massa molar igual a 32KDa) foi analisada por meio de um gel de eletroforese (Figura 4.2), a fim de identificar presença de impurezas no preparado enzimático.

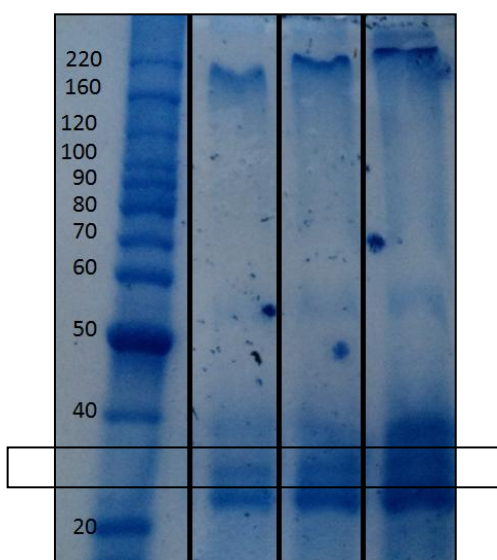


Figura 4.2: Gel de eletroforese da lipase de *Pseudomonas fluorescens*, comercialmente denominada amano AK em diferentes concentrações. Da esquerda para direita: Padrão de massa molar e soluções com a lipase de interesse.

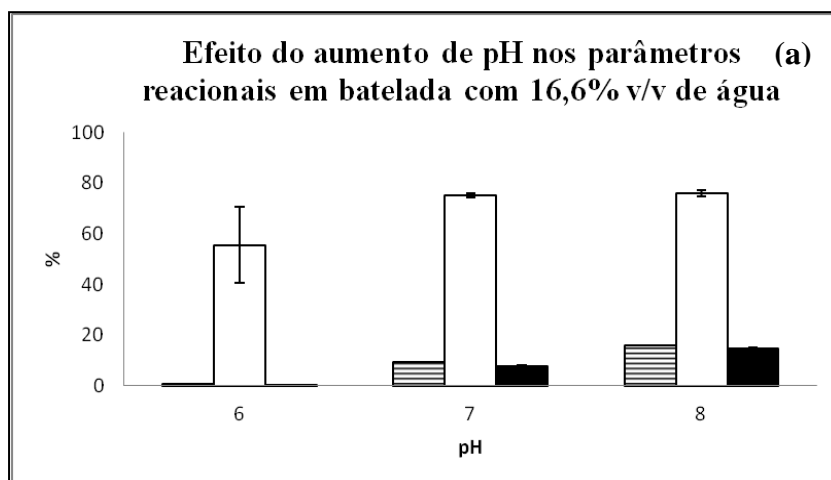
No gel de eletroforese (Figura 4.2) é possível verificar que existem diversas bandas e uma delas é a lipase de interesse enquanto que as demais possivelmente são impurezas do preparado enzimático, neste caso, outras proteínas. Considerando-se todos os efeitos presentes, e comparativos entre si, optou-se então pela escolha da enzima Amano AK, proveniente de *Pseudomonas fluorescens* para a continuidade deste trabalho, já que para baixas (Figura 4.1(a)) e elevadas conversões (Figura 4.1(b)) foram obtidos os enantiômeros (S)-IPG (ee(P) > 99%) e o octanoato de (R)-IPG (ee(S) >99%) com elevada pureza ótica, respectivamente.

4.1.1.2. Efeito do solvente, temperatura, concentração enzimática e pH na resolução enantiomérica do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno

4.1.1.2.1. Efeito do pH e concentração de água no meio reacional

O pH bem como a atividade de água são parâmetros muito importantes na definição do meio reacional mais adequado para uma dada reação enzimática, visto que o estado de ionização da enzima é essencial na biocatálise. Segundo Lima e Angnes (1999) a presença de água é importante porque aumenta a mobilidade e flexibilidade dos sítios ativos e, concomitantemente, a polarização da estrutura proteica, ou seja, manutenção da estrutura tridimensional.

Avaliou-se inicialmente o efeito do pH (faixa entre 6 e 8) e do teor de água (16,6, 50 e 83,3% v/v) em bateladas com volume útil de 6 mL com relação solvente orgânico:água variável. Todos os ensaios foram conduzidos com cerca de 5mg de enzima (massa equivalente a 0,9 U, 10 vezes menor que nos ensaios iniciais de seleção da enzima), concentração de substrato de 5mM e temperatura de 30°C. A Figura 4.3 (a),(b) e (c) apresenta os resultados de X, ee(P) e ee(S) obtidos em 24h de reação, para diferentes teores de água .



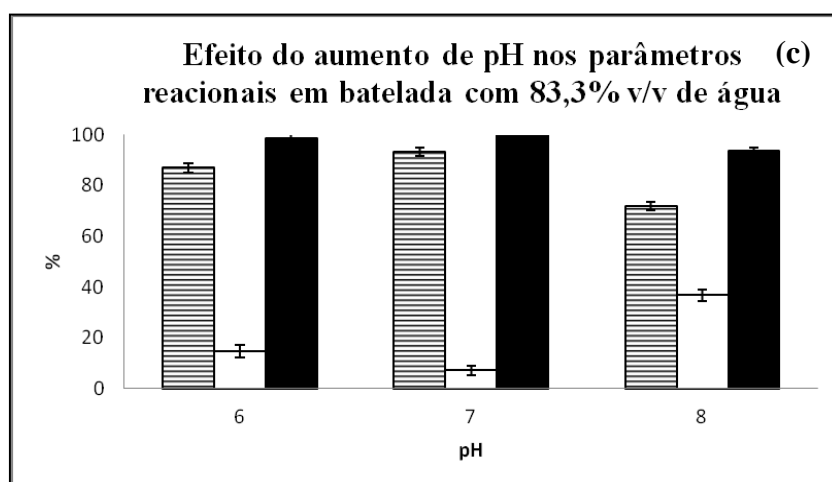
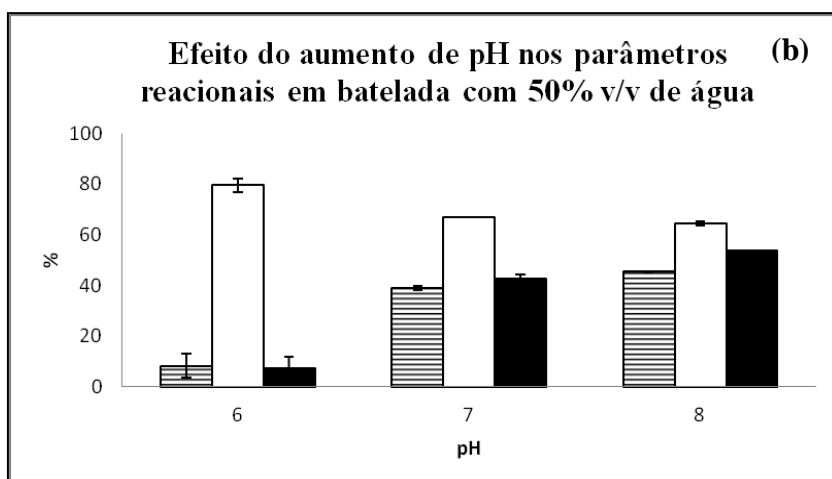


Figura 4.3: Variação de X (%) (▣), ee(S) (■) e ee(P) (▢) em função do pH em bateladas contendo (a) 16,6% ; (b) 50% e (c) 83,3 % v/v de água, nas reações de hidrólise do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM). Todas as reações foram conduzidas em acetato de etila com 0,9 U de atividade enzimática colocada e a 30°C.

O aumento da conversão e do ee(S), independente do pH reacional, está associado com o aumento da atividade de água no meio reacional. Este fato, principalmente em relação a conversão já era esperado por se tratar de uma reação de hidrólise. Entretanto deve-se ressaltar que quantidade de água necessária para um determinado ensaio biocatalítico depende das características de cada enzima, substrato, solvente e a correlação entre eles.

Por outro lado, os valores de ee(P) diminuíram com o aumento da atividade de água no meio reacional, principalmente na condição da Figura 4 (c). Já a Figura 4 (a) e (b) mostram pouca variação no valor de ee(P) indicando que deve haver um limite onde o aumento de água na batelada começa a influenciar negativamente na diferenciação enantiosseletiva em relação ao produto. A diminuição acentuada no valor de ee(P) na batelada com 83,3% v/v de água provavelmente está associada ao aumento da

conversão (velocidade específica de reação elevada). Além desta hipótese, Aires-Barros (2011) descreveu em seu trabalho que a água pode participar de vários mecanismos que podem levar a desnaturação proteica com conseqüente perda de atividade enzimática no meio reacional, dificultando a diferenciação enantiosseletiva.

É conveniente lembrar também que uma quantidade mínima de água é necessária para manutenção da atividade enzimática, já que, além da mesma contribuir para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (Lima e Angnes, 1999; Liu *et al.*, 2001). Provavelmente em concentrações de água inferiores a 6,6% menores valores de conversões seriam obtidos, em função da diminuição da taxa de hidrólise o que ocasionaria, provavelmente, uma maior diferenciação pela lipase, ou seja, aumento de ee(P). Entretanto, é importante analisar cada caso individualmente, pois com uma maior quantidade de água (Figura 4.3) é possível obter elevados valores de ee(P) associados com altas conversões, e desta forma, o tempo de processo é menor e a produtividade também.

Todas as reações enzimáticas em meio aquoso são fortemente dependentes do pH visto que o estado de ionização da enzima é essencial para a catálise. Assim, discutido o papel da água neste processo biocatalítico, verificou-se que o aumento do pH provocou um aumento na conversão e no ee(S) para concentrações de água abaixo de 50% v/v, enquanto que o ee(P) manteve-se praticamente constante. Acima deste valor há uma queda drástica deste parâmetro, enquanto que X e o ee(S) aumentam consideravelmente (Figura 4.3). Segundo Vallikiti e col. (2003) melhores desempenhos enzimáticos são alcançados em pH's acima de 8 porque ocorre aglomeração dos resíduos não-polares em torno do sítio ativo da enzima. A Figura 4.3 (a) e (b) indicam o mesmo comportamento observado pelos autores citados anteriormente, entretanto o valor de ee (P) não sofreu alterações significativas. Para os experimentos realizados com concentração água igual a 83,3 % v/v observou-se uma pequena diminuição de X e ee(S) e um pequeno aumento no valor de ee(P).

Além das informações observadas nos experimentos é de conhecimento que o pH ótimo de atuação da enzima Amano AK de *Pseudomonas fluorescens* situa-se na faixa alcalina em torno de oito (<http://www.amano-enzyme.co.jp>). A Figura 4.3 mostra que o aumento do pH, de uma forma geral propiciou um pequeno aumento (< 20%) no valor de ee(P), confirmando, desta forma, um melhor desempenho, em pH's mais alcalinos.

Entretanto, visando associar razoáveis conversões (> 30%) com elevados valores de ee(P) (> 60%) optou-se em se trabalhar com bateladas na proporção 1:1 (água:solvente orgânico), e devido a pequena variação experimental (Figura 4.3 (b)) entre os pH's sete e oito, certamente dentro do erro, definiu-se pH = 7 como referência para todas as reações enzimáticas posteriores.

Segundo Beatriz e col. (2011) as resoluções cinéticas reportadas para os derivados do glicerol, como é o caso do (*R,S*)-IPG, envolvendo o uso de enzima, são altamente estereosseletivas em condições brandas e pH próximos da neutralidade (confirmando o que foi obtido neste trabalho), produzindo excessos enantioméricos acima de 90%.

Molinari e col. (2005) efetuaram a hidrólise de vários ésteres derivados do (*R,S*)-IPG utilizando como biocatalisadores duas cepas distintas de bactérias, *Streptomyces* sp. 90852 e 90930. Segundo os autores, além de apresentarem enantiosseletividades diferentes, uma pelo álcool (*S*) (*Streptomyces* sp. 90852) e outra pelo (*R*) (*Streptomyces* sp. 90930), o comportamento frente a diferentes pH's também foi diferenciado. Enquanto a cepa de *Streptomyces* sp. 90930 apresentou declínio na razão enantiomérica em pHs acima de sete a outra cepa (*Streptomyces* sp. 90852) mostrou aumento, sendo que o maior valor de E foi gerado no máximo pH testado, neste caso, oito.

4.1.1.2.2. Efeito da concentração de enzima, solvente orgânico e temperatura

O solvente pode alterar a especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade, seletividade proquiral e enantiosseletividade das lipases e outras hidrolases. Vários modelos foram propostos para explicar a mudança da seletividade destas enzimas em função do solvente, os quais foram baseados na alteração da flexibilidade conformacional do sítio ativo, na partição de grupos funcionais do substrato ou de moléculas de solvente para fora ou para dentro das cavidades do sítio ativo, e na estrutura do solvente (Cygler *et al.*, 1997).

Assim, definido o substrato, biocatalisador, relação água:solvente orgânico e pH do meio reacional, diferentes atividades enzimáticas (0,9 U (5 mg) e 2,7 U (15 mg)), bem como solventes (acetato de etila (Log*P* = 0,7) (Figura 4.4 (a) e (b)), tolueno (Log*P*=2,5) (Figura 4.5 (a) e (b)) e hexano (Log*P*=3,5) (Figura 4.6 (a) e (b))) foram

testados na resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-*O*-isopropilideno inicialmente a 30°C (Figura 4.4 a 4.6).

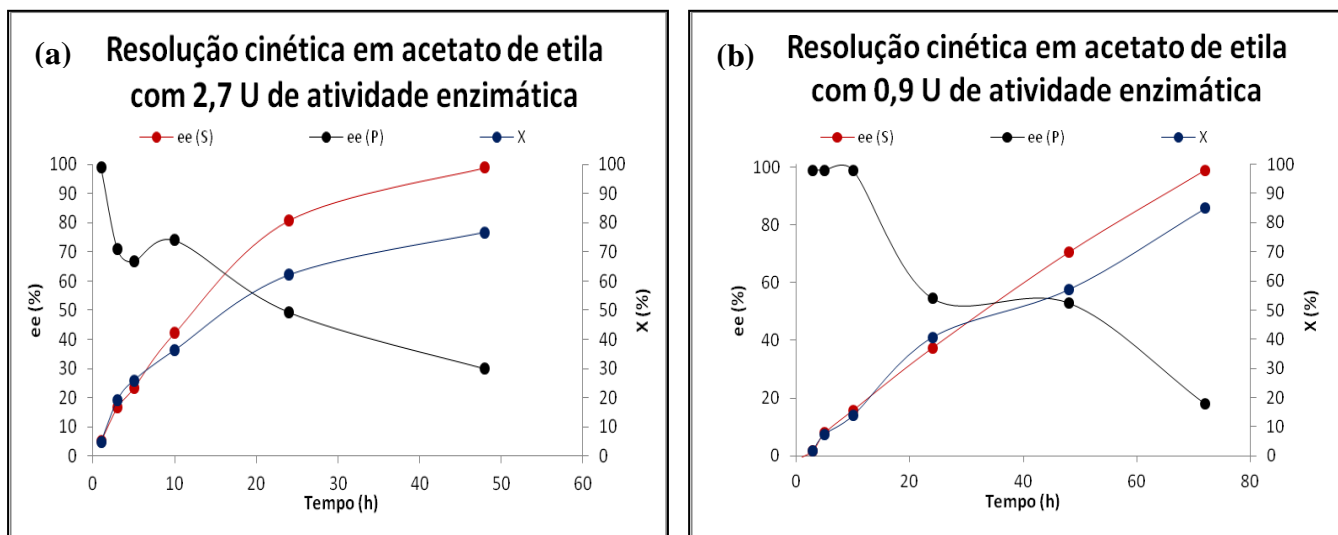


Figura 4.4: Resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-*O*-isopropilideno (5mM) em acetato de etila com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 30°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1.

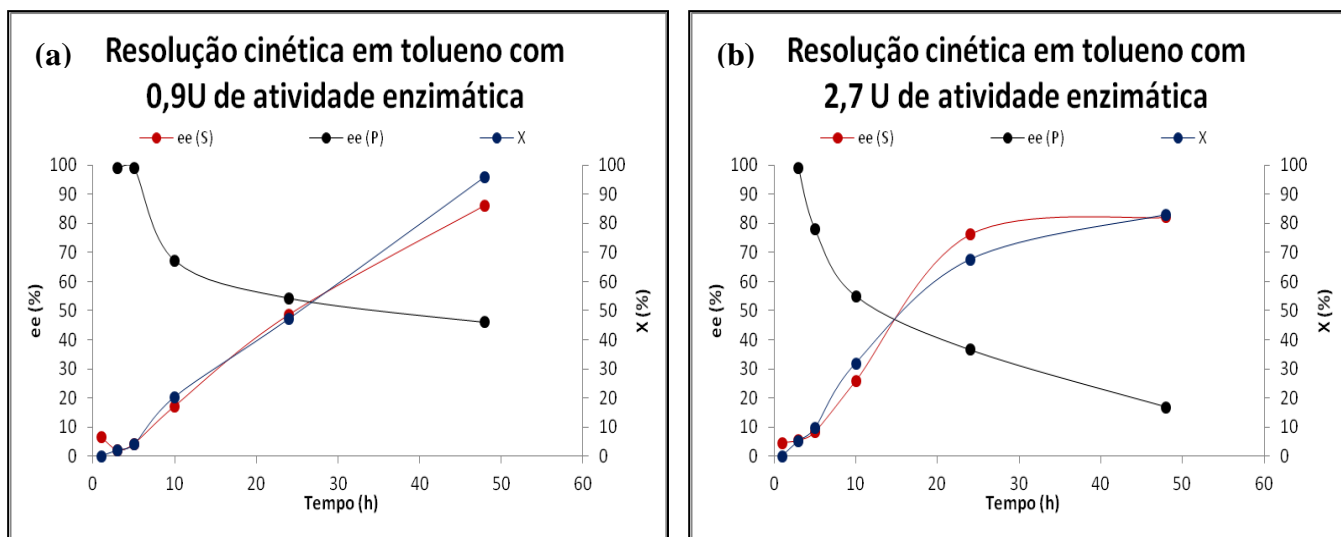


Figura 4.5: Resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-*O*-isopropilideno (5mM) em tolueno com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 30°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1.

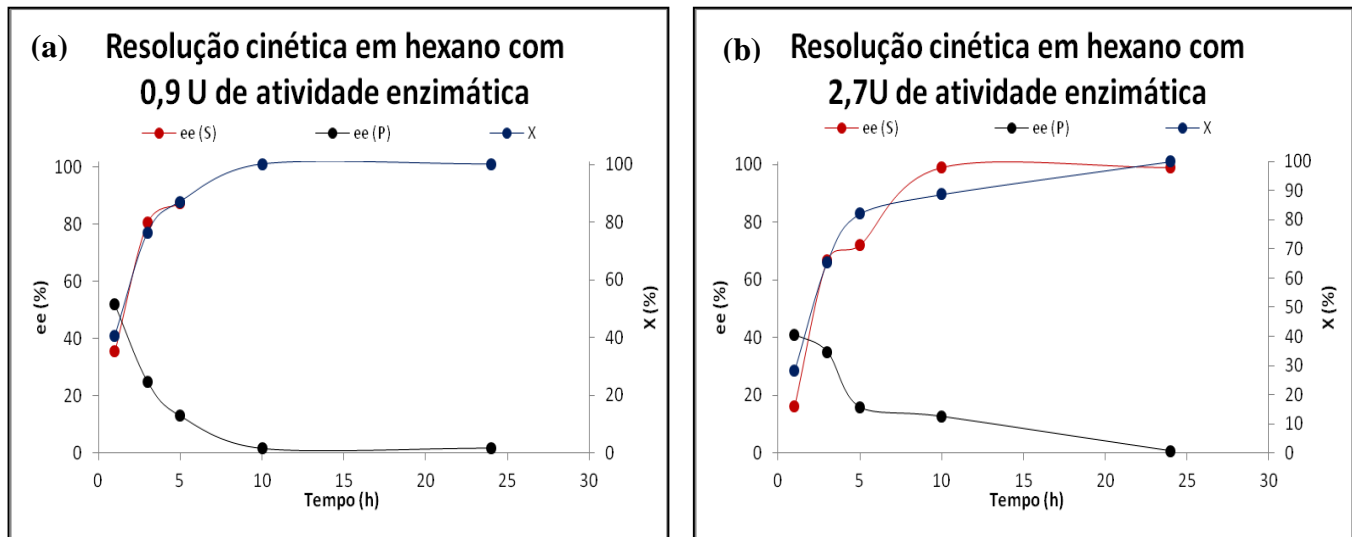


Figura 4.6: Resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em hexano com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 30°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1.

Em uma resolução enzimática o solvente atua no coeficiente de partição da água, substratos e produtos para o microambiente da enzima. Quanto à água, este efeito é devido à propensão que determinados solventes têm para remover água da enzima (“water stripping”) (Zaks e Klivanov, 1988; citado em Koskinen e Klivanov, 1996), levando a uma insuficiente hidratação da mesma e, conseqüentemente, a um decréscimo da atividade enzimática (Halling, 1994). Normalmente, a extensão deste fenômeno é maior nos solventes hidrofílicos o que acaba gerando uma preferência pelos solventes hidrofóbicos. Já em relação ao substrato o poder de solvatação do solvente dificulta a partição deste até o centro ativo da enzima e, em relação ao produto, a difusão deste para o solvente. Mais especificamente, o solvente afeta a estabilização do substrato, normalmente traduzida pela diferença de energia de Gibbs (ΔG) referente ao complexo enzima-substrato e o substrato livre (Halling, 1994).

De acordo com as cinéticas geradas (Figuras 4.4 - 4.6) é possível obter na forma enantiopura o (*S*)-IPG ($ee(P) > 99\%$ e $E > 200$) até 10 horas de reação, em acetato de etila e em até 5 horas em resoluções cinéticas efetuadas em tolueno. Entretanto, confirmando o que já foi verificado anteriormente essa diferenciação só ocorre em conversões baixas, neste caso, menores que 10%, indicando que a lipase apresenta de fato, nas primeiras horas de reação, capacidade de diferenciação. Assim o octanoato de (*S*)-1,2-O-isopropilideno é consumido mais rapidamente (maior constante de afinidade) gerando por conseqüência o (*S*)-IPG. Por outro lado o octanoato de (*R*)-1,2-O-isopropilideno é consumido mais lentamente, logo em conversões acima de 80% ele pode ser removido na forma pura ($ee(S) > 99\%$). Naturalmente, a condução do processo

até 100% de conversão impede a diferenciação enantiosseletiva enzimática, já que ambos os substratos são convertidos em álcool. A Figura 4.7 apresenta o cromatograma gerado para a resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-*O*-isopropilideno em acetato de etila com a enzima Amano AK ($T=30^{\circ}\text{C}$).

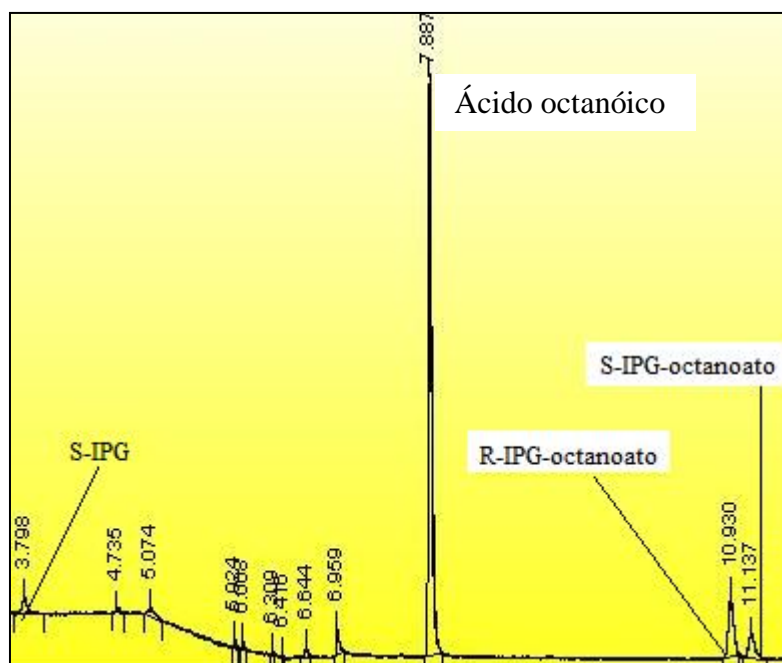


Figura 4.7: Cromatograma obtido da reação (5 horas) entre a enzima Amano AK (0,9 U) e o octanoato de (*R,S*)-1,2-*O*-isopropilideno em 3 horas de reação em acetato de etila a 30°C .

Neste caso (Figura 4.7) observa-se que há apenas consumo de um dos substratos, o que apresenta maior velocidade específica de consumo, enquanto que o outro é mantido no meio reacional. A conversão em 3 horas foi menor que 10%, entretanto como já discutido anteriormente, o ee(P) obtido foi maior que 99%.

A hidrofobicidade do solvente, expressada por $\log P$ (logaritmo do coeficiente de partição de uma substância em um sistema padrão de duas fases: 1-octanol/água), apesar de inúmeras exceções, é o que apresenta melhor correlação com a atividade de enzimas e, geralmente, as enzimas são mais estáveis em solventes com caráter hidrofóbico (Yang e Russel, 1996). Os parâmetros de solubilidade de Hildebrand e a constante dielétrica de diferentes solventes orgânicos, normalmente não fornecem uma boa correlação. Segundo Laane e col. (1987) a atividade enzimática é baixa em solventes relativamente hidrofílicos que apresentam $\log P < 2$, é moderada em solventes com $2 < \log P < 4$ e alta em solventes apolares onde $\log P > 4$. Solventes hidrofílicos podem desativar biocatalisadores devido à remoção de moléculas de água essenciais para manutenção da

atividade dos mesmos (Monti *et al.*, 2008). A Figura 4.8 apresenta o comportamento da enzima Amano AK (0,9U), em relação ao ee (P) e X nos diferentes solventes testados (a) em 3 horas e em 24 horas de reação.

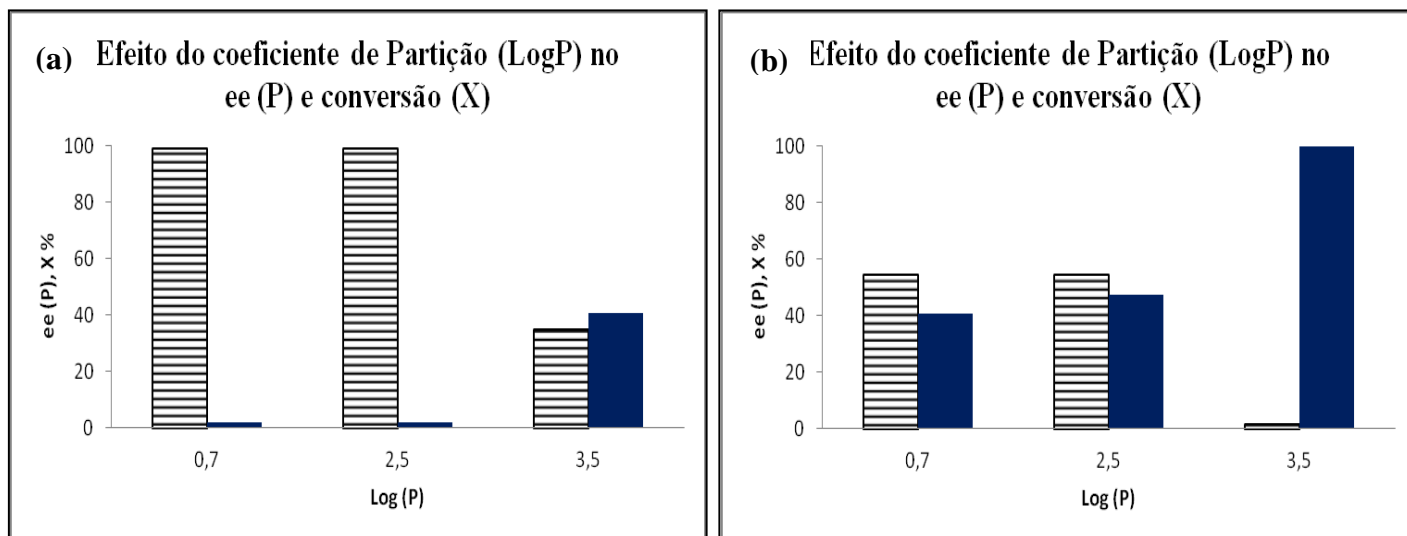


Figura 4.8: Variação de ee(P) (▨) e X (■) em (a) 3 e (b) 24 horas de reação do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) com a enzima Amano AK (0,9 U) em diferentes solventes com água (1:1).

A forma como os solventes afetam a atividade enzimática e a enantiosseletividade ainda não é bem compreendida e as hipóteses apresentadas para explicar esse fenômeno apresentam discrepâncias entre si (Costa e Amorim, 1999). Pode-se observar nos trabalhos que exploram esse tema a preocupação em salientar que os resultados alcançados são restritos aos sistemas estudados, evitando-se generalizações.

Assim, de acordo com os resultados gerados (Figura 4.8) é possível verificar que a enzima testada apresenta comportamento diferenciado, já que a mesma apresentou bom desempenho ($ee(P) > 99\%$; $E > 200$) em acetato de etila (solvente mais hidrofílico) e em tolueno, cuja hidrofobicidade é 3,6 vezes maior. Os testes em solventes mais hidrofóbicos $LogP > 3,5$ apresentaram taxa de conversão tão rápida quanto em hexano, descartando a possibilidade de utilizar solventes muito hidrofóbicos no meio reacional.

Miyazawa e col. (1999) estudando a resolução do 2,2 difenil-1,3-dioxano-4 metanol por meio da reação de transesterificação via lipase de *Rhizopus sp.* com butanoato de vinila verificaram também que solventes com coeficientes de partição intermediários, ou seja, solventes mais hidrofílicos forneceram maiores valores de ee (P) e conseqüentemente de E.

O desempenho catalítico da lipase de *Mucor javanicus* na síntese do laurato de n-pentila foi avaliado em relação a diferentes solventes orgânicos. A enzima não apresentou atividade catalítica nas reações realizadas com solvente relativamente hidrofílico ($\log P < 2$), apresentou eficiência catalítica moderada em solvente com $\log P$ entre 2 e 4; e alta eficiência em solventes fortemente apolares ($\log P > 4$). Os rendimentos em laurato de n-pentila foram: 82% em hexano ($\log P = 3,5$); 70% em ciclohexano ($\log P = 3,2$); 68% em tolueno ($\log P = 2,5$) e em diclorometano ($\log P = 0,93$). Nos solventes acetona ($\log P = -0,23$) e acetonitrila ($\log P = -0,33$) não foram observadas a formação do éster (Silva e Jesus, 2003).

Frings e col. (1999) mostraram que houve uma diferenciação enzimática mais eficiente na medida que se aumentou a hidrofobicidade do solvente na reação de esterificação do 1-feniletanol com a lipase de *Mucor miehei*. Entretanto, segundo os autores o ponto ótimo da resolução foi obtido em hexano, já que em solventes mais hidrofóbicos que este houve uma diminuição na eficiência de resolução, da mesma forma que em solventes mais hidrofílicos, como é o caso do MTBE (éter metil-terc butílico), também testado.

Além do solvente é possível também analisar a influência da concentração do biocatalisador utilizado nos ensaios cinéticos (Figura 4.4 a 4.6). A Tabela 4.3 representa somente a conversão e o ee(P) em função de alguns tempos utilizando-se 5 mg (0,9 U) e 15 mg (2,7 U) de enzima em acetato de etila.

Tabela 4.3: Influência da concentração enzimática inicial na resolução do octanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno (5mM) a 30°C em acetato de etila e água (1:1).

Tempo (h)	Atividade enzimática inicial (U)			
	0,9		2,7	
	X	ee (P)	X	ee (P)
	(%)		(%)	
1	0,8	99	4,9	99
3	1,8	99	19,1	71
5	7,4	99	25,9	66,8
24	40,7	54,6	62,1	49,4
48	57,1	53	76,7	30

Apesar de ter aumentado consideravelmente a conversão em função do tempo o aumento da atividade enzimática inicial diminuiu a diferenciação pelo substrato como

indicam os valores de ee(P) (Tabela 4.3). Por exemplo, em 5 horas de processo, utilizando-se 0,9 U de atividade enzimática inicial é possível obter o *S*-IPG puro com conversão de 7,4 %, enquanto que, ao se utilizar 2,7U ,na mesma condição, verifica-se que a conversão aumentou 3,5 vezes, entretanto não há mais diferenciação da enzima por apenas um dos enantiômeros, pois ee(P) passa a ser 66,8%. O mesmo comportamento também foi observado para as reações em tolueno a 30°C.

Além de melhorar o processo de resolução, a utilização de menores concentrações de biocatalisador diminuem o custo do processo, já que normalmente estes são caros e quando utilizados na forma livre (não imobilizados) não podem ser reaproveitados.

Ensaio para analisar a perda da atividade enzimática durante as resoluções cinéticas também foram efetuados de forma a explicar alguns resultados obtidos. Na temperatura de 30°C ficou constatado que até 5 horas a atividade enzimática é mantida integralmente, independente do solvente e da concentração de enzima no meio reacional. Em 24 horas percebe-se, principalmente em acetato de etila uma diminuição na atividade, cerca de 40%, provavelmente pelo fato de solventes mais hidrofílicos removerem água essencial da camada protéica que está relacionada a manutenção da atividade enzimática. O mesmo comportamento foi observado em tolueno, entretanto a queda na atividade da enzima ficou em torno de 20%. No caso do solvente mais hidrofóbico, o hexano, quase não foi observado desativação enzimática.

Uma alternativa para atenuar ou até mesmo eliminar a perda de atividade enzimática seria o uso do processo de imobilização, pois desta forma a enzima não ficaria tão exposta ao efeito do solvente.

Além da quantidade de enzima e solvente uma avaliação da temperatura da reação foi efetuada, já que a 50°C não foram obtidos resultados satisfatórios. Segundo Reetz (2002) normalmente se espera que a diminuição de temperatura aumente a enantiosseletividade da enzima tempos reacionais mais longos. Por este motivo, com o objetivo de estudar o efeito desta variável na reação foram conduzidas cinéticas a 30°C (Figuras 4.4 a 4.6) e a 10°C (Figuras 4.9 a 4.11). É importante deixar claro que cinéticas a temperatura ambiente não geraram resultados melhores do que os testados a 30°C, por esse motivo ensaios nesta temperatura não foram discutidos. Além disso, sempre foram feitos brancos reacionais para garantir a integridade do processo, ou seja, apenas o aumento da temperatura ser responsável pela hidrólise.

As Figuras 4.9-4.11 representam a resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno nas mesmas condições mencionadas para as reações a 30°C, entretanto neste caso a temperatura dos ensaios foi de 10°C.

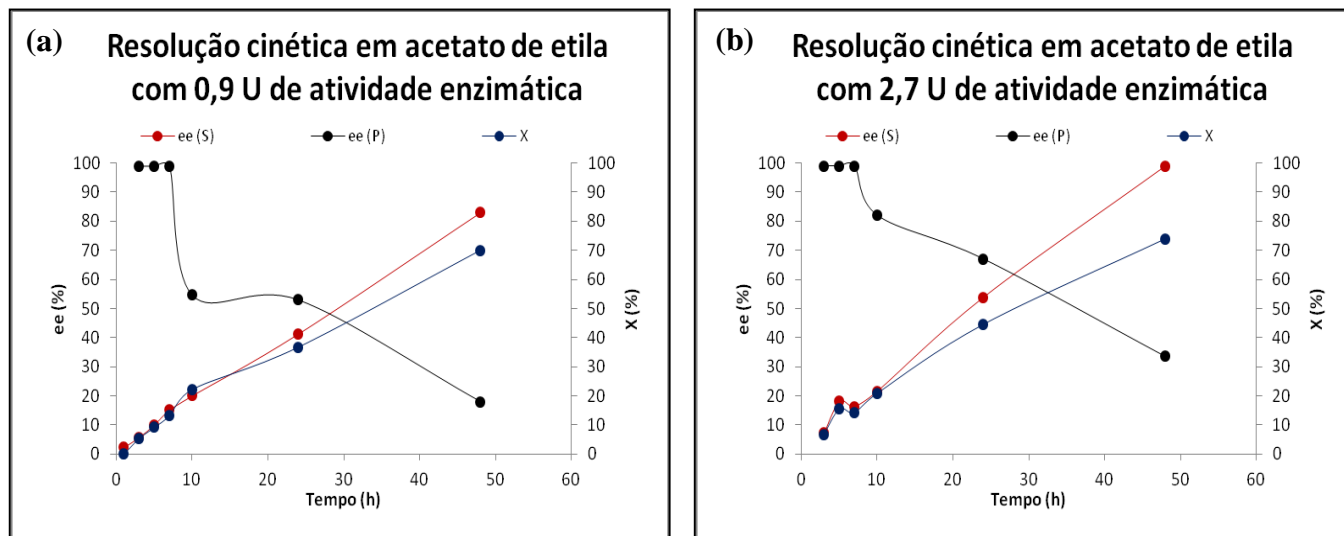


Figura 4.9: Resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em acetato de etila com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 10°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1.

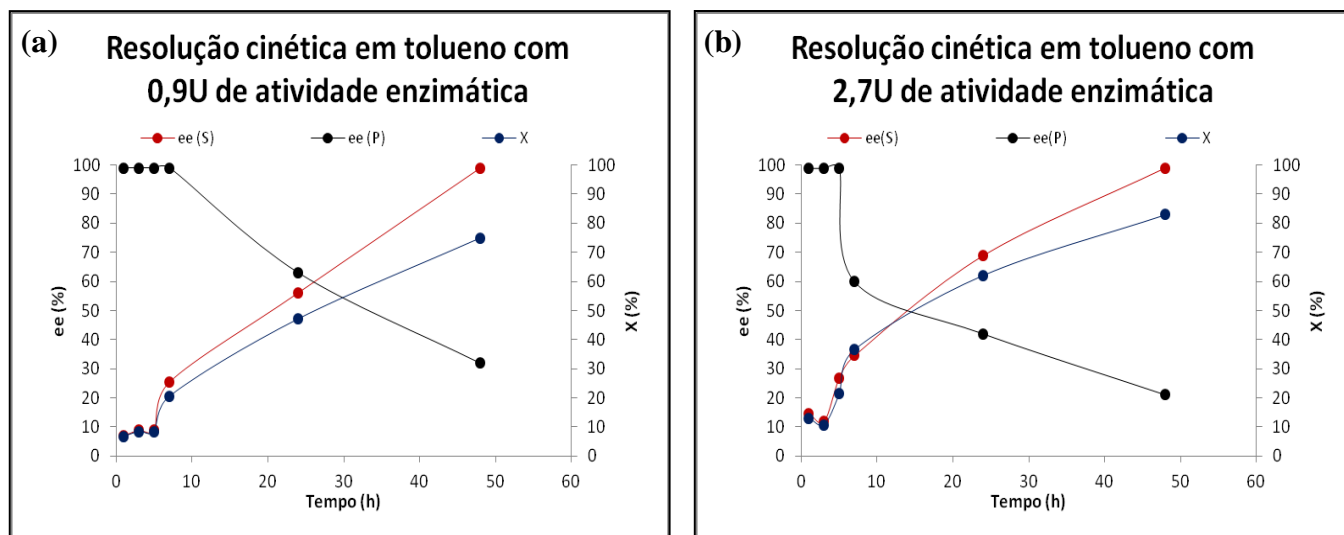


Figura 4.10: Resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-O-isopropilideno (5mM) em tolueno com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 10°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1.

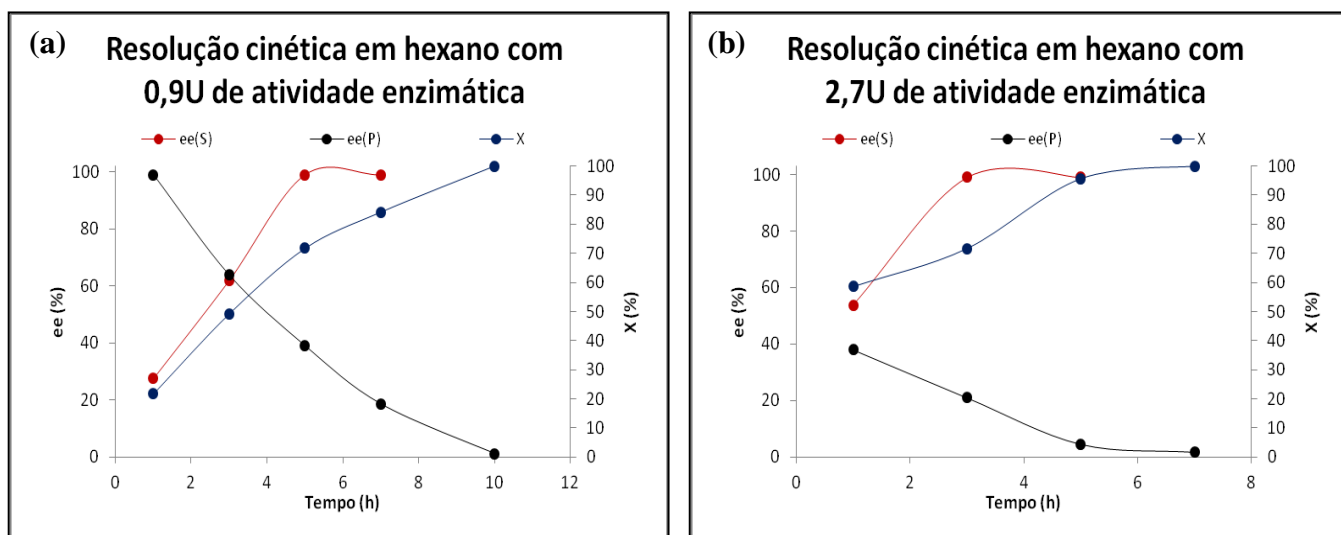


Figura 4.11: Resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-1,2-*O*-isopropilideno (5mM) em hexano com 0,9 (a) e 2,7 U (b) de atividade enzimática inicial a 10°C, pH = 7 e relação solvente água: 1:1.

Assim como a 30°C, as reações em acetato de etila e tolueno a 10°C apresentaram melhores resultados, principalmente quando as reações foram efetuadas com 0,9 U de atividade enzimática inicial ($ee(P) > 99\%$, $E > 200$). Nesta temperatura, com uma maior atividade enzimática inicial, ou seja, 2,7 U foi possível obter a forma *S* enantiopura ($ee(P) > 99\%$), fato não observado a 30°C. A diminuição de temperatura provavelmente provocou a diminuição da velocidade específica da reação, favorecendo o consumo de apenas um dos substratos.

As reações em hexano também tiveram sua taxa reacional diminuída a 10°C. Utilizando-se atividade enzimática inicial de 0,9U em tempos de reação inferiores a 1 hora foi possível obter o composto *S*-IPG com pureza, fato também não observado na resolução a 30°C (Figura 4.6 (a)).

Visto a significativa melhora em termos de resolução do enantiômero, medidas da atividade enzimática a menores temperaturas (10°C) foram também efetuadas, a fim de discutir os resultados gerados. Nesta temperatura a atividade enzimática foi mantida a 100% em até 7 horas independente da concentração enzimática inicial.

A mudança de temperatura de 30°C para 10°C não alterou significativamente a cinética conduzida em acetato de etila na menor concentração enzimática (5mg, 0,9 U) optou-se pela escolha deste solvente na temperatura de 30°C para a continuidade dos experimentos. Além de 13% de conversão e elevado excesso de produto ($ee(P) > 99\%$), uma recuperação de 1,4mg de produto, equivalente a 22% de rendimento químico real

foi gerada. Além disso, processos efetuados em baixa temperatura demandam gastos energéticos extras para manutenção de baixas temperaturas reacionais.

Em décadas passadas, muitos métodos foram desenvolvidos para a síntese do *S*-1,2-O-Isopropilideno glicerol visando um aumento de *E*, normalmente entre 5-15. Dentre eles, podem-se citar os métodos a partir do ácido ascórbico ou *D*-manitol e *L*-serina (Beatriz, 2011). Entretanto, o uso de enzimas para gerar o (*S*)-1,2-O-isopropilideno glicerol tem se tornado uma alternativa bastante atrativa, visto que enzimas são capazes de catalisar enantiosseletivamente reações de hidrólise ou esterificação em um ambiente favorável ao processo com um custo-benefício adequado (Hof e Kellog, 1996; Fai Liu, 1999).

Sakai e col. (1998) estudaram o efeito da temperatura na resolução cinética de (*R,S*)-IPG catalisada por lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* e conseguiram aumentar o valor de *E* de 9 (a 30°C) para 55 (a -40°C) em éter isopropílico, com e.e. igual a 93%. Neste trabalho os autores obtiveram os melhores resultados, em maiores tempos de reação, com a utilização de butirato de vinila e elevadas quantidades de enzima (cerca de 150 mg). Miyazawa e col. (2001) estudaram a transesterificação irreversível catalisada por lipase, para resolver dois cetais do glicerol, assim como (*R,S*)-IPG. Inicialmente, os autores testaram a resolução enzimática do (*R,S*)-IPG *via* acilação com acetato de vinila em éter isopropílico. Foram usadas 12 lipases de fontes microbianas e pancreática, no entanto, somente os resultados com 3 lipases foram apresentados no artigo para a resolução do (*R,S*)-IPG. A enantiosseletividade, incluindo a preferência estereoquímica (*R* ou *S*), variou consideravelmente com a enzima usada. Nenhuma das lipases testadas mostrou elevada enantiosseletividade, exceto a lipase de *Rhizopus javanicus*, a qual apresentou grau moderado de enantiosseletividade (*E* = 11, 48% de e.e. para o enantiômero *S*), em longos tempos de reação (280 h).

Os dados apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5 resumem os principais resultados obtidos a partir das cinéticas geradas nas diferentes temperaturas, atividades enzimáticas e solventes estudados

Tabela 4.4: Reações de hidrólise do octanoato de (*R,S*)-1,2-*O*-isopropilideno (5mM) em 5 horas de reação variando-se a atividade inicial da lipase (0,9U e 2,7U), temperatura (10 e 30°C) e solvente (acetato de etila, tolueno e hexano).

Solvente	Atividade enzimática (U)								Temperatura (°C)
	0,9				2,7				
	X	ee (P)	ee (S)	E	X	ee (P)	ee (S)	E	
	(%)				(%)				
<i>Acetato de etila</i>	7	99	8	> 200	26	67	23	6,3	30
<i>Tolueno</i>	4	99	4	> 200	9	78	8	8,8	
<i>Hexano</i>	88	13	99	4,6	82	16	72	2,6	
<i>Acetato de etila</i>	9	99	10	> 200	16	99	18	15	10
<i>Tolueno</i>	8	99	9	>200	21	99	27	> 200	
<i>Hexano</i>	72	39	99	3,1	96	4	99	3,1	

Tabela 4.5: Reações de hidrólise do octanoato de (*R,S*)-1,2-*O*-isopropilideno (5mM) em 24 horas de reação variando-se a atividade inicial da lipase (0,9U e 2,7U), temperatura (10 e 30°C) e solvente (acetato de etila, tolueno e hexano).

Solvente	Atividade enzimática (U)								Temperatura (°C)
	0,9				2,7				
	X	ee (P)	ee (S)	E	X	ee (P)	ee (S)	E	
	(%)				(%)				
<i>Acetato de etila</i>	41	55	38	4,9	62	49	81	6,9	30
<i>Tolueno</i>	47	54	49	5,3	68	36	76	4,5	
<i>Hexano</i>	97	2	57	1,4	89	13	99	4,6	
<i>Acetato de etila</i>	37	71	41	8,8	45	67	54	8,6	10
<i>Tolueno</i>	47	63	56	7,6	62	42	69	5,8	
<i>Hexano</i>	100	-	-	-	100	-	-	-	

Além do excesso enantiomérico para caracterizar a eficiência na resolução de um racemato, a razão enantiomérica (E) é um parâmetro muito importante, principalmente quando se quer aperfeiçoar um dado processo, pois a partir dele é possível verificar quantas vezes um enantiômero é melhor substrato que o outro para a enzima ensaiada. Uma análise da razão enantiomérica mostra que $E \leq 10$ não conduzem a resoluções eficientes, enquanto que $E \geq 100$ se aproximadas às condições ideais de reação conduz a obtenção tanto de produto quanto de substrato residual enantiomericamente enriquecidos. Entretanto elevados valores de razão enantiomérica ($E > 200$) podem estar sendo influenciados, além do preparado enzimático, pela desativação pelo solvente (verificado através de acompanhamento cinético) e, também pelas incertezas intrínsecas relativas aos métodos analíticos de determinação dos excessos, neste caso GC (cromatografia gasosa) (Costa e Amorim, 1999).

A Tabela 4.5 apresenta alguns resultados obtidos pela literatura na resolução enantiomérica do (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol.

Tabela 4.6: Resolução do (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol através de reações de hidrólise e acilação enantiosseletiva utilizando diferentes catalisadores.

<i>Biocatalisador</i>	<i>Reação</i>	<i>E</i>	<i>Referência</i>
Lipase Amano AK	Acilação do (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol com butirato de vinila	44	Sakai <i>et al.</i> , 1998 *
Lipase de fígado de cavalo	Hidrólise do butanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol	15	
<i>Bacillus subtilis niger</i>	Hidrólise do caprilato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol	11	
Proteinase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Hidrólise do butanoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol	9	Fai Liu, 1999
Penicilinacinase	Hidrólise do p-fenilacetato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol	7.2	
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Hidrólise do benzoato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol	7.0	

Lipase Amano P	Hidrólise do butanoato de (R,S)- 1,2-O-isopropilideno glicerol	5.1	
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Acilação do (R,S)-1,2-O- isopropilideno glicerol com butirato de vinila	4.0	
Lipase de pâncreas de porco	Hidrólise do butanoato de (R,S)- 1,2-O-isopropilideno glicerol	3.0	
Lipase Amano AK	Acilação do (R,S)-1,2-O- isopropilideno glicerol com acetato de isopropenila	5.4	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Hidrólise do butanoato de (R,S)- 1,2-O-isopropilideno glicerol	5.2	Mezzetti <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus coagulans</i>	Hidrólise do benzoato de (R,S)- 1,2-O-isopropilideno glicerol	80-100	
<i>Bacillus coagulans</i>	Hidrólise do propionato de (R,S)-1,2-O-isopropilideno glicerol	32-34	Romano <i>et al.</i> , 2005
Lipase Amano AK	Hidrólise do octanoato de (R,S)- 1,2-O-isopropilideno	>200	Este trabalho

* Reação a -44°C

De uma forma geral, o valor de E obtido neste trabalho, > 200 nas primeiras horas de reação pode ser reflexo das incertezas associadas às dosagens experimentais, entretanto, em 24 horas o valor de E a 30°C com 2,7U de atividade colocada passa a ser 8,8, indicando que o processo é viável e pode ser otimizado. Os elevados valores para este parâmetro obtido por Sakai e col. (1998) são reflexos da alta concentração enzimática (150 mg de lipase) e da baixa temperatura reacional. Os autores não fizeram um estudo comparativo em temperaturas maiores mantendo a concentração da enzima. Romano e col. (2005) utilizaram células integras de *Bacillus coagulans* como biocatalisador da reação. Os outros trabalhos citados na Tabela 4.5 utilizaram solventes mais complexos nos meios reacionais, o que encarece o processo além de limitar a sua utilização, visto que alguns são muito tóxicos.

Outro aspecto relevante deste trabalho é que o valor obtido para o E está compatível com os relatados para as reações de hidrólise, visto a dificuldade em se trabalhar com álcoois primários. Entretanto, para fins práticos o valor de E não foi o parâmetro mais relevante na definição do processo, mais sim o valor de ee(P), pois desta forma foi possível obter um dos enantiômeros em sua forma pura.

4.2. Caracterização dos Suportes

4.2.1. Microscopia de Varredura Eletrônica das Membranas de poli (éter-imida) (PEI)

Para a adsorção enzimática, inicialmente, optou-se por utilizar suportes microporosos de PEI, na forma de membranas poliméricas. As membranas de PEI foram preparadas através da técnica de imersão-precipitação, utilizando diferentes aditivos para obter morfologias e propriedades superficiais distintas. A morfologia das membranas foi avaliada pela da técnica de MEV, enquanto a porosidade e a área disponível para adsorção foram avaliadas por picnometria conforme discutido no capítulo 3.

Os aditivos foram utilizados foram nitrato de lítio e polivinilpirrolidona (PVP) K10 e K90. Além de alterar a morfologia da membrana, os aditivos permitem modificar as características superficiais. O primeiro é totalmente removido da matriz polimérica após a formação da membrana, enquanto o PVP permanece parcialmente retido (Borges, 1993). A composição da solução e o tempo de exposição da solução a atmosfera (umidade relativa em torno de 60%) foram investigados para o preparo da membrana a fim de obter um suporte adequado para imobilização enzimática. Inicialmente foram testadas duas concentrações de nitrato de lítio, mantendo o tempo de exposição em 5 min. As Figuras 4.12, 4.13 e 4.14 apresentam as fotomicrografias das superfícies e das seções transversais das membranas obtidas a partir das soluções contendo PEI/LiNO₃/NMP (N-metil-2-pirrolidona).

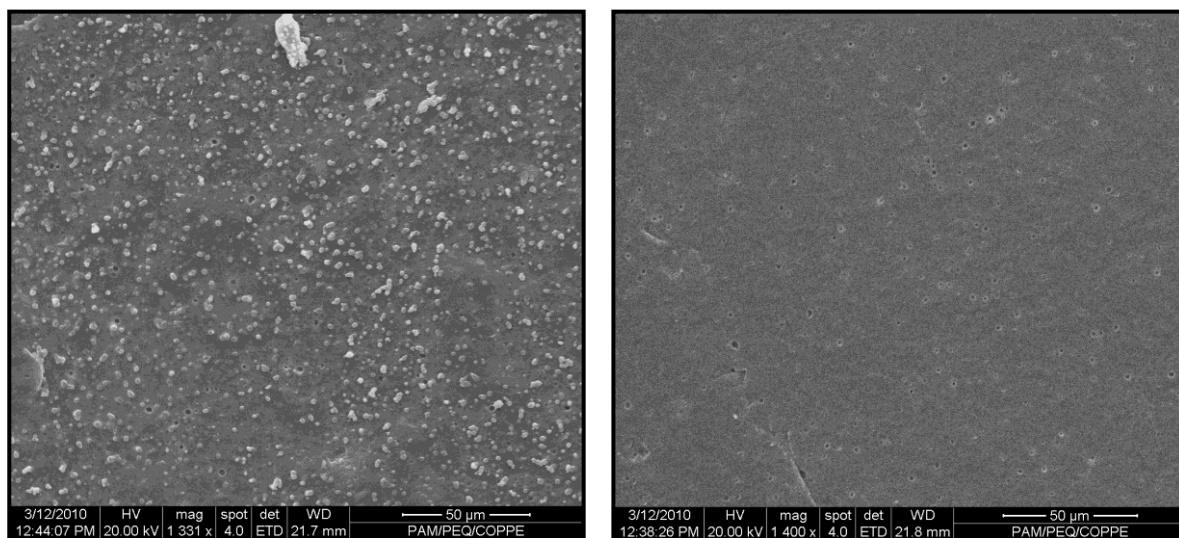


Figura 4.12: Fotomicrografias da superfície das membranas planas obtidas a partir da solução PEI/LiNO₃/NMP (15/3/82 m/m/m).

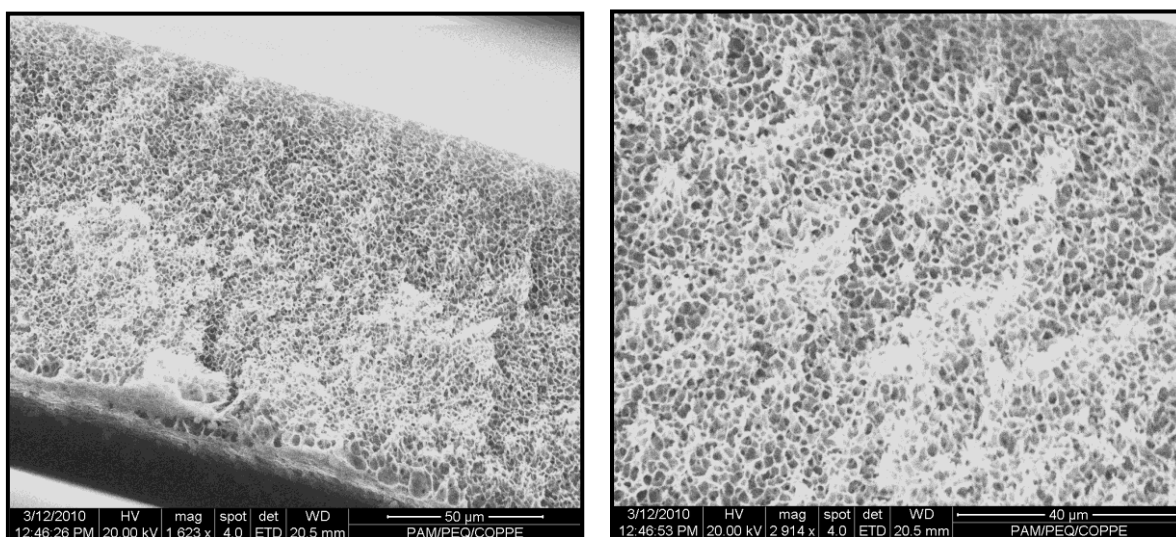


Figura 4.13: Fotomicrografias das seções transversais das membranas planas obtidas a partir da solução PEI/LiNO₃/NMP (15/3/82 m/m/m).

Apesar de apresentar elevada porosidade na seção transversal, variável importante no processo de imobilização, as membranas contendo 3% de nitrato de lítio foram caracterizadas por pouca interconectividade dos poros, provenientes possivelmente da separação de fases por nucleação e crescimento da fase diluída em polímero. Assim, com esta morfologia o processo contínuo ficaria limitado a baixos valores de fluxo, prejudicando a transferência de massa através da membrana.

Além disso, observando-se as fotomicrografias das superfícies da membrana (Figura 4.12) foi possível observar que há uma distribuição de poros irregulares, ou seja, determinadas regiões do suporte são bem mais porosas do que outras.

Visando um aumento da interconectividade dos poros propôs-se uma nova concentração de nitrato de lítio na solução polimérica, a saber, 5 % m/m. Na Figura 4.14 (a) e (b) estão representadas a superfície e a seção transversal da membrana obtida a partir da solução de PEI/LiNO₃/NMP (15/5/85 m/m/m), respectivamente. O tempo de exposição a atmosfera foi mantido constante em 5 min.

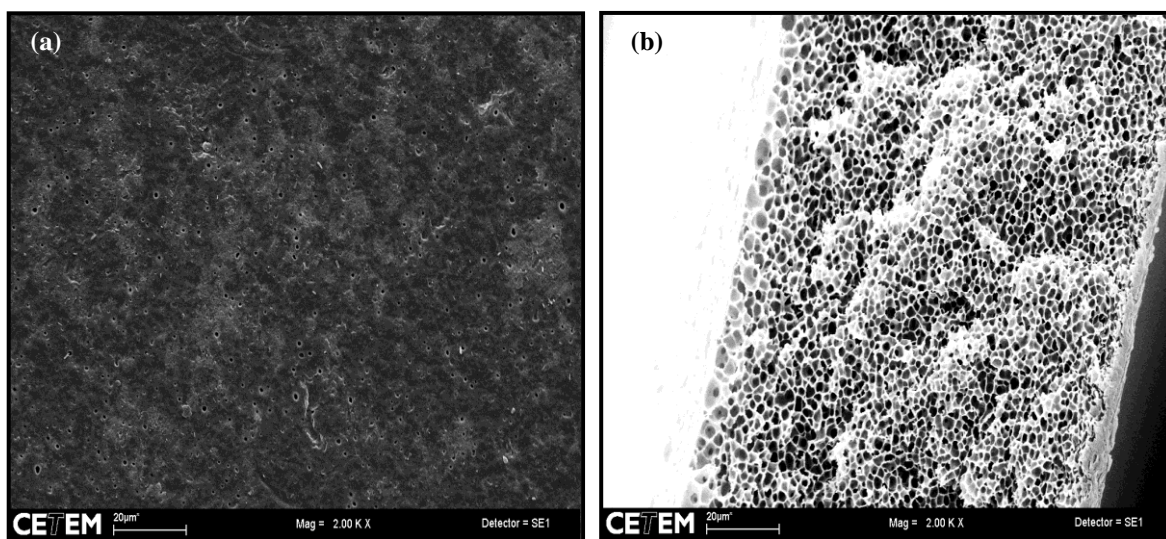


Figura 4.14: Fotomicrografias da (a) superfície e da (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/LiNO₃/NMP (15/5/85 m/m/m).

O aumento na concentração de nitrato de lítio não gerou mudanças morfológicas significativas, que pode ser explicado em relação à estabilidade da solução polimérica quando a mesma entra em contato com a atmosfera. O sistema com maior quantidade de aditivo encontra-se mais próximo a condição de separação de fases devido à elevada afinidade que este aditivo possui com o não-solvente (água). Em princípio, esta condição favorece o processo de nucleação, levando a formação de superfícies com porosidade maior. Como, para este sistema, a faixa de miscibilidade é reduzida, a variação na concentração do aditivo não foi suficiente para ocasionar uma alteração significativa na taxa de nucleação.

Aumentos superiores a 5% em nitrato de lítio poderiam comprometer a estabilidade da solução, inviabilizando o preparo da membrana. Definida a concentração de lítio em 3% m/m, estudou-se então o tempo de exposição. Oliveira (1994) também

avaliou o efeito do tempo de exposição da solução polimérica a atmosfera, antes da imersão no banho de precipitação, já que este tempo está diretamente relacionado com a absorção de vapor de não-solvente da atmosfera ao redor ou a evaporação de componentes voláteis da solução. No sistema investigado, tanto o solvente (NMP) como os aditivos (PVP e nitrato de lítio) não apresentam volatilidade significativa. As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 4.15 e 4.16 mostram a superfície e a seção transversal das membranas planas sintetizadas a partir de soluções de PEI/LiNO₃/NMP com composição igual a 15/3/82 (m/m/m), entretanto com tempos de exposição de 10 e 20 min, respectivamente.

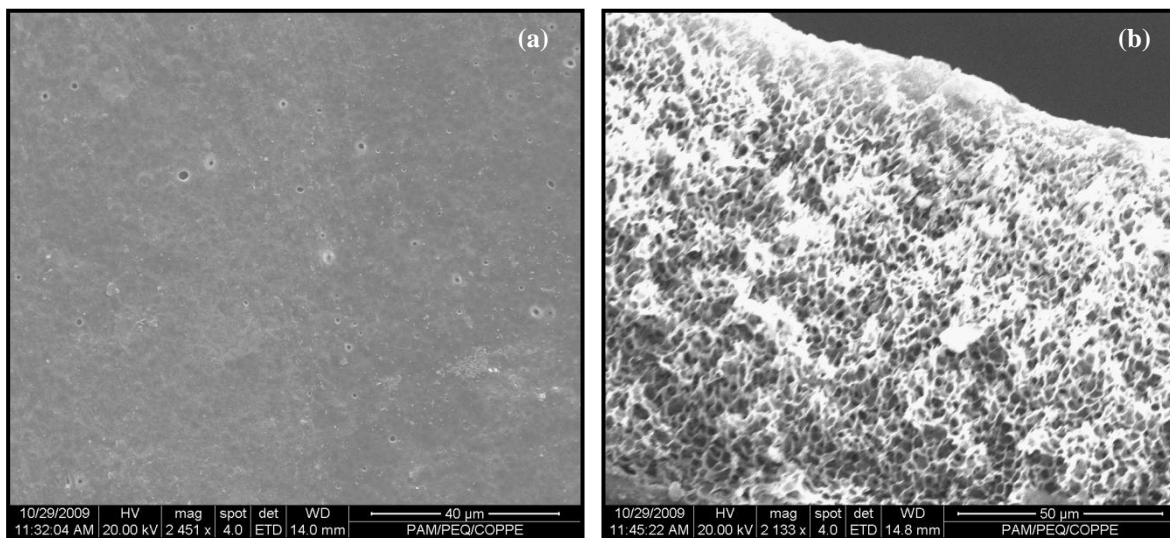


Figura 4.15: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/LiNO₃/NMP (15/3/82 m/m/m) em 10 min de exposição a atmosfera.

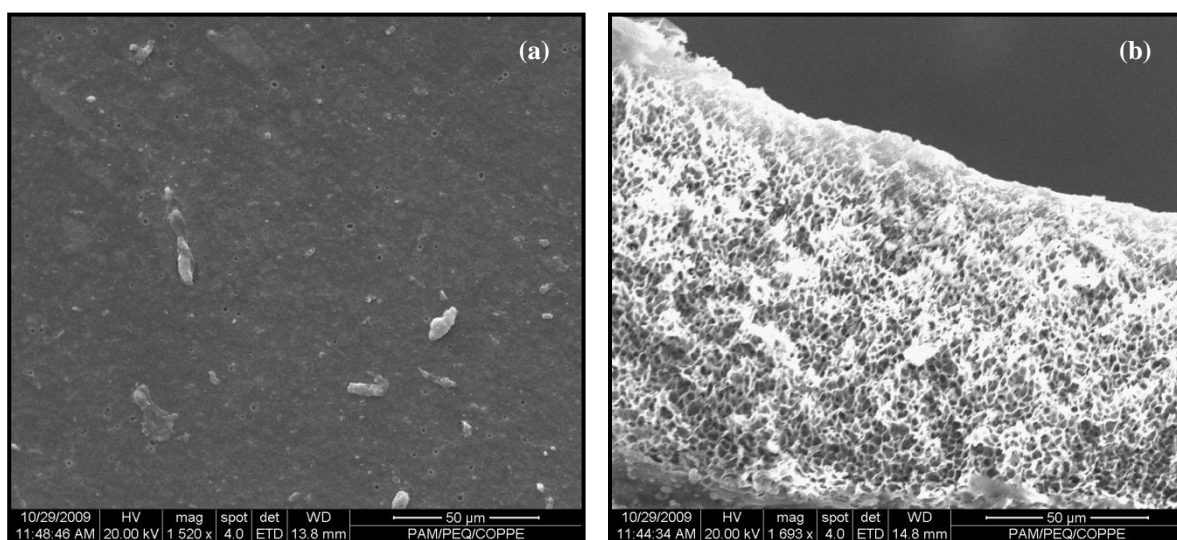


Figura 4.16: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/LiNO₃/NMP (15/3/82% m/m) em 20 min de exposição a atmosfera.

Elevados tempos de exposição mantiveram a morfologia “esponjosa” e constituída por células fechadas (Figuras 4.15 (b) e 4.16 (b)), como observado também por Oliveira (1994). O aumento no tempo de exposição intensifica a absorção de não-solvente pela solução polimérica, uma vez que tanto o solvente quanto o aditivo são substâncias altamente higroscópicas. Logo, maior é a quantidade de água que se difunde ao longo da espessura da solução, gerando instabilidades que levam à formação dos núcleos. Desta forma, os núcleos formados na interface superior não encontram ao seu redor condições de estabilidade e a sua expansão fica desfavorecida, originando a morfologia “esponjosa”.

Para aumentar a interconectividade dos poros, propriedade que facilita a transferência de massa através da membrana, optou-se em se trocar de aditivo. Assim, após a análise de alguns materiais escolheu-se o PVP com duas massa molares distintas, K10 (10 kDa) e o K90 (360 kDa).

O PVP é um polímero hidrossolúvel e miscível com muitos polímeros e solventes orgânicos. Além disso, está disponível em diferentes massas molares, logo, tem sido amplamente utilizado como aditivo polimérico na preparação de membranas. A sua presença na solução reduz a região de miscibilidade para a precipitação do polímero, além de aumentar a resistência à difusão do solvente e do não-solvente. Entretanto, embora seja solúvel em água, uma parte dele permanece na matriz polimérica, conferindo uma maior hidrofiliabilidade à membrana. A estrutura de sua unidade monomérica lhe confere um caráter anfifílico (Figura 4.17), que se deve à presença do grupo amida, altamente polar, com propriedades hidrofílicas, e, por outro lado os grupos metileno e metino, que possuem propriedades hidrofóbicas (Oliveira, 1994, Silveira, 2003 citado em Bassetti, 2002).

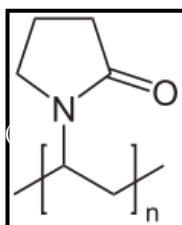


Figura 4.17: Fórmula estrutural do aditivo PVP.

As Figuras 4.18 e 4.19 apresentam as fotomicrografias da (a) superfície e da (b) seção transversal das membranas originadas a partir das soluções poliméricas: PEI/PVP K10/NMP (15/5/80 m/m/m) e PEI/PVP K90/NMP (15/5/80 m/m/m), respectivamente.

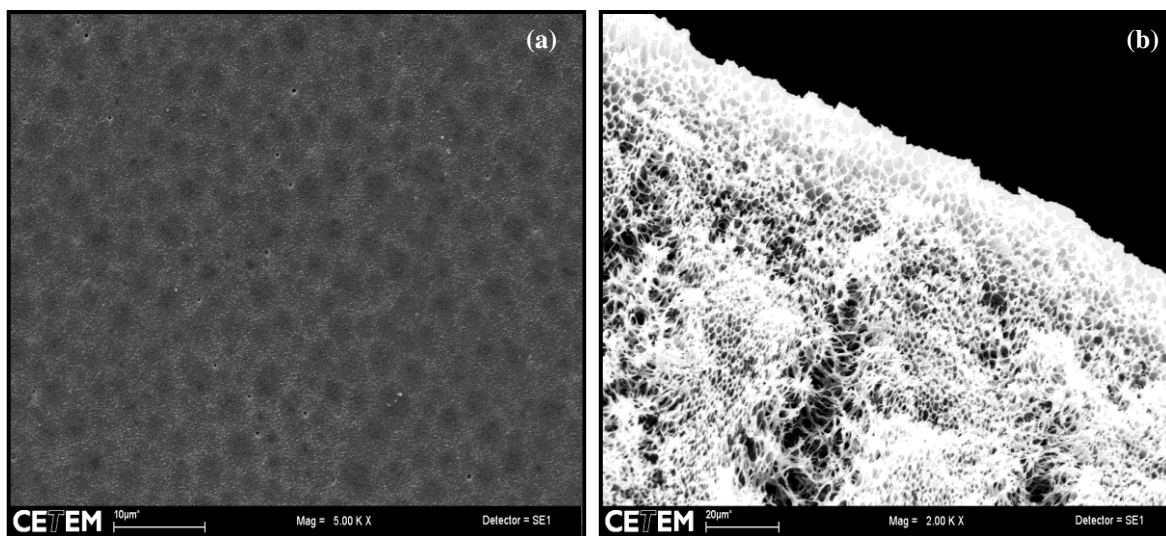


Figura 4.18: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/ PVP-K10/NMP (15/5/80 m/m/m).

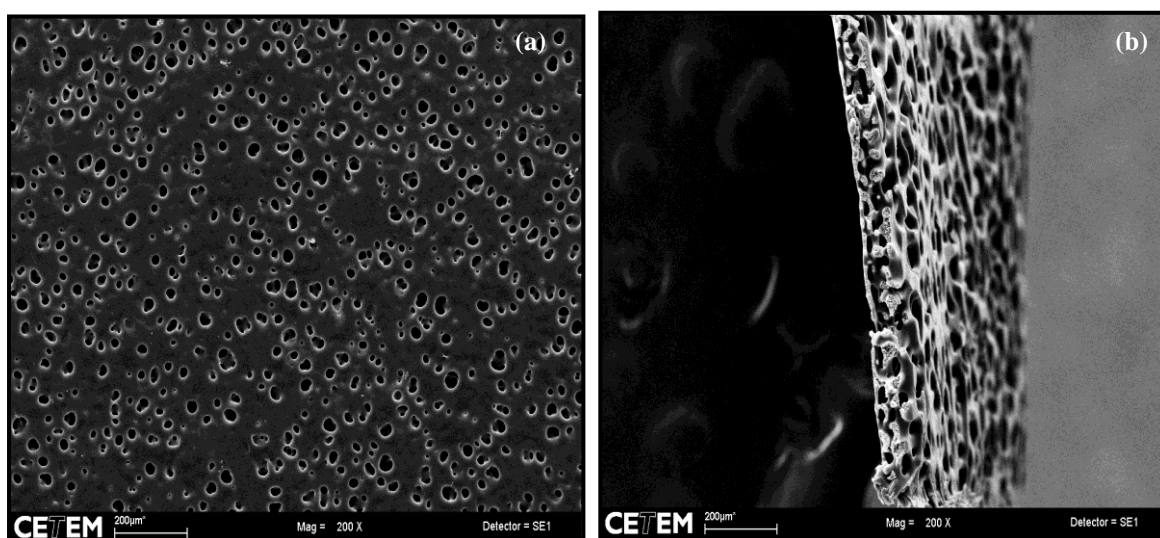


Figura 4.19: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/ PVP-K90/NMP (15/5/80 m/m/m).

A troca de aditivo alterou significativamente tanto a porosidade superficial quanto a interconectividade entre os poros, entretanto a Figura 4.18 (a) mostra que a membrana com PVP de menor massa molar, 10 kDa (PVP K10), levou à formação de um suporte mais espesso e com menor porosidade superficial, quando comparado com a membrana obtida com o PVP com maior massa molar, PVP K90, 360 kDa. Além disso, diâmetros de poros relativamente maiores foram obtidos quando se utilizou o aditivo de maior massa molar. Boom (1992) ao estudar o efeito de diferentes aditivos durante a precipitação de soluções polimérica concluiu que a principal influência da massa molar

do aditivo reside na viscosidade que este proporciona a solução polimérica, o que afeta diretamente a transferência de massa entre a solução polimérica e o banho precipitante.

Com o PVP K10 a viscosidade da solução é menor do que com PVP K90, desta forma, acelerando a transferência de massa e aumentando a concentração de polímero na interface filme/banho no instante da precipitação. Essa região passa, então, a atuar como uma resistência adicional ao transporte de massa de solvente e de não-solvente nas subcamadas da solução e, por isso, a separação de fases nessas regiões é mais lenta (ou com atraso). Assim, a solução polimérica nas subcamadas permanece estável por um tempo maior e, por essa razão, os núcleos formados na camada abaixo da interface conseguem expandir-se (ou crescer). A expansão desses núcleos origina macrovazios observados na seção transversal da Figura 4.18 (b).

Outros autores também verificaram em suas pesquisas que quanto maior a massa molar do aditivo, menor sua mobilidade e maior a possibilidade de a separação líquido-líquido ser iniciada pelo processo de separação espinodal, aumentando a interconectividade da fase diluída no momento da precipitação (Di Luccio, 1997, Pereira, 1999, Carvalho *et al.*, 2002).

A fim de se verificar a influência do tempo de exposição e da concentração do aditivo, assim como no caso com LiNO_3 foram preparadas membranas com concentração de 3% m/m de PVP K90. As Figuras 4.20 e 4.21 apresentam as fotomicrografias da superfície e seção transversal de membranas preparadas com 10 e 20 minutos de tempo de exposição, mantendo a concentração de PVP K90 em 3% m/m.

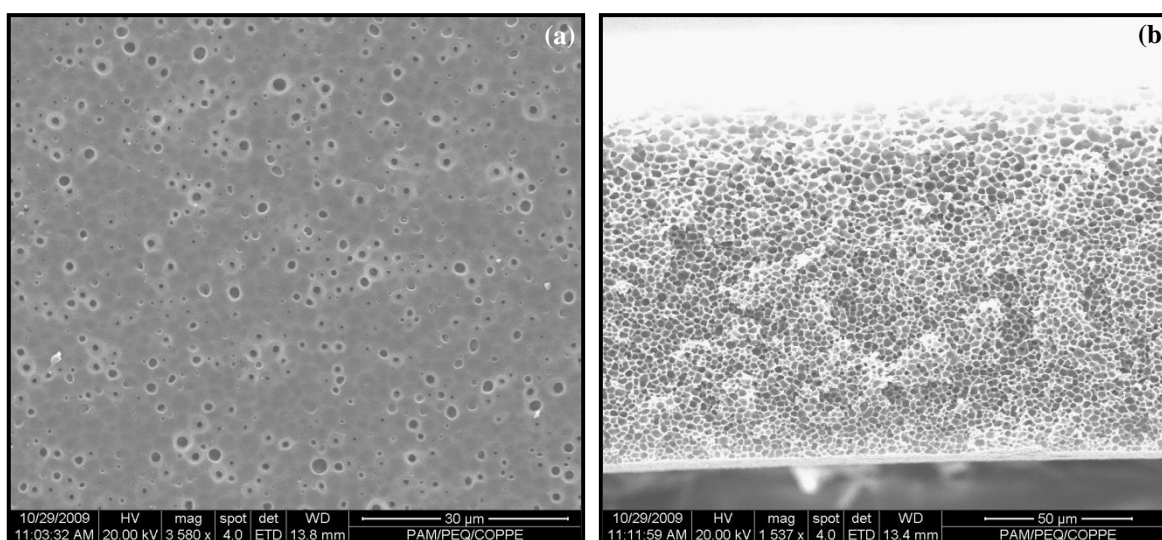


Figura 4.20: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/PVP-K90/NMP (15/3/82 m/m/m) em 10 min de exposição a atmosfera.

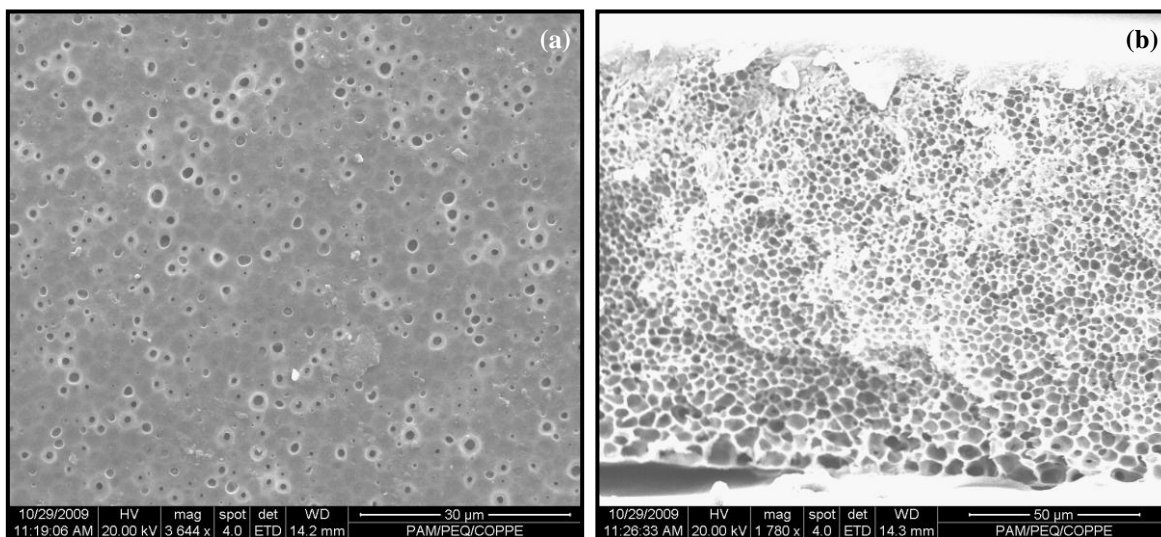


Figura 4.21: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/PVP-K90/NMP (15/3/82 m/m/m) em 20 min de exposição a atmosfera.

Normalmente quando se trabalha com um solvente não volátil com o é o caso do NMP, durante o tempo de exposição, o fluxo de entrada de não-solvente na fase polimérica prevalece sobre o fluxo de saída de solvente desta fase para a atmosférico, de forma que é possível ocorrer a precipitação na interface filme/atmosfera.

Dependendo do tempo de exposição, esta frente de precipitação pode avançar significativamente antes da imersão do filme no banho de precipitação, entretanto, como verificado nas Figuras 4.20 e 4.21, o aumento do tempo de exposição não alterou a porosidade superficial. Outra observação é a ausência de macrovazios na seção transversal e a estrutura torna-se “esponjosa”, o que novamente pode ser relacionado a difusão do não solvente (água) ao longo da espessura da membrana, favorecendo o processo de nucleação.

A combinação de aditivos, mantendo a concentração total em 3% m/m e utilizando a relação entre LiNO_3 e PVP K90 na proporção de 1:1 em massa foi efetuada visando-se obter um material com características hidrofóbicas intermediárias. A Figura 4.22 apresenta a morfologia obtida nesta condição e mantendo 10 min de exposição a atmosfera.

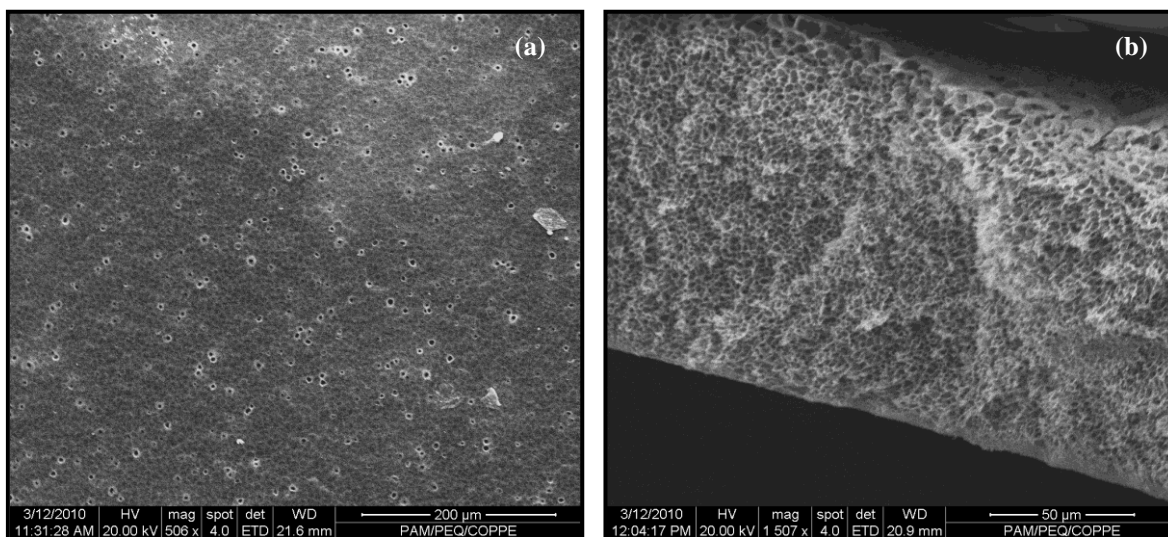


Figura 4.22: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana obtida a partir da solução PEI/PVP-K90/NMP (15/1,5/1,5/82 m/m/m/m) em 10 min de exposição a atmosfera.

Uma comparação qualitativa entre as Figuras 4.15 (3% de LiNO₃), 4.20 (3% de PVP K90) e 4.22 (1,5% de LiNO₃ e 1,5% de PVP K90) mostrou que há um aumento na porosidade superficial com a quantidade de PVP presente na solução. O efeito do tempo de exposição não foi significativo para alterar a morfologia da membrana, como discutido anteriormente, e a mesma estrutura esponjosa foi gerada.

4.2.2. Microscopia de Varredura Eletrônica da membrana comercial de Nylon 6,6

Além das membranas de PEI, confeccionadas no laboratório, outras membranas foram testadas como suporte para imobilização, dentre elas, a de nylon 6,6 (poliamida) foi uma alternativa, visto que apresenta boa resistência frente aos solventes. Por serem mais hidrofílicas, estas membranas não necessitam de agentes de molhamento (Araujo *et al.*, 2006).

Membranas de nylon também apresentam importância significativa como um material de desempenho elevado e, ainda, excelentes propriedades mecânicas e térmicas (Espeso *et al.*, 2006). A Figura 4.23 apresenta as fotomicrografias da membrana comercial de nylon 6,6.

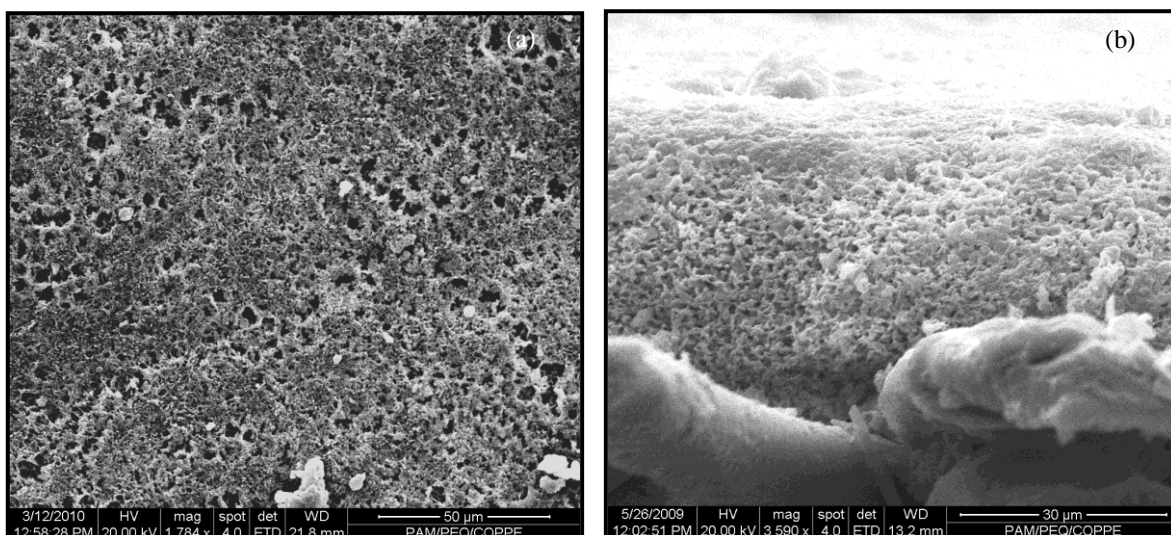


Figura 4.23: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana de nylon 6,6 comercial.

Verifica-se a partir da Figura 4.23 uma grande irregularidade tanto na distribuição de poros quanto no tamanho dos mesmos. Os poros na seção transversal apresentam interconectividade, garantindo baixa resistência a transferência de massa através da membrana. Trata-se de uma membrana suportada em um tecido sem tramas (“non woven”), ou seja, material que serve para deposição da membrana e que lhe confere maior estabilidade mecânica e rigidez.

4.2.3. Microscopia de Varredura Eletrônica da membrana comercial de Polipropileno (PP)

O polipropileno (PP) é um termoplástico semi-cristalino e conhecido por seu baixo custo, sua elevada resistência química e a solventes, por ser fácil de moldar, por possuir alta resistência à fratura por flexão ou fadiga, ter boa resistência ao impacto e estabilidade térmica. O PP é hidrofóbico e não possui grupos funcionais reativos em sua estrutura molecular assim, alguns problemas podem surgir em certas aplicações (Zen *et al.*, 2011).

Normalmente membranas geradas a partir deste polímero utilizam a técnica de precipitação térmica, onde a solução polimérica preparada em alta temperatura é a precipitação da fase concentrada em polímero ocorre por resfriamento. Durante a

redução de temperatura a precipitação é precedida pelo processo de separação de fases líquido-líquido, por nucleação e crescimento da fase diluída em polímero, o que irá gerar os poros da membrana. A Figura 4.24 apresenta a superfície e seção transversal de uma membrana de PP gerada por esta técnica.

Assim como ocorreu com a membrana de nylon 6,6, pode-se perceber que há também uma distribuição de poros irregular ao longo da superfície da membrana de polipropileno (Figura 4.24 (a)). Observando-se a seção transversal da membrana (Figura 4.24 (b)) concluiu-se que se trata de uma membrana isotrópica, já que a porosidade é regular ao longo da seção. A elevada interconectividade dos poros também é uma característica que foi observada na seção transversal.

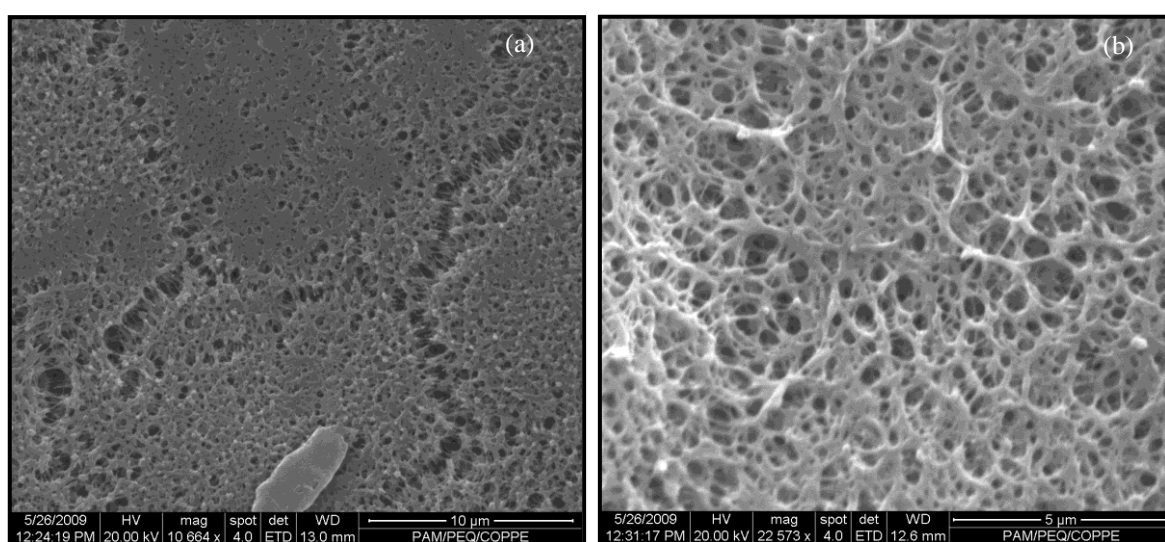


Figura 4.24: Fotomicrografia da (a) superfície e (b) seção transversal da membrana plana polipropileno (PP) comercial.

4.2.4. Microscopia de Varredura Eletrônica do suporte Accurel

As mesmas propriedades apresentadas pela membrana de polipropileno podem ser aplicadas ao accurel, já que ambos os materiais são confeccionados a partir do polipropileno, entretanto, o suporte microporoso apresenta uma área específica mais elevada. A Figura 4.25 apresenta a fotomicrografia do suporte microporoso derivado do polipropileno.

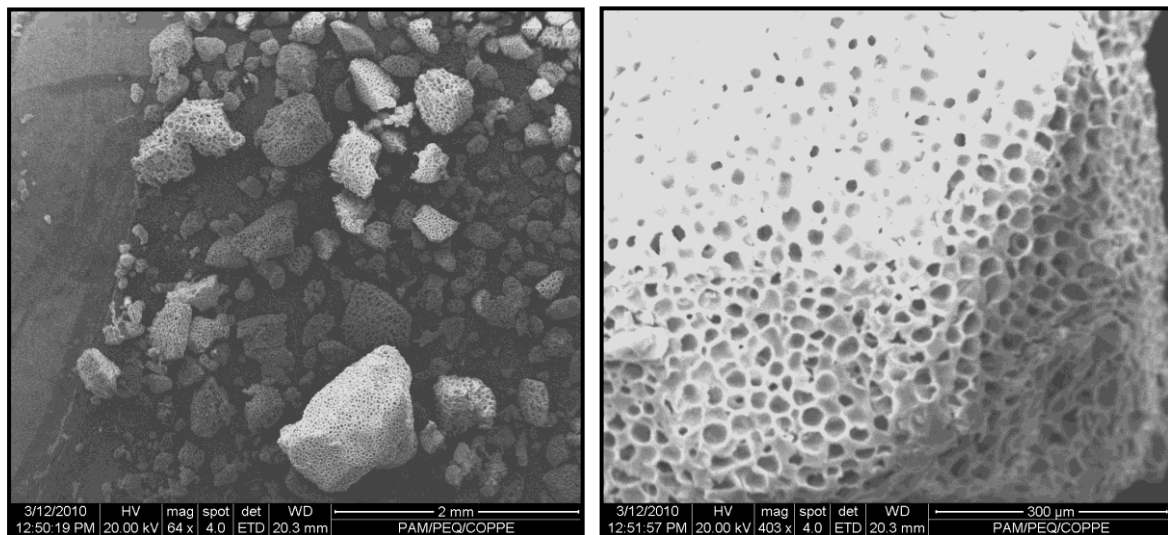


Figura 4.25: Fotomicrografias do suporte accurel.

A Figura 4.25 mostra que além de apresentar alta porosidade, o tamanho dos poros no suporte são regulares, e estes aspectos favorecem a imobilização da enzima.

4.2.5. Determinação da área específica (ASE) das membranas porosas e accurel MP 100 utilizados na imobilização enzimática

A determinação da área específica (ASE, área por unidade de massa) é feita a partir da medida de um grande número de partículas. Em um processo de adsorção enzimática esse parâmetro fornece informações importantes, pois está relacionado com quantidade de atividade enzimática retida.

A importância de se obter materiais com elevada área específica, no campo da catálise, é que a razão catalítica (moléculas produzidas por segundo) é proporcional à área ativa disponível (Albanez, 1996). Quando se trabalha com imobilização de enzimas o conhecimento deste parâmetro permite correlacionar à atividade enzimática, bem como a quantidade de proteína adsorvida por m^2 de suporte. Assim, teoricamente, quanto maior a área do suporte, maior a quantidade de proteína adsorvida e maior a atividade biocatalítica do suporte. Entretanto, no caso de imobilização enzimática esta hipótese nem sempre é verdade, visto que, um suporte pode apresentar uma elevada quantidade de proteína imobilizada e a mesma não apresentar atividade, já por outro lado uma pequena quantidade pode ter sido adsorvida e estar extremamente ativa.

No caso de biocatalisadores, contendo enzimas imobilizadas, além da área específica do suporte, outras propriedades devem ser levadas em consideração, tais como hidrofobicidade, diâmetro dos poros, porosidade, dentre outras. Normalmente suportes porosos particulados apresentam área específica mais elevada do que as observadas em membranas.

A determinação da área específica teve por objetivo, além de avaliar a superfície disponível para imobilização, padronizar os resultados de adsorção enzimática. Desta forma foi possível interpretar mais facilmente os resultados e avaliar a interação da enzima com o material testado.

A área específica da membrana de PEI obtida a partir da solução contendo 3% m/m LiNO₃ (PN) e a do suporte accurel MP 100 foram obtidas por adsorção de nitrogênio, através do ensaio de BET. Os resultados obtidos foram:

Área específica da membrana de PEI: 2,7 m²/g

Área específica do accurel: 38 m²/g

Como esperado a área específica da membrana foi muito baixa quando comparada a do suporte poroso comercial de polipropileno, Accurel MP 100, cerca de 14 vezes maior. Além disso, valores abaixo de 10 m²/g de área específica são considerados imprecisos por esta técnica, pois não se encontram dentro do limite de confiança do aparelho utilizado. Uma alternativa foi o uso de picnometria, já que além de ser prático e rápido fornece instantaneamente os valores de área específica. A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos utilizando-se picnometria para determinação da área específica das membranas contendo 3% m/m de PVP (PV), 1,5% de PVP + 1,5% de LiNO₃ (PH), Nylon (N) e Polipropileno (PP).

Tabela 4.7: Áreas específicas das membranas utilizadas na imobilização da lipase Amano AK.

<i>Material</i>	<i>Área específica (m²/g)</i>
Membrana com 1,5% de PVP e 1,5% de LiNO ₃ (PH)	2,80
Nylon 6,6 (N)	3,15
Membrana com 3% de LiNO ₃ (PN)	3,39
Polipropileno (PP)	4,20
Membrana com 3% de PVP (PV)	6,47

Apesar de impreciso, o valor de área específica obtido pelo método de BET foi bastante similar ao gerado por picnometria para a membrana contendo 3% m/m de LiNO₃. É importante mencionar que apesar de visivelmente parecer ter maior área específica (ver fotomicrografias) que a membrana com LiNO₃, a membrana preparada com dois aditivos (PH) apresentou dentre os materiais analisados o menor valor para tal parâmetro. Tal fato pode estar relacionado a presença de poros com pouca interconectividade (células fechadas) que dificultam a entrada de líquido na medida por picnometria. Cabe ressaltar que, com exceção da membrana PV, os valores obtidos para as áreas específicas das demais membranas estão relativamente próximos, sendo difícil diferenciá-los.

4.3. Estudo de diferentes suportes no ensaio de imobilização da lipase Amano AK

4.3.1. Polipropileno

Muitos autores têm utilizado como suporte para imobilização de enzimas partículas microporosas de polipropileno, accurel MP 100, tendo em vista seu elevado grau de hidrofobicidade e elevada área, cerca de 40 m²/g (Oliveira *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2008).

A cinética de adsorção da lipase Amano AK a 4°C em polipropileno microporoso (Accurel MP 1000) está descrita na Figura 4.26.

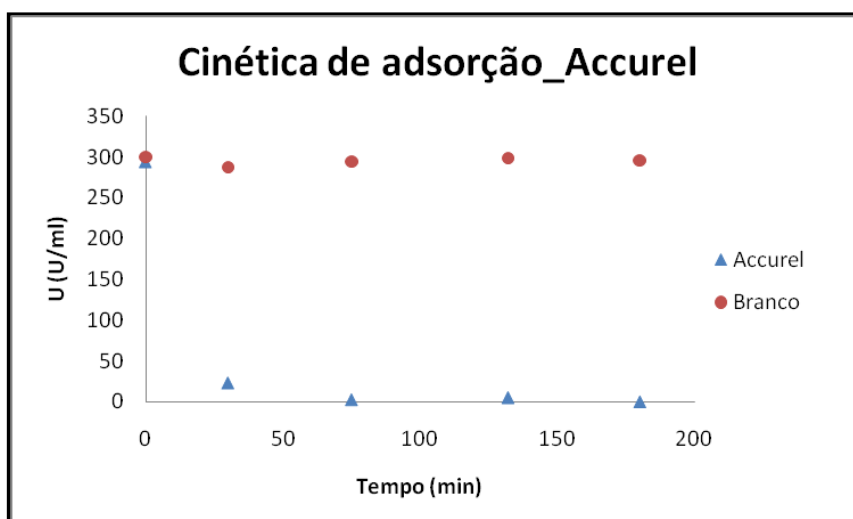


Figura 4.26: Cinética de adsorção da lipase Amano AK sobre o accurel a 4°C.

A lipase foi quase que totalmente adsorvida em cerca de 20 minutos de contato enzima/suporte a baixas temperaturas. O sobrenadante após 30 min de processo de imobilização apresentou cerca de 7,8% de atividade inicialmente colocada, o que gerou, teoricamente, um suporte com 91,2% de atividade. Já que o ensaio em branco (sem suporte) não apresentou queda na atividade enzimática. A adsorção da proteína sobre o suporte também apresentou comportamento bastante similar, resultando no sobrenadante apenas 8% de proteína adicionada. Estes resultados já haviam sido observados por Bevilaqua (2005) imobilizando-se a enzima Lipozyme 10.000 sobre o mesmo suporte. Por outro lado a adsorção completa da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 só foi completa em 6 horas de contato (Salum (2010)). Já neste trabalho, para fins comparativos os experimentos de imobilização por adsorção foram conduzidos por 24 h, desta forma foi garantido adsorção completa da lipase sobre o suporte.

Definido o tempo de imobilização, um estudo de pH foi efetuado na faixa de 5-7. A Figura 4.27 apresenta os resultados, E (eficiência de imobilização), η (rendimento de imobilização) e R_a (retenção de atividade) obtidos após a imobilização da lipase Amano AK em accurel com diferentes pH's.

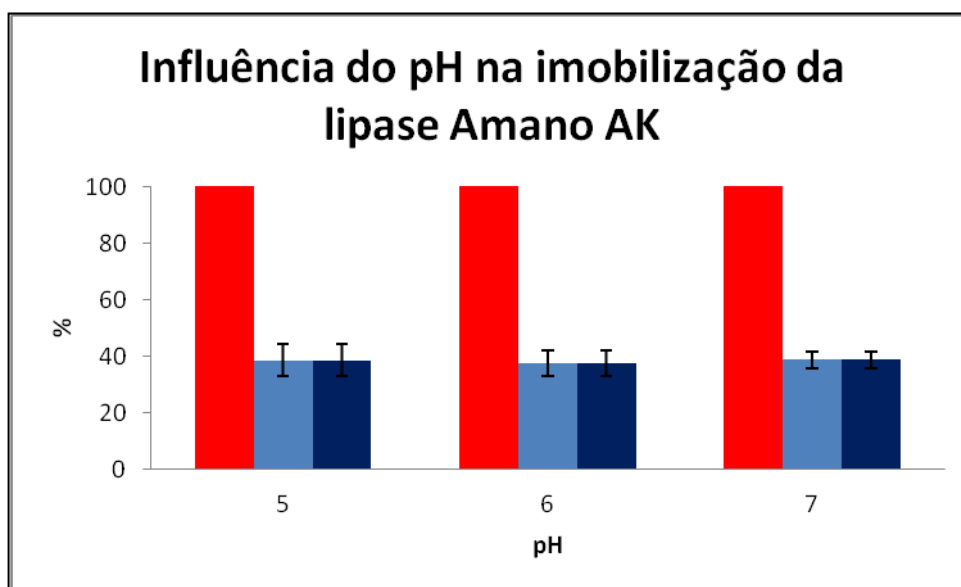


Figura 4.27: Efeito da variação do pH nos parâmetros de imobilização ((■) E; (■) R_a e (■) η) da lipase Amano AK (2,6 U) a 4°C.

Os parâmetros de imobilização não foram afetados pelo pH do meio indicando que as forças de adsorção predominantes são as hidrofóbicas e não as interações eletrostáticas. Do mesmo modo, Gitlesen e col. (1997) observaram que a adsorção da mesma enzima sobre este suporte não foi alterada pela variação do pH.

Isotermas de adsorção em diferentes suportes, no pH 7,0, foram obtidas. Após cada processo de adsorção removeu-se o sobrenadante e lavou-se o biocatalisador gerado, que foi mantido em tampão fosfato também em pH = 7, com o objetivo de evitar o fechamento dos poros. Foram preparadas as soluções enzimáticas de modo a se obter concentrações de proteína e atividade enzimáticas na faixa de 0,027 a 0,62 mg de proteína/mL e 0,679 a 14 U/mL, respectivamente. A Figura 4.28 apresenta as isotermas de adsorção, real e teórica, padronizadas pela área superficial do suporte, em termos de atividade e de proteína.

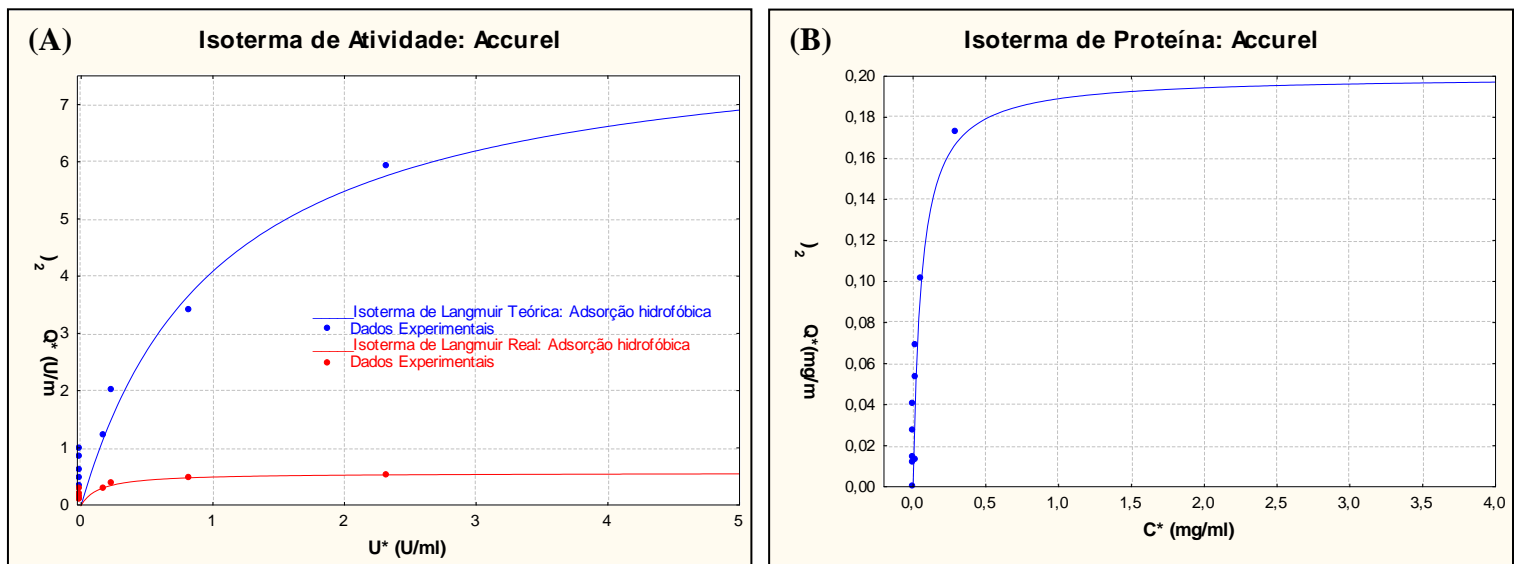


Figura 4.28: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em accurel e a 4°C.

A área disponível para a adsorção da proteína, neste caso a lipase Amano AK depende da natureza da superfície, como, por exemplo, porosidade e tamanho de poro. Em seu trabalho Gitlesen e col. (1997) estudaram a imobilização da mesma lipase sobre o mesmo material utilizado neste trabalho, entretanto com uma área 2,4 vezes maior. Segundo os autores, os dados gerados a partir da adsorção da lipase sobre o suporte se ajustaram melhor ao modelo de Langmuir e os parâmetros resultantes do ajuste foram, 2,6 mg/mL e 2,8 mg/m² para a constante de afinidade e capacidade máxima adsortiva, respectivamente. Observando-se a Figura 4.30 (b) é possível verificar que a afinidade da enzima pelo suporte é de fato elevada, visto que a constante de afinidade obtida foi de 17,3 mg/mL (6,6 maior do que obtido por Gitlesen e col. (1997)).

Estes resultados, aparentemente contraditórios, podem estar relacionados com a condição de imobilização escolhida pelos autores, neste caso pH= 6 e concentração do tampão 20 mM. Para uma comparação mais efetiva seria necessário que os autores fornecessem a retenção de atividade, pois desta forma seria possível discutir os resultados baseados na atividade real do biocatalisador obtido.

Comparando-se os dados gerados a partir das isothermas de atividade foi possível observar que a quantidade de atividade máxima teórica retida no suporte foi de 43,7 U/m² no trabalho de Gitlesen e 8,34 U/m² neste trabalho (5,2 vezes menor).

Segundo o modelo de Langmuir a quantidade de atividade máxima retida e a constante de afinidade foram 0,55 U/m² e 6,5 U/mL, respectivamente. Estes resultados demonstram claramente que há grande perda de atividade durante o processo de

imobilização, já que o biocatalisador gerado apresentou 15,2 vezes menos atividade do que deveria apresentar. Dentre as hipóteses mais prováveis, além da pureza enzimática, a lipase pode ter perdido sua atividade após a imobilização no suporte, função de modificações estruturais, efeitos estereoquímicos ou difusionais que podem ocorrer nos processos de imobilização.

Para avaliar o efeito da concentração de proteína no biocatalisador gerado optou-se em se trabalhar em uma faixa mais ampla de proteína (0,667 a 5,3 mg de proteína/mL) e atividade enzimática (10 a 100 U/mL) como ilustrado na Figura 4.29.

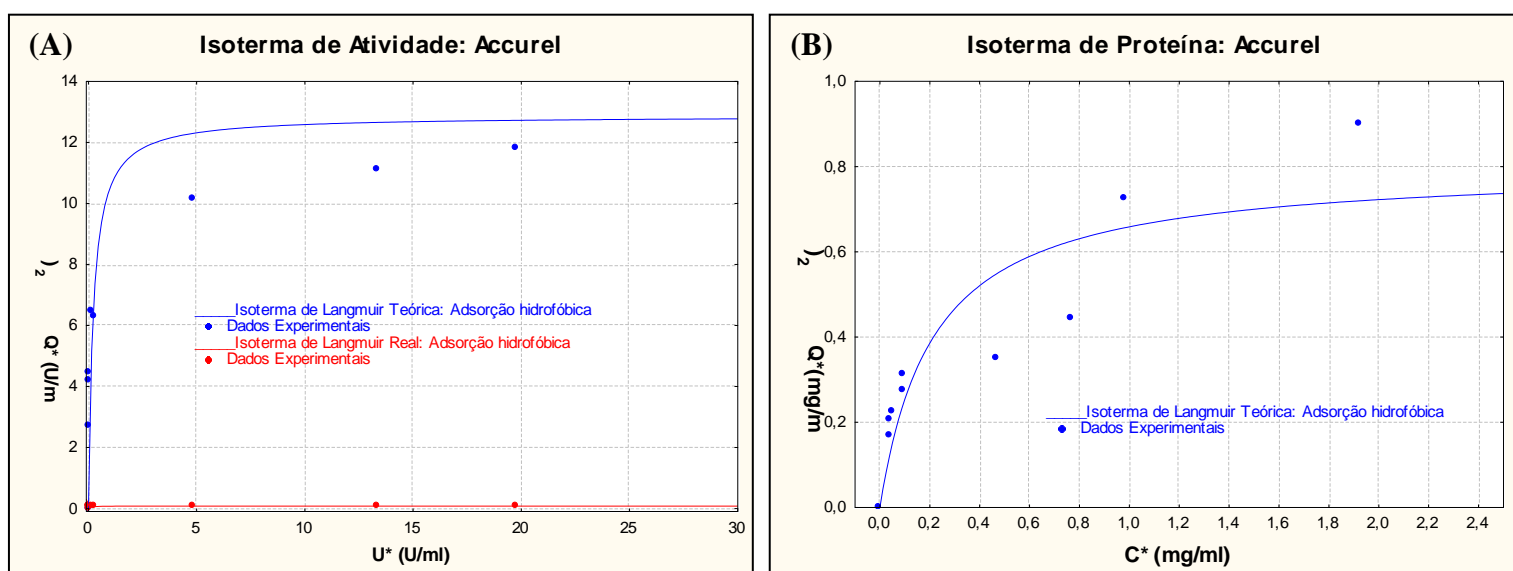


Figura 4.29: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (10-100 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,667-5,3 mg/mL), ambas em accurel e a 4°C.

O aumento na concentração de proteína fez com que houvesse um aumento de 75 % em relação à quantidade de proteína adsorvida comparativamente à adsorção realizada em menores concentrações (Figura 4.29 (b)), o que ocasionou também um aumento na atividade máxima teoricamente retida sobre o suporte (35,2 %). Entretanto, em relação à atividade máxima real retida sobre o suporte nenhum parâmetro pode ser estimado, visto que a atividade ficou próxima de zero, provavelmente pelo fenômeno de adsorção em multicamada (Branco,2010).

A Figura 4.30 apresenta os parâmetros de imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) sobre o accurel MP 100 nas duas situações discutidas acima, ou seja, em menor (até 0,62 mg) e maior (até 5,3 mg) concentração de proteína.

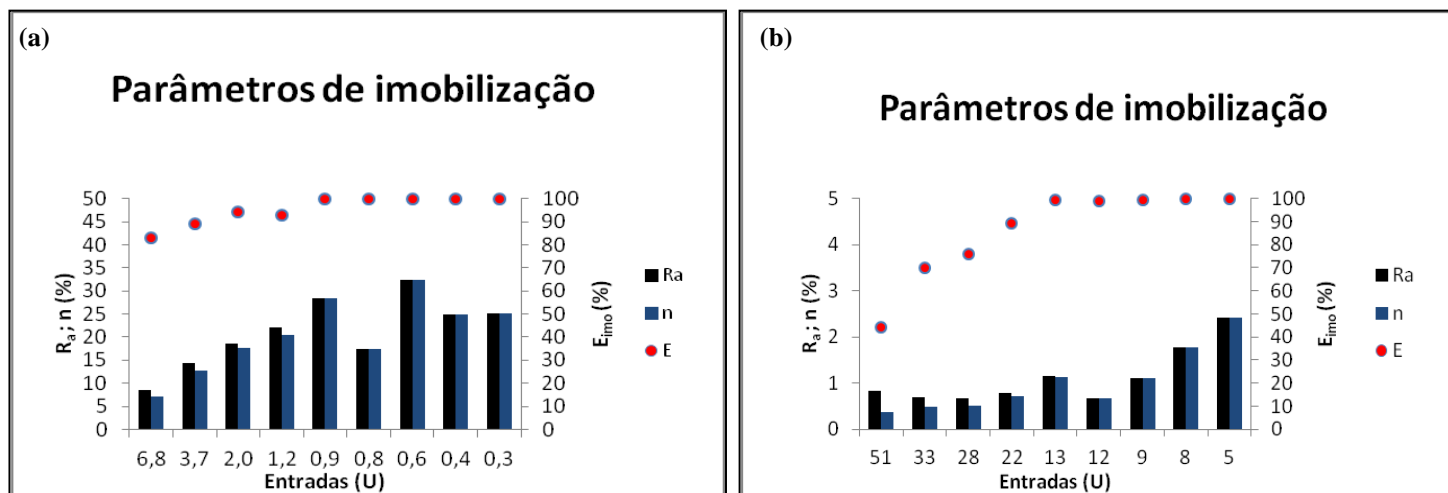


Figura 4.30: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), (a) concentração enzimática até 0,62 mg de proteína e (b) concentração enzimática até 5,3 mg de proteína, sobre o accurel MP 100.

Observando-se a Figura 4.30 é possível verificar que nos ensaios de adsorção sobre o accurel ocorreu um aumento tanto na retenção de atividade quanto na eficiência de imobilização conforme a solução enzimática tornou-se mais diluída. Possivelmente, quanto menor for a concentração de enzima disponível para a imobilização, menor a possibilidade de formação de agregados protéicos, que promovem a perda de atividade enzimática, além da dificuldade de imobilização. Assim pode-se concluir que em soluções mais concentradas a adsorção proteica foi menor, cerca de 60-70%, enquanto que nas mais diluídas passou de 90% na maioria dos casos.

Além disso, quanto maior a concentração de enzima oferecida ao processo de imobilização maior a possibilidade de ocorrer um fenômeno conhecido como “overcrowding” (multicamadas), ou seja, proteína adsorvendo sobre proteína, impedindo a exposição do sítio ativo à catálise. Assim, ocorre uma diminuição considerável da retenção de atividade e o fenômeno de hiperativação não é observado (Almeida *et al.*, 2008; Branco *et al.*, 2010).

Bon e col. (1986) observaram o mesmo efeito em relação à retenção de atividade quando imobilizaram a β -glucosidase proveniente de *Aspergillus niger* em dois suportes distintos, a saber: quitina e alumina. Em ambas as situações os valores de Ra expressivos foram obtidos em soluções enzimáticas mais diluídas, provavelmente pelos efeitos discutidos acima.

Bosley (1997) observou em seu trabalho o efeito da concentração de diferentes proteínas sobre o accurel. Segundo o autor, baixas concentrações enzimáticas, geram intensas interações com o suporte causando deformações nas moléculas, enquanto que,

elevadas concentrações proteicas causavam limitações difusionais. Isotermas de Langmuir descreveram bem o equilíbrio de adsorção de 5 diferentes tipos de proteínas (lipase de *Candida rugosa*, albumina, α -quimotripsina, lipase pura de *Thermomyces lanuginosus* e lipase bruta de *Pseudomonas fluorescens*).

Gitlesen e col. (1997) observaram em seu estudo que de fato a natureza não iônica bem como a elevada hidrofobicidade do polipropileno microporoso (accurel) fazem com que a adsorção de proteínas neste suporte seja governada apenas por interações hidrofóbicas.

Este mesmo suporte foi empregado por Al-Duri e col. (2001) para a imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei*. O biocatalisador foi empregado em sistema utilizando CO₂ supercrítico como solvente e foi caracterizado quanto à estabilidade e à atividade. As variações de pressão (pressão máxima 18 MPa) não causaram efeito significativo em nenhum desses dois parâmetros, comprovando a boa resistência mecânica do suporte e a qualidade da imobilização; já o aumento de temperatura (até 60°C) favoreceu a atividade enzimática porém não a estabilidade do biocatalisador. Neste trabalho os efeitos de difusão interna e externa foram considerados desprezíveis.

Madalozzo (2011) imobilizou a lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* em accurel e observou um aumento na estabilidade em relação à temperatura comparando-se com a enzima na forma livre. Segundo a autora este fato deve estar relacionado à maior rigidez da enzima, conferida pela sua ligação com o suporte.

Como discutido anteriormente o uso de imobilização pode fazer com que a atividade enzimática aumente consideravelmente (hiperativação), entretanto, nos trabalhos acima citados não se observou este efeito. Persson e col. (2002) verificaram um aumento de 400x na atividade da lipase de *Humicola lanuginosa* quando a mesma foi imobilizada em accurel, atribuindo o resultado ao espalhamento da enzima pela ampla área superficial do suporte, prevenindo a agregação das moléculas, facilitando o acesso aos substratos. Além disso, vários autores têm observado que ao adsorver em suportes hidrofóbicos a área hidrofóbica ao redor do sítio ativo são envolvidas na imobilização, deixando a lipase estabilizada em sua forma aberta, gerando, portanto o aumento da atividade (Mateo *et al.*, 2007). Um exemplo é a lipase de *Mucor miehei*, que quando imobilizada em um suporte altamente hidrofóbico (Octadecyl Sepabeads) apresentou uma atividade 20 vezes maior do que a lipase livre (Palomo *et al.*, 2002).

Já Almeida e col. (2008) observaram o fenômeno de hiperativação (340 %) quando utilizaram o mesmo suporte para a imobilização de uma lipase recombinante de *Pyrococcus furiosus*. Além disso, os autores verificaram também a purificação da lipase através de uma adsorção seletiva, ou seja, apenas a proteína de interesse adsorveu sobre o suporte.

Com o objetivo de verificar o efeito do par suporte/enzima no processo foi realizada a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e de *Candida antarctica* livre sobre este suporte (Accurel) a partir de uma solução 0,787 U/mL.

Os resultados mostraram 100% de eficiência de imobilização e 243% de retenção de atividade para a lipase de *T lanuginosus*, indicando a existência do fenômeno de hiperativação. Por outro lado a lipase de *Candida antarctica* fração B apesar de ter sido imobilizada com 100% de eficiência de imobilização, a retenção de atividade foi de apenas de 28%. Comparando-se as três lipases, Amano AK, de *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica* fração B, fica claro que cada par enzima-suporte apresenta um comportamento completamente diferente mesmo quando submetidos as mesmas condições de imobilização. Assim, possivelmente por razões estruturais relacionadas a arquitetura do sítio ativo de cada enzima o mesmo pode ficar mais ou menos exposto, auxiliando ou prejudicando o valor de atividade retida no suporte ao final do processo.

Desta forma, ao se definir o par “enzima-suporte” é importante fixar os parâmetros reacionais, tais como temperatura e pH, dentre outros, visto que o comportamento da enzima pode ser alterado devido a condição de trabalho.

Quando se estuda um fenômeno de adsorção da enzima, um dos principais parâmetros que deve ser levado em consideração é área do suporte disponível para imobilização, como discutido anteriormente. Desta forma, o mesmo material, polipropileno, foi utilizado sob a forma de membrana, ou seja, menor área disponível para adsorção enzimática. As Figuras 4.31 e 4.32 apresentam os resultados obtidos após a imobilização da enzima de *Pseudomonas fluorescens* sobre a membrana de polipropileno.

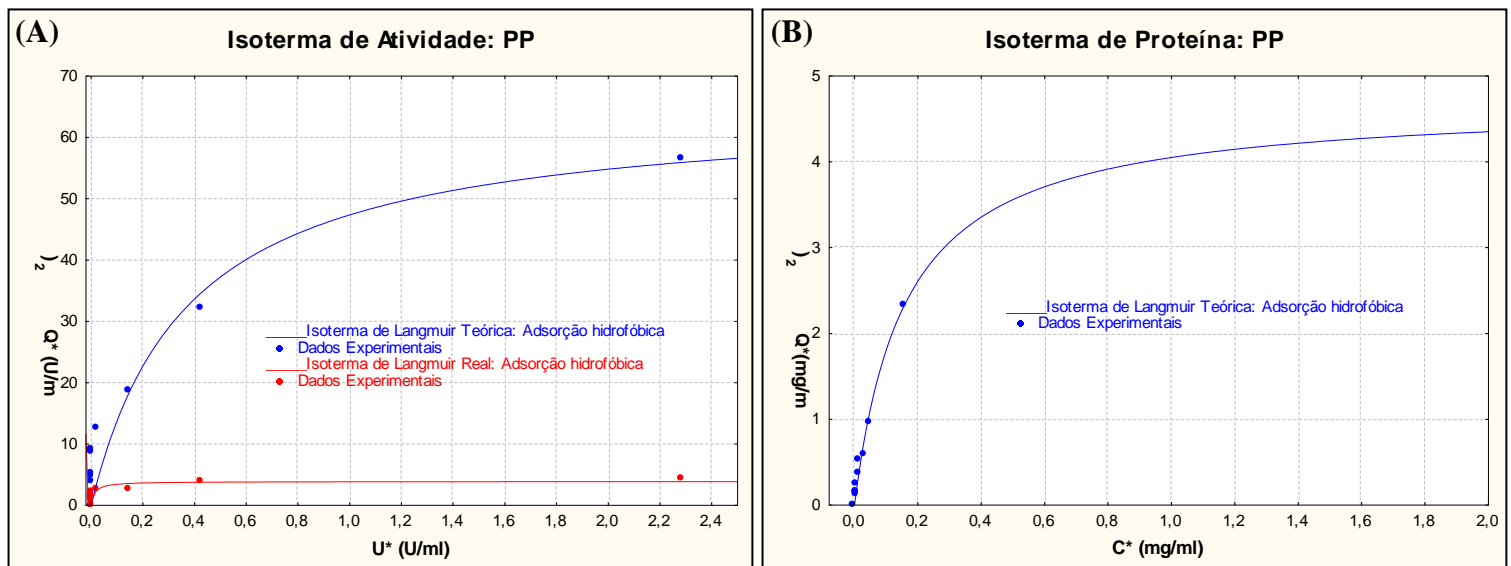


Figura 4.31: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana de polipropileno (PP) a 4°C.

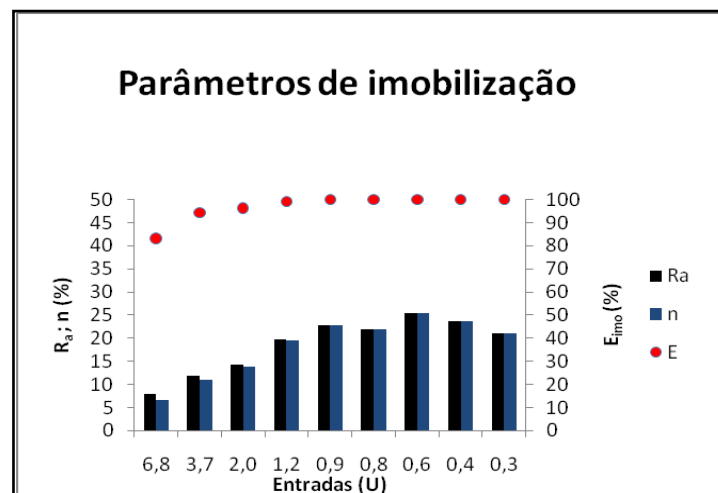


Figura 4.32: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* sobre a membrana de PP a 4°C.

É importante enfatizar que os parâmetros obtidos nas isothermas são importantes para comparações, entretanto não devem ser os únicos analisados para escolha do suporte, já que um dado modelo sempre busca se adequar aos dados experimentais. Os principais problemas que podem levar a inadequação do ajuste são: a adsorção de uma proteína em diversos sítios, tornando o processo de adsorção irreversível; a natureza heterogênea de superfícies sólidas, fazendo com que não ocorra homogeneidade no processo de adsorção e as interações cooperativas entre os sítios de adsorção e os sítios vizinhos, o que no caso de interações negativas pode dificultar o processo de adsorção (Sharma & Agarwal, 2001).

A Tabela 4.8 apresenta os dados obtidos a partir das isotermas de Langmuir geradas para atividade enzimática quando o polipropileno foi utilizado como suporte, tanto na forma de microporos quanto na forma de membrana.

Tabela 4.8: Parâmetros da isoterma de Langmuir, em relação a atividade, obtidos pela imobilização da lipase Amano AK sobre microporos e membranas de polipropileno (PP).

<i>Material/Tipo de isoterma</i>	$Q_{MAX.}(U/m^2)$	$K (mL/mg)$	R^2
Accurel MP 100/Teórica	8,34	0,96	0,972
Accurel MP 100/Real	0,56	—	0,972
Membrana de PP/Teórica	65,07	2,67	0,982
Membrana de PP/Real	3,89	—	0,987

É necessário analisar coerentemente os dados gerados e as curvas ajustadas a fim de evitar conclusões precipitadas prejudicando assim a avaliação correta do processo de imobilização, assim, os campos sem valores na Tabela 4.8 representam valores ajustados de forma não coerente pelo programa utilizado. Daí a necessidade de se conhecer o processo como um todo, pois desta forma o pesquisador tem plena consciência do tipo de comportamento que deve esperara em um determinado ensaio.

Além de uma análise detalhada do processo após o ajuste dos dados experimentais a um determinado modelo de isoterma é importante também avaliar o comportamento real do biocatalisador produzido. Assim, observando-se a Tabela 4.8 é possível concluir que membrana de PP (polipropileno) seria sem dúvida o melhor material para adsorção hidrofóbica quando comparado ao mesmo material na forma microporosa (accurel EP 100). Entretanto, quase não há diferença em relação a atividade real retida na membrana e no pó conforme pode ser observado nas Figuras 4.30 (a) e 4.32. Essa informação deixa claro que, neste caso, as propriedades físico-químicas do material são mais importantes do que a forma de apresentação do mesmo. Assim, o uso de PP, apesar de não apresentar hiperativação com a enzima amano AK pode ser utilizado no processo tanto na forma de pó quanto na de membrana já que os parâmetros que levam em consideração a atividade real do biocatalisador gerado (E e R_a) foram praticamente os mesmos.

Normalmente o processo de imobilização de enzimas sobre PP é sempre via adsorção hidrofóbica, visto que não há grupamentos disponíveis no suporte para

formação da base de Schiff. Nestes casos o que se faz é a introdução de grupos hidrofílicos através de ligação covalente do grupamento amina (NH_2) (Balcão *et al.*, 2010). Esses grupamentos introduzidos em suportes hidrofóbicos podem gerar suportes adequados para estudos de imobilização de enzimas.

Bayramoglu e col. (2010) utilizaram membranas de PP funcionalizadas para imobilização da lipase de *Candida rugosa*. Inicialmente dissolveram o cloreto de polipropileno em tolueno e paralelamente hexametileno diamina em uma mistura de 1:1 de acetona e álcool isopropílico. Posteriormente as soluções foram secas e depois misturadas em atmosfera de argônio em sistema reacional fechado. Após a preparação das membranas (Figura 4.33), as mesmas foram submetidas a reação de ativação do grupo amina através da adição de glutaraldeído, como discutido, posteriormente, em outros suportes, tais como: nylon 6,6 e poli-éter-imida.

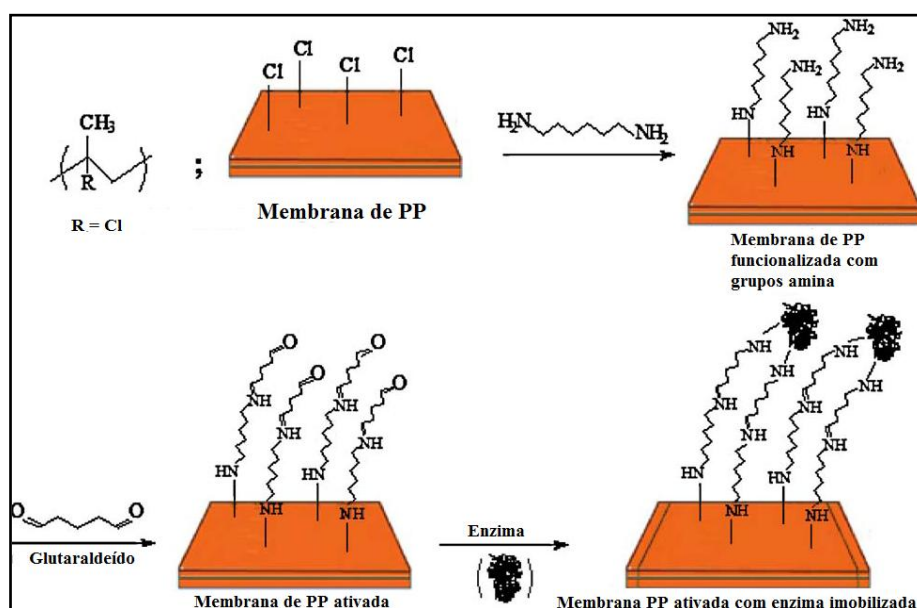


Figura 4.33: Esquema da rota de imobilização enzimática em membranas de PP ativadas com NH_2 (Bayramoglu *et al.*, 2010).

Segundo os autores após o processo de otimização do procedimento de imobilização foi obtido cerca de 70 U/cm^2 de atividade a 40°C para o biocatalisador gerado.

4.3.2. Membranas de Poli (éterimida) (PEI)

Na busca por materiais hidrofóbicos candidatos a suporte para a imobilização enzimática, testou-se a poli(éterimida), que também pode ser utilizada no preparo de membranas pela técnica de imersão-precipitação.

A poli(éterimida), PEI, é um polímero amorfo obtido a partir da policondensação de um dianidrido contendo ligações éter e uma diamina aromática. A unidade imida promove a rigidez, resistências mecânica e térmica, enquanto as ligações contendo o grupo éter conferem flexibilidade às cadeias, o que permite a processabilidade do polímero (Silva, 1996).

A PEI, pertence a classe dos polímeros ou plásticos de engenharia. Normalmente esses polímeros possuem propriedades que competem com materiais metálicos e cerâmicos, apresentam módulo de elasticidade elevado, resistência a temperaturas relativamente altas, tenacidade, alta resistência ao impacto, resistência a abrasão, bom isolamento elétrico, resistência química e à agressão por exposição ao tempo (Silva, 1996).

Nos testes iniciais de imobilização utilizando-se partículas densas do polímero, observou-se, devido a baixa área específica, baixa atividade do biocatalisador gerado. Assim, propôs-se a síntese e caracterização de diferentes membranas microporosas com a PEI. O estudo comparativo entre os materiais foi efetuado em função dos aditivos utilizados. Assim, definida a quantidade de aditivo necessária, neste caso 3%, estudou-se os diferentes tipos de aditivos, a saber: nitrato de lítio, polivinilpirrolidona e uma mistura 1:1 dos dois aditivos anteriores.

A opção em se utilizar um sal inorgânico como aditivo (LiNO_3) baseou-se no trabalho de Borges (1993) que em seus estudos verificou que a baixa massa molar do sal facilita o seu processo de extração durante a precipitação da membrana, diferentemente da polivinilpirrolidona (PVP) que fica parcialmente retida na superfície da membrana, alterando de certa forma as propriedades estruturais da matriz gerada. Além disso, a solubilidade deste sal em água é relativamente alta, fato que contribui ainda mais no seu processo de extração.

Além da imobilização via adsorção hidrofóbica, membranas de PEI também foram utilizadas para imobilizar a lipase de *Pseudomonas fluorescens* via ligação covalente, visto que este polímero apresenta grupamentos disponíveis para a formação de base de

Schiff após o processo de ativação com ácido clorídrico (HCl) o que não era permitido em PP como discutido anteriormente.

Para o processo de imobilização via adsorção hidrofóbica utilizou-se o mesmo protocolo definido para o polipropileno. Assim, inicialmente foram preparadas soluções com diferentes concentrações (proteína e atividade) de entrada a saber: 0,027 a 0,62 mg de proteína/mL e 0,679 a 14 U/mL.

No caso da imobilização por ligação covalente soluções de entrada mais diluídas foram utilizadas a fim de evitar a formação de agregados enzimáticos via ligação cruzadas, definidos com CLEA (Cross Linked Enzymes Aggregates) em função do glutaraldeído presente na membrana.

As Figuras 4.34-4.36 apresentam as isotermas de Langmuir para a imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* sobre membranas de PEI contendo 3% de diferentes aditivos.

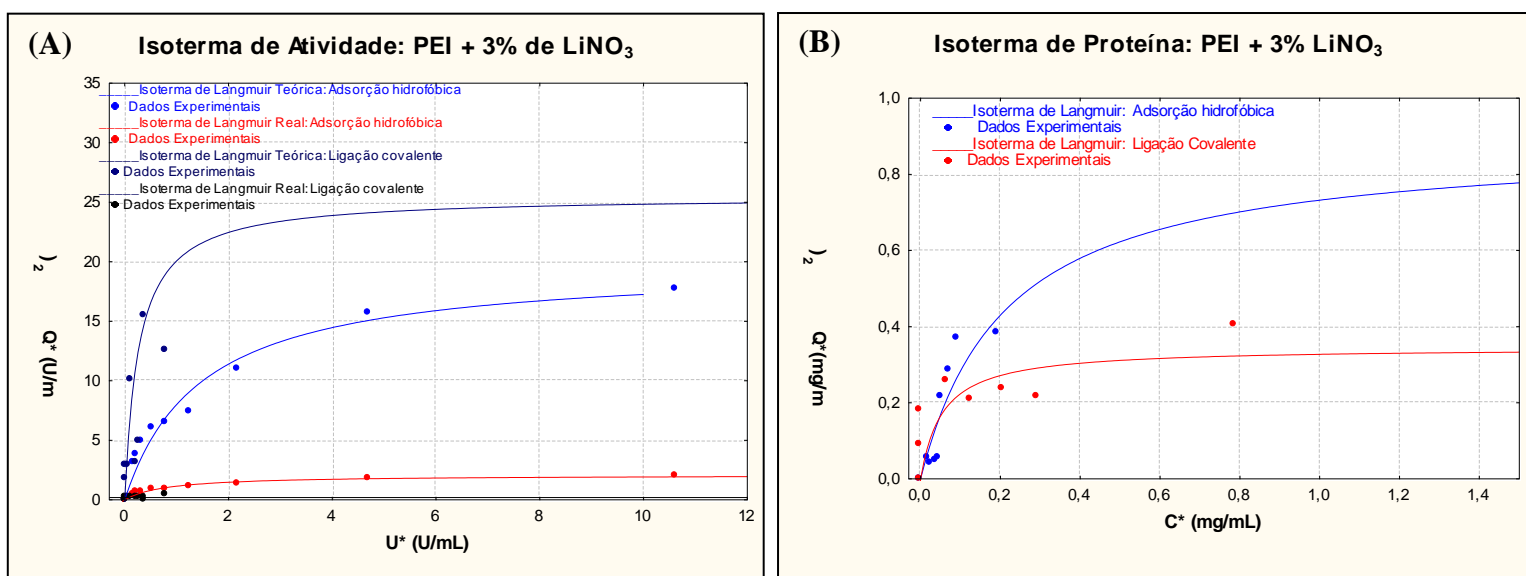


Figura 4.34: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana de PEI contendo 3% de LiNO₃ (PN) a 4°C.

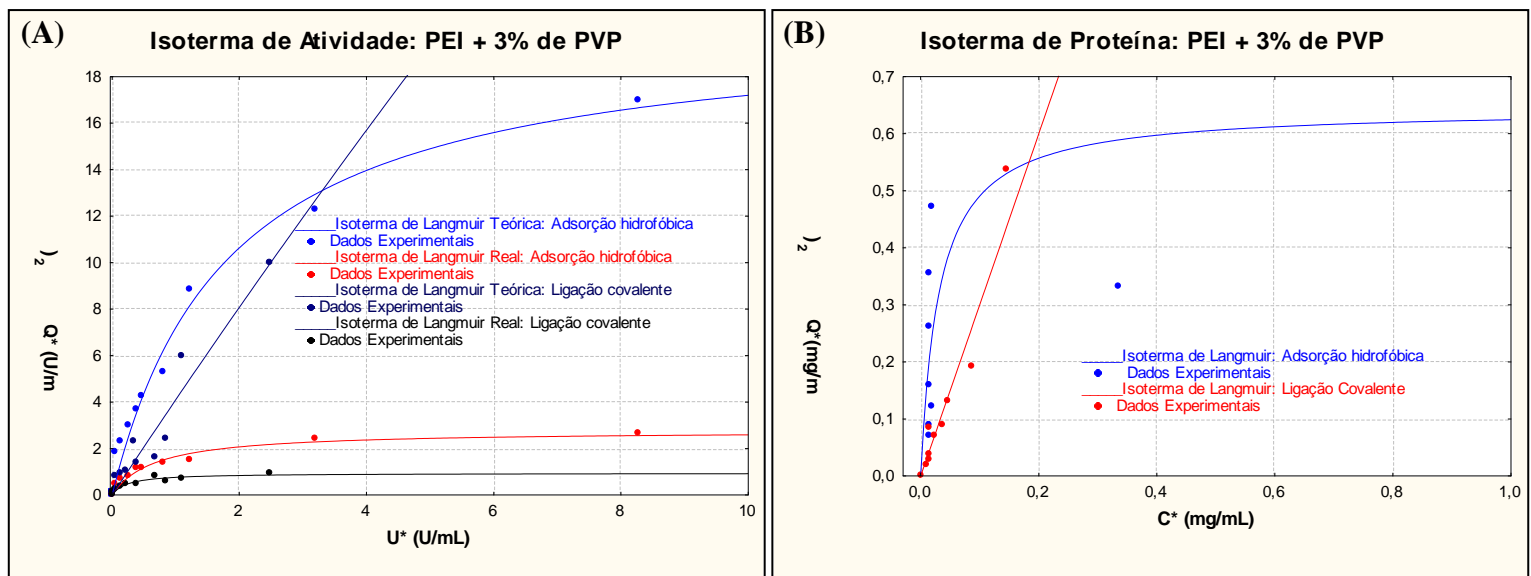


Figura 4.35: Isothermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana de PEI contendo 3% de PVP (PV) a 4°C.

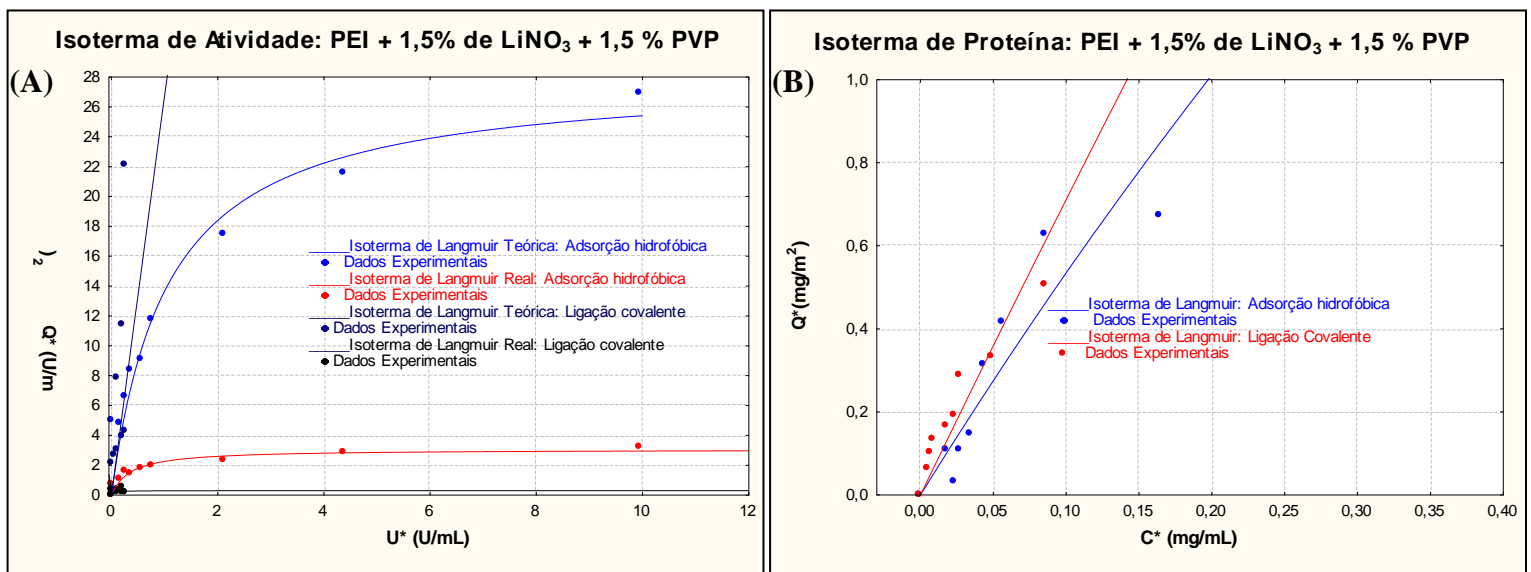


Figura 4.36: Isothermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana de PEI contendo 1,5% de LiNO₃ + 1,5% de PVP (PH) a 4°C.

A Tabela 4.9 sintetiza todos os parâmetros obtidos a partir das isothermas de Langmuir em relação a atividade geradas com a PEI e os diferentes aditivos.

Tabela 4.9: Parâmetros da isoterma de Langmuir, em relação a atividade, obtidos pela imobilização da lipase Amano AK sobre diferentes membranas de PEI através de ligação covalente e adsorção hidrofóbica.

<i>Aditivo/Método de Imobilização</i>	$Q_{MAX.} (U/m^2)$	$K (mL/mg)$	R^2
LiNO ₃ /Adsorção hidrofóbica teórica	19,79	0,68	0,98
PVP/Adsorção hidrofóbica teórica	20,34	0,55	0,99
PVP+ LiNO ₃ /Adsorção hidrofóbica teórica	28,09	0,95	0,99
LiNO ₃ /Adsorção hidrofóbica real	2,56	1,23	0,97
PVP/Adsorção hidrofóbica real	2,76	1,49	0,97
PVP+ LiNO ₃ /Adsorção hidrofóbica real	3,06	2,82	0,98
LiNO ₃ /Ligação covalente teórica	25,5	3,7	0,97
PVP/Ligação covalente teórica	—	0,02	0,96
PVP+ LiNO ₃ /Ligação covalente teórica	—	—	—
LiNO ₃ /Ligação covalente real	0,2	—	—
PVP/Ligação covalente real	0,94	—	0,99
PVP+ LiNO ₃ /Ligação covalente real	—	0,01	—

É possível observar que em relação à adsorção hidrofóbica, praticamente a escolha do aditivo não alterou significativamente os parâmetros dos biocatalisadores gerados. Entretanto ao se imobilizar a lipase de *Pseudomonas fluorescens* via ligação covalente os dados ficam aleatórios e os ajustes prejudicados. Além disso, comparando-se o mesmo suporte é possível observar que no caso de uma imobilização via adsorção hidrofóbica ocorre a perda de aproximadamente 83% de atividade entre a capacidade máxima adsorptiva (Modelo de Langmuir) teórica, que leva em conta apenas as soluções de entrada e saída de imobilização, e a do biocatalisador obtido. Entretanto, cabe ressaltar que em relação à quantidade de proteína adsorvida os suportes contendo aditivos diferenciados apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, suportes com maiores áreas específicas adsorveram uma quantidade maior de proteína. No caso da membrana de PEI contendo 1,5% de PVP e 1,5% de LiNO₃ e a de 3% de LiNO₃ apresentaram comportamento similar, cerca de 40% de adsorção proteica, já a membrana com 3% de PVP mostrou uma capacidade média adsorptiva maior, ou seja, 80%.

Comparando-se os dados relativos à imobilização via ligação covalente, o ajuste ficou prejudicado, entretanto houve um aumento na capacidade adsorptiva dos dois suportes anteriormente discutidos (28% a mais de proteína a mais ficou adsorvida em ambos os suportes).

Na Tabela 4.9 é possível verificar que por se tratar de um processo cujo efeito é menos deletério para a atividade enzimática, as imobilizações via adsorção hidrofóbica foram as que apresentaram melhor comportamento em relação ao ajuste dos dados experimentais ao modelo de Langmuir. Tal fato pode estar baseado na força de ligação entre a enzima e o suporte, já que ao se optar pela ligação covalente a enzima pode desativar devido a perda de sua estrutura terciária, importante no seu desempenho catalítico. Além disso, baseado apenas no modelo de Langmuir, pode-se verificar que o biocatalisador obtido via ligação covalente com a membrana de PEI (3% de LiNO₃) apresentou bons resultados para os parâmetros de interesse, Q_{max} e K . Entretanto, o parâmetro que deve ser levado em consideração é a R_a , que neste caso só foi maior comparado com o processo via adsorção hidrofóbica quando a membrana contendo 3% de PVP foi utilizada como suporte. A este fato pode estar associado uma falha no pré-tratamento do suporte, antes da imobilização, ocasionando regiões onde foi favorecida a adsorção hidrofóbica ao invés da ligação covalente. Além disso, a desativação enzimática durante o processo de imobilização em função da metodologia utilizada pode ter sido menor para este suporte.

Na literatura muitos trabalhos relatam a perda de atividade enzimática quando se utiliza a ligação covalente como processo já que se trata de um processo mais deletério para a enzima. Assim, a ativação com glutaraldeído forma grupos aldeídos no suporte ativado que irão reagir com grupos aminos da enzima por meio de ligações covalentes instáveis (base de Schiff). Embora seja um método de ativação bastante utilizado em imobilizações enzimáticas, ele apresenta alguns problemas, tais como: moléculas de enzima podem ser imobilizadas no suporte com diferentes orientações, ou seja, alteração da estrutura terciária da enzima, tornando o sítio ativo de alguma delas inacessível para grandes substratos (Tardioli *et al.*, 2003); podem ser formadas múltiplas camadas de enzima e/ou aglomerações excessivas das moléculas no interior dos poros, dificultando o acesso ao sítio ativo (Sobral *et al.*, 2002 e 2003); produzem derivados que são poucas vezes mais estáveis que a enzima solúvel; e a alta reatividade e instabilidade dos grupos reativos requerem rápido contato com a enzima, não permitindo estocagem prolongada.

As Figuras 4.37-4.39 apresentam os parâmetros de imobilização reais obtidos a partir dos biocatalisadores produzidos seguindo as duas metodologias testadas.

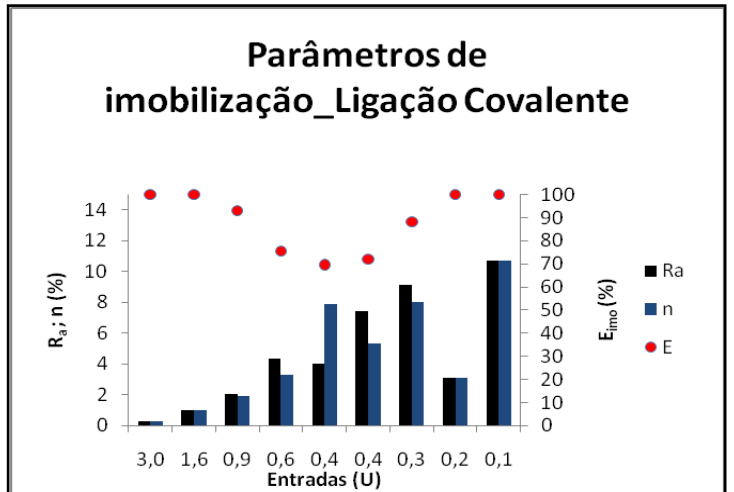
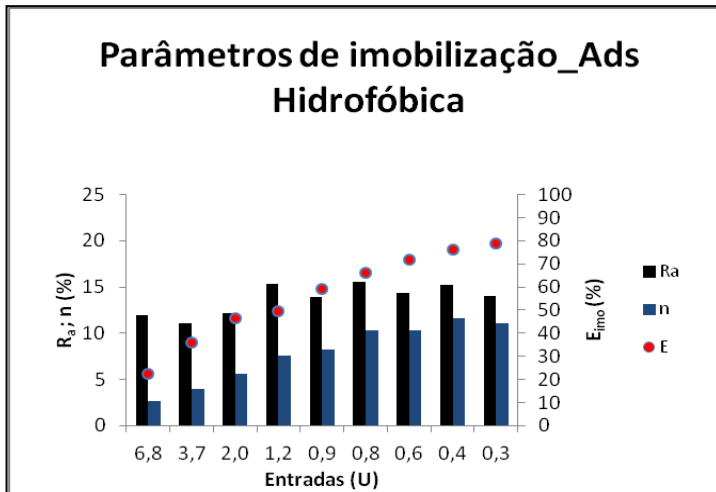


Figura 4.37: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase *de Pseudomonas fluorescens* sobre a membrana de PEI contendo 3% de LiNO_3 (PN) a 4°C.

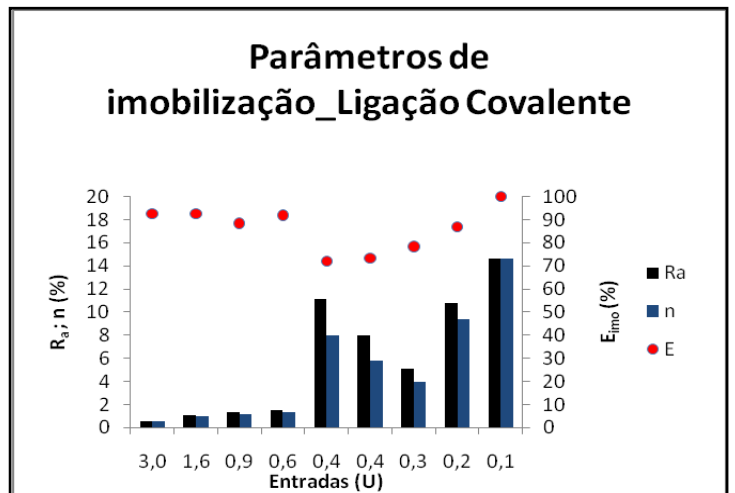
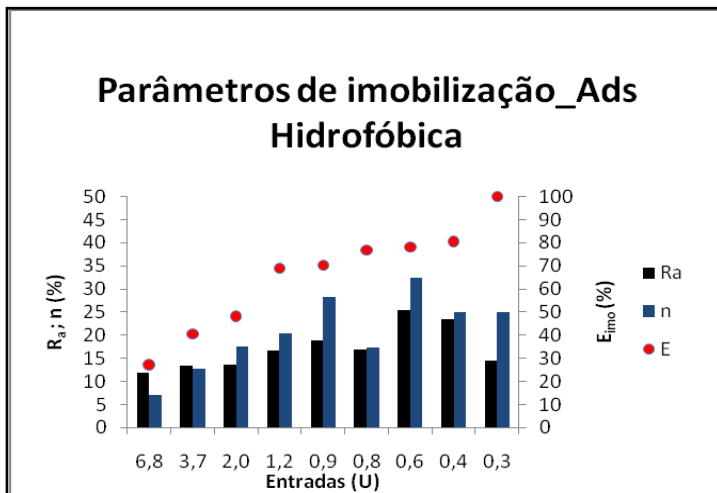


Figura 4.38: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase *de Pseudomonas fluorescens* sobre a membrana de PEI contendo 1,5% de LiNO_3 e 1,5% de PVP (PH) a 4°C.

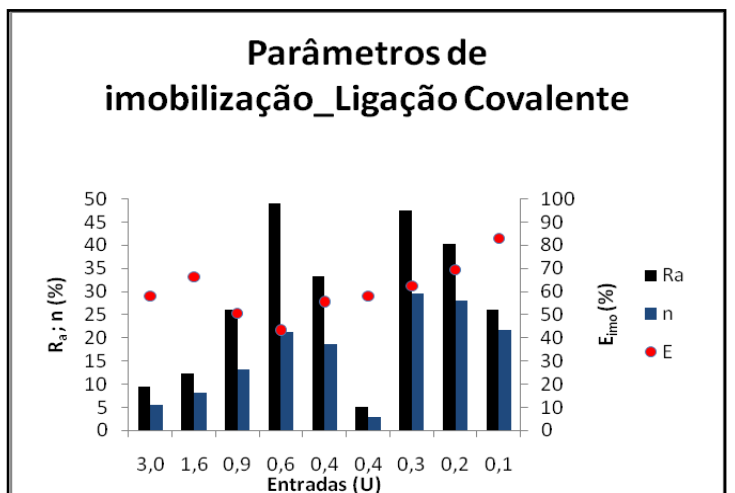
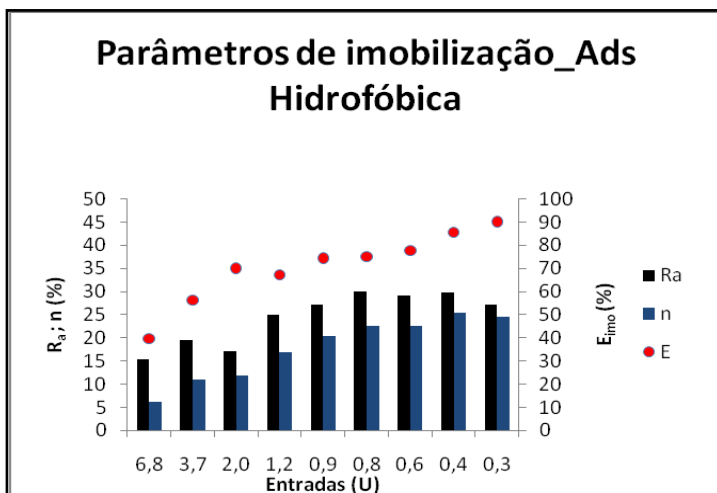


Figura 4.39: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase *de Pseudomonas fluorescens* sobre a membrana de PEI contendo 3% de PVP (PV) a 4°C.

As Figuras 4.37-4.39 demonstram, como confirmado pelas isotermas geradas, que após o processo de imobilização via ligação covalente que a enzima perde atividade consideravelmente. Os valores de retenção obtidos são mais baixos quando comparados aos gerados por um biocatalisador produzido via metodologia de adsorção hidrofobia. Além disso, verificou-se também que soluções menos concentradas na entrada do processo de imobilização, principalmente quando se utilizou ligação covalente, geraram biocatalisadores mais ativos, provavelmente pela não ocorrência de “*overcrowding*”.

De uma forma geral, independente do suporte (PP ou PEI), os valores de retenção de atividade foram muito similares, entre 15-20 %, a não ser para o biocatalisador gerado com a membrana contendo 3% de PVP, cujo valor atingiu 25%. Interações entre o PVP e a estrutura polimérica podem explicar esse resultado, visto que o PVP não é 100% removido após a confecção da membrana, desta forma, o mesmo pode ter agido sinergeticamente no aumento de R_a .

A presença do PVP na solução polimérica precursora proporciona à membrana uma característica hidrofílica, que se torna muito importante em aplicações industriais com soluções protéicas, pois se sabe que materiais hidrofílicos são menos susceptíveis à adsorção de proteínas. Estas membranas são bastante interessantes quando se trabalha com soluções aquosas de um modo geral, pois se obtém maiores fluxos permeados (Di Luccio, 1997; Perreira 1999; Carvalho 2005). A presença deste aditivo melhorou o processo de adsorção *via* ligação covalente (retenções de atividade próximas de 50%), já que o PVP diferentemente do outro aditivo permanece na estrutura e também deve reagir com o glutaraldeído favorecendo a reação com a enzima.

Merçon e col. (2000) utilizaram membranas de PEI para imobilização da lipase de *Mucor miehei* via adsorção hidrofóbica para hidrólise de óleo de babaçu. Diferentemente deste trabalho, a imobilização da enzima proposta pelos autores foi contínua ao longo de um reator de fibras ocas e, segundo os mesmos, quanto maior foi à concentração de enzima disponibilizada para imobilização, maior a quantidade de material adsorvido ao longo das fibras. Além disso, o tempo de imobilização para atingir saturação segundo o modelo de Langmuir foi de apenas 30 minutos. Neste tempo os autores obtiveram um biocatalisador com cerca de $19,5\text{g/m}^2$ em termos de Q_{max} e atividade de 16,3 U.

Com o objetivo de verificar o efeito da mudança da lipase sobre o valor de retenção de atividade do biocatalisador gerado a lipase de *Candida antarctica* fração B

foi imobilizada via adsorção hidrofóbica sobre a membrana de PEI contendo 3% de LiNO_3 . A faixa de concentração em termos de atividade foi de 1-90 U/mL e os dados também se adequaram ao modelo de Langmuir com R^2 maior que 90%. A Figura 4.40 apresenta os parâmetros de imobilização do biocatalisador gerado.

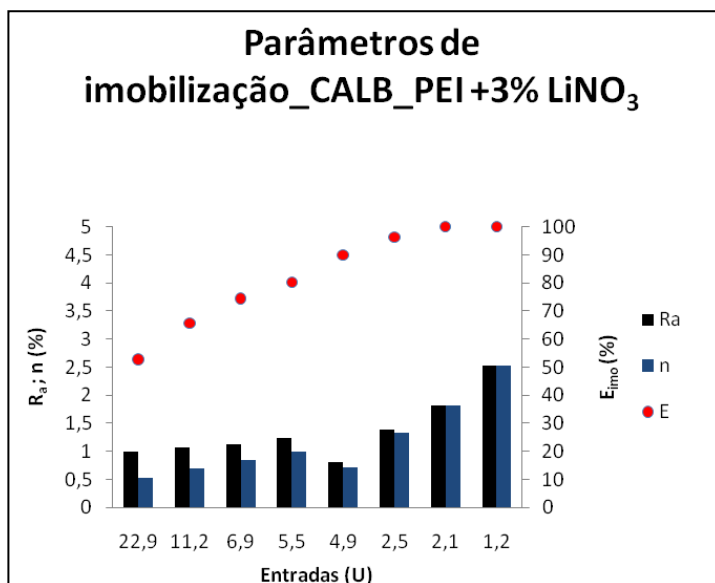


Figura 4.40: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase *de Candida antarctica* fração B (CAL-B) sobre a membrana de PEI contendo 3% de LiNO_3 (PN) a 4°C.

Pode-se verificar que a perda de atividade em relação a CALB é muito maior que em relação a Amano AK, primeiramente porque foram utilizadas maiores concentrações nas soluções de entrada, intensificando o fenômeno de *overcrowding* e, além disso, a própria lipase pode ser mais suscetível a desativação da enzima durante a imobilização, dificultando a exposição do sítio ativo, que é mais ocluso (localizado numa fenda estreita) na estrutura da CAL-B (Freire e Castilho, 2008).

4.3.3. Membranas de Nylon 6,6

A fim de obter-se um biocatalisador com maior retenção de atividade (R_a) membranas de nylon 6,6 foram testadas como suporte. Manjon e col. (1991) observaram que este suporte, em função de suas características, permite uma melhor

expressão da atividade enzimática desde que uma elevada porcentagem de enzima esteja imobilizada na interface.

Este suporte tem sido utilizado para imobilização enzimática via ligação covalente para hidrólise enzimática de muitos substratos (Manjon *et al.*, 1991; Carneiro da Cunha *et al.*, 1999).

A Figura 4.41 apresenta as isotermas de adsorção, proteína e atividade, da enzima Amano AK na membrana de nylon via adsorção hidrofóbica e ligação covalente.

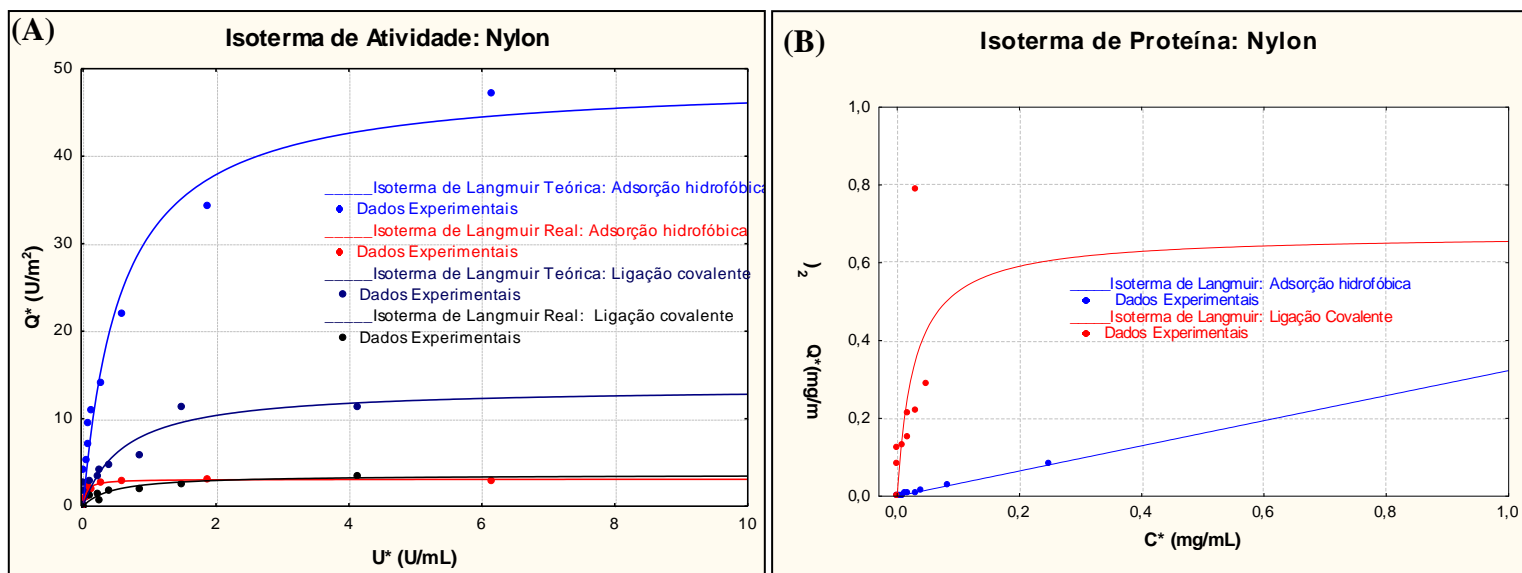


Figura 4.41: Isotermas de adsorção (A) para os dados experimentais de atividade (0,679-14 U/mL) (B) para os dados experimentais de proteína (0,027-0,62 mg/mL), ambas em membrana Nylon 6,6 (N) a 4°C.

Apesar de uma quantidade menor de proteína adsorvida sobre a membrana de nylon é possível observar que os valores em relação a quantidade máxima de atividade retida são muito próximos. A Tabela 4.10 representa os parâmetros calculados a partir da isoterma de atividade (Figura 4.41 (a)).

Tabela 4.10: Parâmetros da isoterma de Langmuir, em relação a atividade, obtidos pela imobilização da lipase Amano AK sobre membrana de nylon 6,6 através de ligação covalente e adsorção hidrofóbica.

<i>Material/Tipo de ligação</i>	$Q_{MAX.}(U/m^2)$	$K(mL/mg)$	R^2
Nylon Teórica/Ads. Hidrofóbica	48,72	1,75	0,914
Nylon Real/Ads. Hidrofóbica	3,09	—	0,932
Nylon Teórica/Ligação Covalente	13,59	1,61	0,973
Nylon Real/ Ligação Covalente	3,59	2,28	0,967

A Figura 4.42 representa os parâmetros de imobilização real obtidos a partir dos biocatalisadores produzidos seguindo as duas metodologias adotadas.

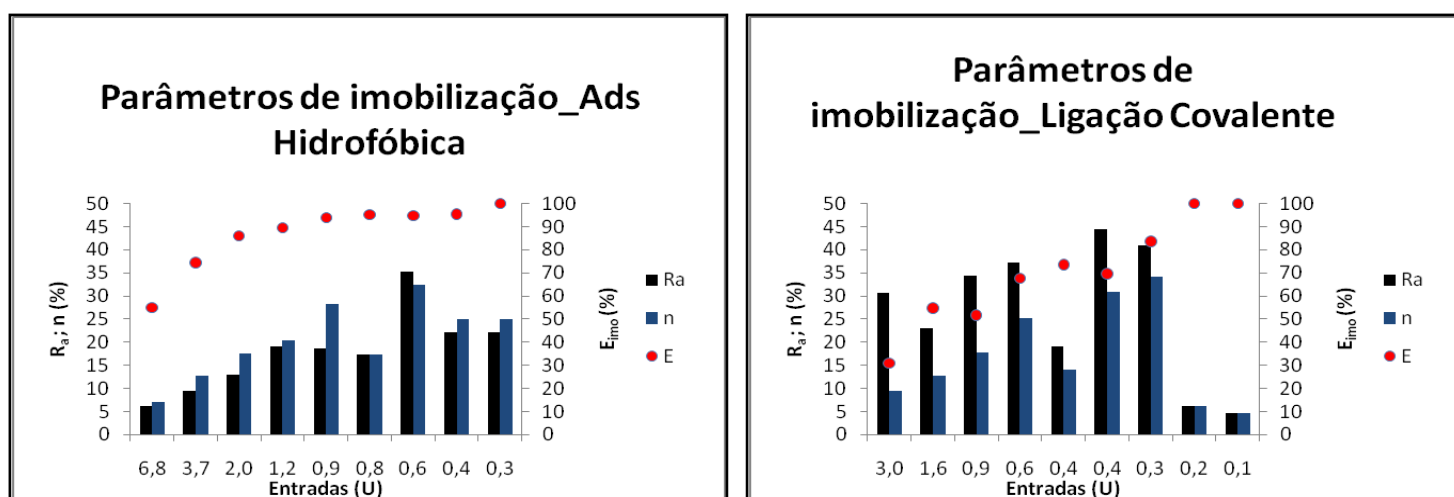


Figura 4.42: Parâmetros de imobilização do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* sobre a membrana de nylon 6,6 (N) a 4°C.

Dentre os suportes testados o nylon foi o que apresentou maior constante de afinidade bem como retenção de atividade ao utilizar-se como metodologia de imobilização o processo via ligação covalente. A adsorção hidrofóbica gerou valores similares aos obtidos com os outros suportes testados, não apresentando nenhuma diferenciação significativa. Os baixos valores de R_a para soluções mais diluídas no processo *via* ligação covalente demonstram que pode ter havido grande perda de atividade durante o processo de imobilização. Cabe ressaltar que a quantidade de proteína adsorvida em ambas as metodologias foi em média de 80% para ambos os processos, entretanto a imobilização via ligação covalente apresentou melhores resultados de retenção de atividade ($R_a > 35\%$), indicando que para este suporte a interação covalente é o processo mais adequado.

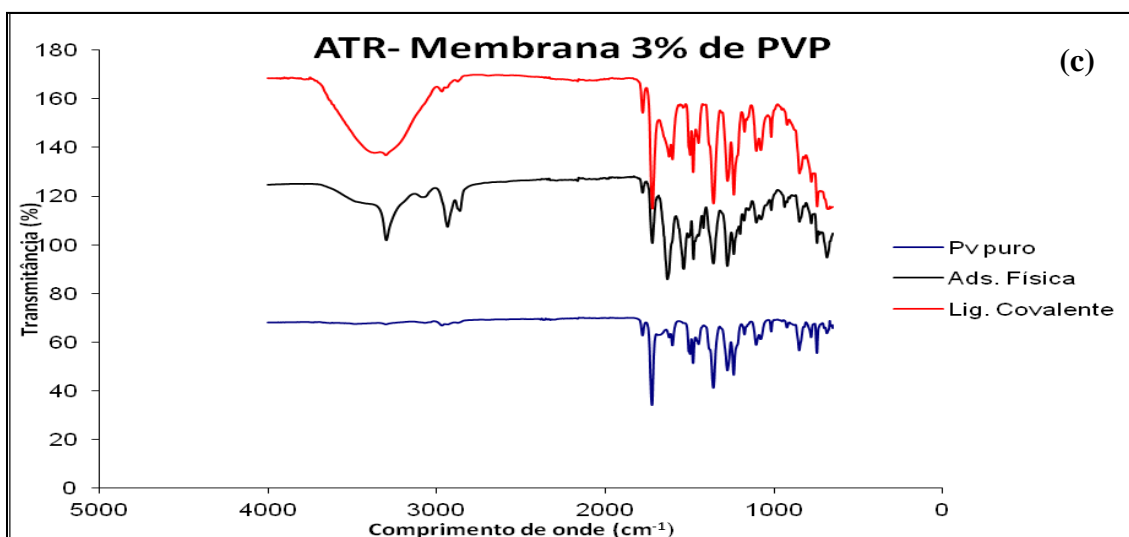
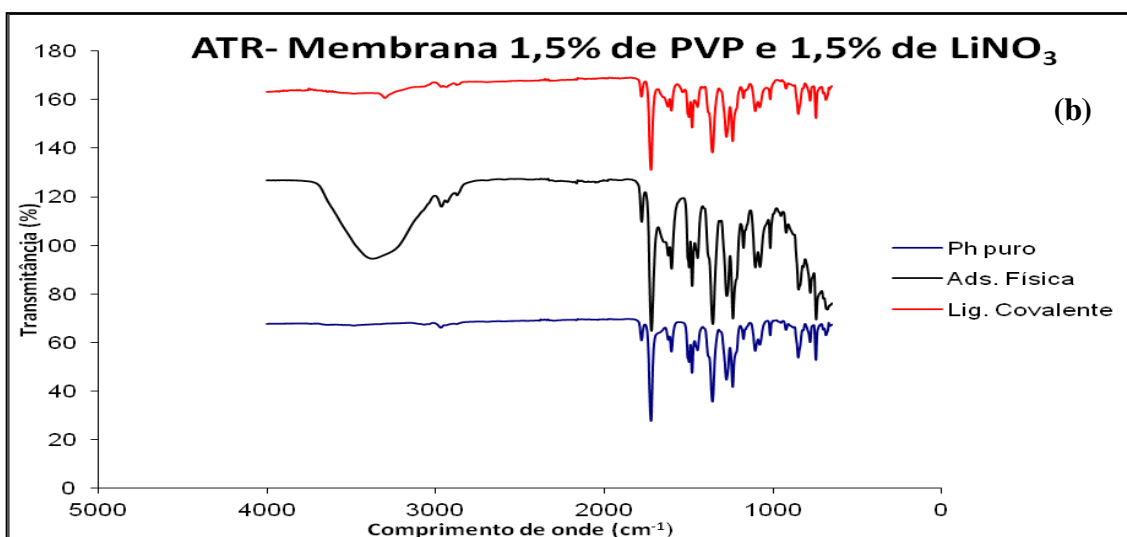
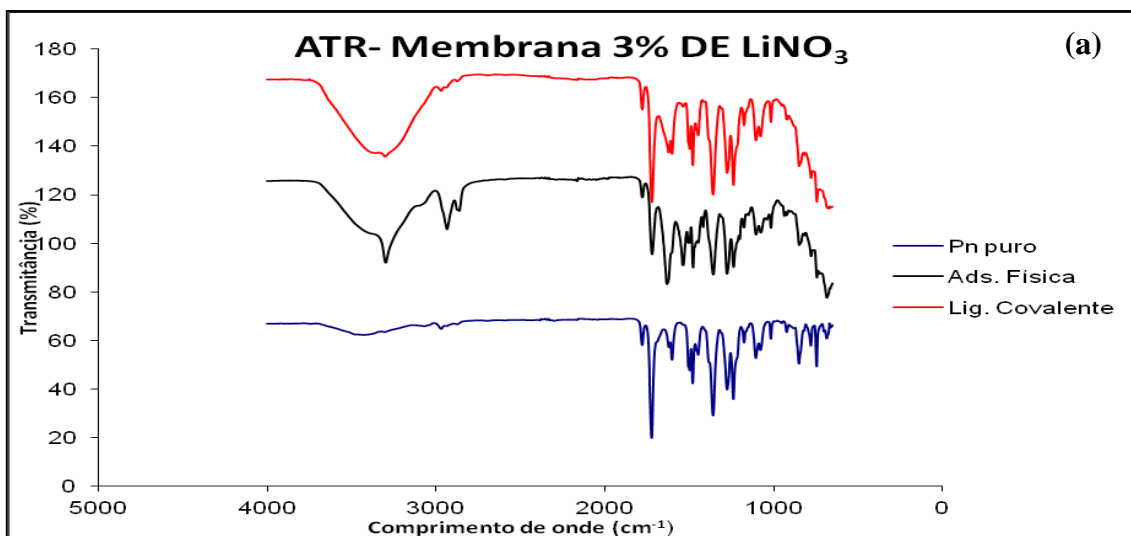
Bruno e col. (2004) utilizando membrana de nylon (1 cm²) para imobilizar uma lipase de *Mucor miehei* e obtiveram cerca de 199 U/ g de suporte com uma retenção de aproximadamente 8% de proteína.. Neste trabalho os autores verificaram que a melhor imobilização foi gerada ao se utilizar polietilenoimina para fazer a ligação covalente entre suporte e enzima, entretanto há uma elevada queda de retenção de atividade após o primeiro ciclo (80 %) e até o quarto ciclo de reuso foram perdidos 98% de atividade. Segundo os autores há uma perda de atividade muito maior quando o processo de imobilização seguiu o mesmo protocolo deste trabalho, após o terceiro ciclo de uso o biocatalisador já havia perdido 96% de atividade.

De uma forma geral, os biocatalisadores gerados ao serem utilizados na resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-IPG apresentaram conversões abaixo de 4% e elevada perda de atividade. Por este motivo a lipase liofilizada foi apenas confinada em um reator de membrana, pois desta forma se garantiu 100% de atividade retida no início do processo.

4.4. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

As análises por espectrometria de infravermelho foram realizadas com o objetivo de investigar o aparecimento de bandas características de grupos químicos resultantes da reação de adsorção física ou ligação covalente da lipase de *Pseudomonas fluorescens* com o material polimérico testado como suporte.

A Figura 4.43 representa os espectros obtidos dos materiais testados como suporte para imobilização enzimática, a saber: nylon 6,6, poli(éter imida) com 3% de PVP (PV), poli(éter imida) com 3% de nitrato de lítio (PN), poli(éter imida) com 1,5% de PVP e 1,5% de nitrato de lítio (PH) e polipropileno (PP).



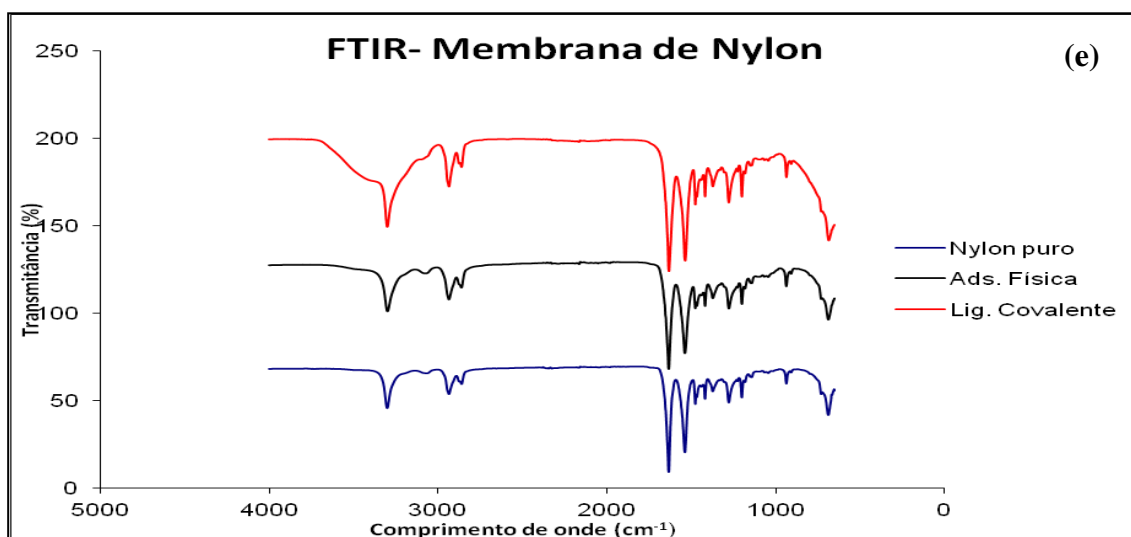
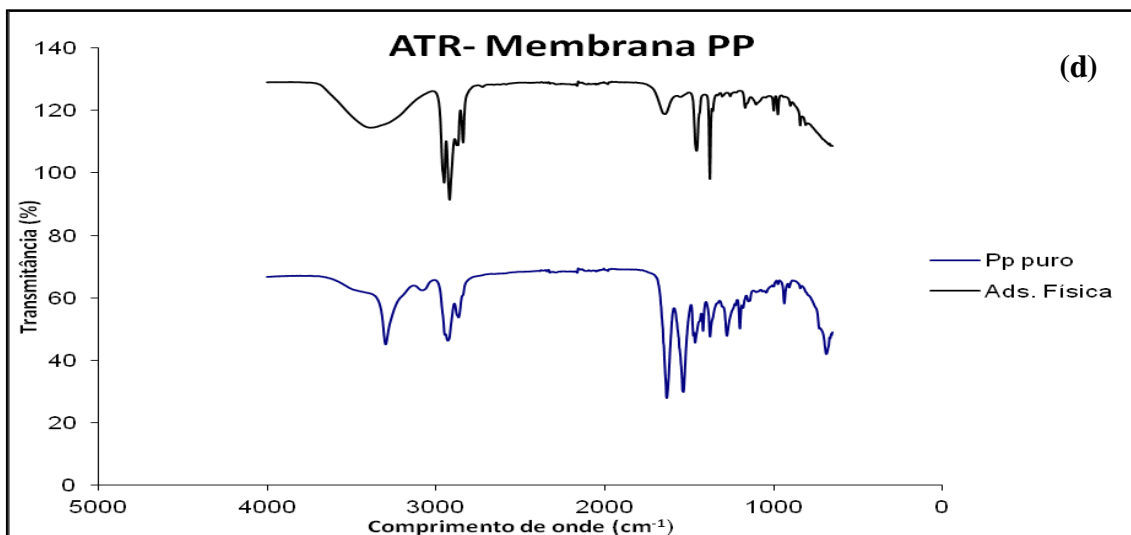


Figura 4.43: Espectro de infravermelho na faixa de 0 a 5000 cm^{-1} para diferentes materiais utilizados como suporte para imobilização enzimática, a saber: (a) PEI+3% de LiNO_3 , (b) PEI+1,5% de PVP+1,5% de LiNO_3 , (c) PEI+3% de PVP, (d) Membrana de polipropileno e (e) membrana de nylon.

A Tabela 4.11 apresenta para a PEI, PP e Nylon os comprimentos relativos às bandas características de grupos funcionais presentes nestes polímeros. Estas bandas são observadas nos espectros apresentados na Figura 4.43.

Tabela 4.11: Comprimento de onda (λ) relativo às bandas características de determinados grupos funcionais presentes nas moléculas da PEI, PP e nylon 6,6.

Material	Grupos funcionais	λ (cm^{-1})
PEI	C = O	1722
	C - N	1356
	C - O- C	1274
PP	CH/CH ₂ /CH ₃	2850-2980
	C - C	1167
	C - H	890
Nylon 6,6	N- H	3300
	C-H ₂	2930-2860
	C = O	1365
	C - N	1416

Normalmente, a lipase livre apresenta um espectro típico, ou seja, bandas na faixa de 1650 cm^{-1} (amina primária) e 1600 cm^{-1} (amina secundária). Na Figura 4.43 (acc.) é possível observar que quando a lipase foi adsorvida hidrofobicamente no suporte houve o aparecimento de uma banda na faixa de 3400 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H ou da ligação N-H, provavelmente, devido a presença de água ou material protéico nos suportes analisados. Comparando-se assim os materiais obtidos a partir da PEI é possível verificar que de fato há uma modificação no espectro que, provavelmente, está relacionada a ligação da lipase ao suporte (introdução da banda da amina secundária no suporte). No caso da ligação covalente é possível verificar que a modificação nesta região foi menos intensa, como esperado para adsorção na forma de monocamada.

Devido a impossibilidade de se efetuar a ligação covalente da enzima com o polipropileno (PP) o uso da adsorção hidrofóbica foi a única alternativa. Neste caso é possível verificar mais claramente a mudança na faixa entre $1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$, comprovando que de fato houve a imobilização da enzima.

No caso da membrana de nylon 6,6 a alteração principal foi observada no espectro do suporte em que a adsorção foi efetuada por ligação covalente. Em princípio, o glutaraldeído (utilizado no pré-tratamento da membrana) pode reagir com o nitrogênio do grupo amida, criando sítios de fixação para a proteína. Por outro lado, a característica mais hidrofílica do nylon pode ter desfavorecido as interações hidrofóbicas da proteína

com o suporte, reduzindo a quantidade adsorvida. Entretanto, a membrana reteve atividade nas duas condições sob a qual foi exposta.

4.5. Termogravimetria (TG)

A fim de verificar outras diferenças estruturais, decorrentes dos diferentes aditivos utilizados, as membranas de PEI foram submetidas a uma análise termogravimétrica onde se acompanhou a perda de massa das amostras em função do aumento da temperatura. As curvas de termogravimetria das amostras são apresentadas na Figura 4.44.

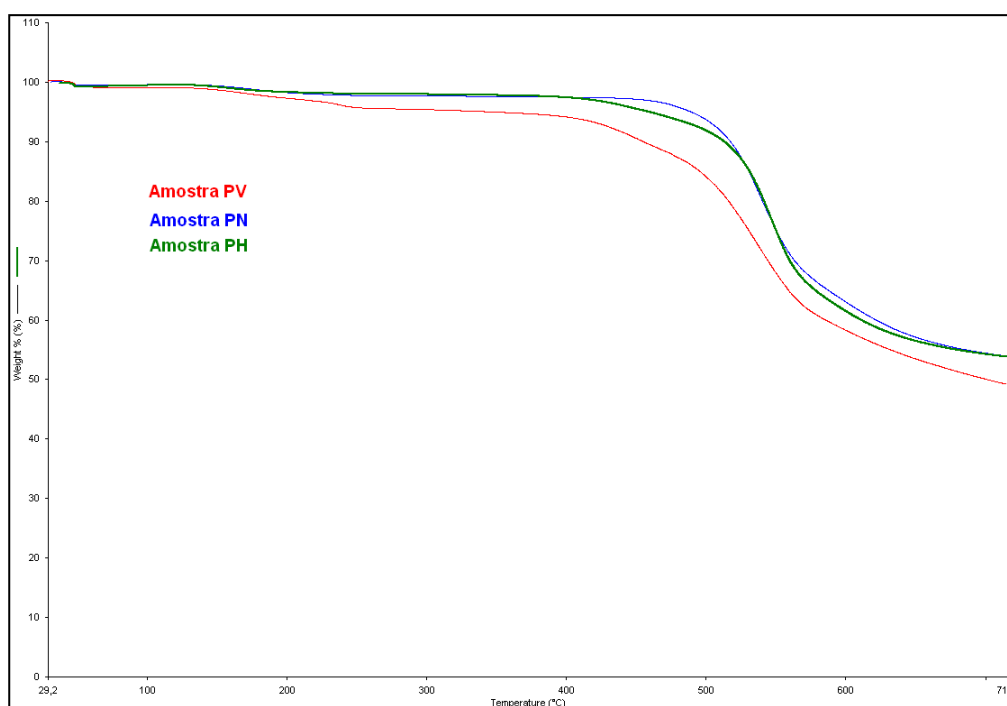


Figura 4.44: Análise termogravimétrica das membranas de PEI com diferentes aditivos.

A análise da Figura 4.44 mostra que membrana que foi preparada com nitrato de lítio (PN) apresenta variação de massa correspondente a degradação térmica da PEI. As membranas preparadas com PVP como aditivo, por outro lado, apresentaram duas regiões de perda de massa, correspondente ao PVP e ao PEI. A maior quantidade de PVP na solução utilizada para o preparo da membrana proporcionou uma intensificação da perda de massa correspondente a degradação térmica deste polímero. Estes resultados demonstram que o PVP permanece na estrutura da membrana e pode conferir características mais hidrofílicas a membrana resultante.

4.6. Reator enzimático assistido por membranas

Para possibilitar o escalonamento do processo de resolução enantiosseletiva de misturas racêmicas, investigou-se a utilização de reatores assistidos por membranas. O principal objetivo é a remoção do produto gerado pela reação enzimática na fase orgânica, para isto, optou-se em utilizar a extração para a fase aquosa. A membrana foi utilizada para manter as fases em contato, mas evitar a dispersão entre elas.

Os ensaios iniciais foram desenvolvidos sem a presença da enzima e em um reator do tipo batelada dividido em dois compartimentos distintos, um para fase orgânica (acetato de etila ou tolueno) e outro para a aquosa (tampão fosfato de sódio 50 mM com pH = 7), separados por uma membrana microporosa, inicialmente de nylon (área= 3,5 cm², diâmetro de poro = 1,83µm). De cada lado do reator foi adicionado 140 mL (solvente/tampão), a concentração do álcool em tolueno foi de 5,8 mM, enquanto que em acetato de etila foi de 4,88 mM. Estes solventes foram os mais eficientes na resolução do éster nos ensaios cinéticos. Já para o éster essa concentração foi cerca de 4,7 mM em ambos os solventes testados. Para determinar o fluxo do álcool através da membrana, acompanhou-se através de CG sua concentração na fase aquosa e na fase orgânica. A solubilidade do éster (octanoato de *(R,S)*-IPG) na água pode ser considerada nula e sua concentração permanece constante na fase orgânica. As Figuras 4.45-4.46 representam esse acompanhamento em acetato de etila e tolueno, respectivamente.

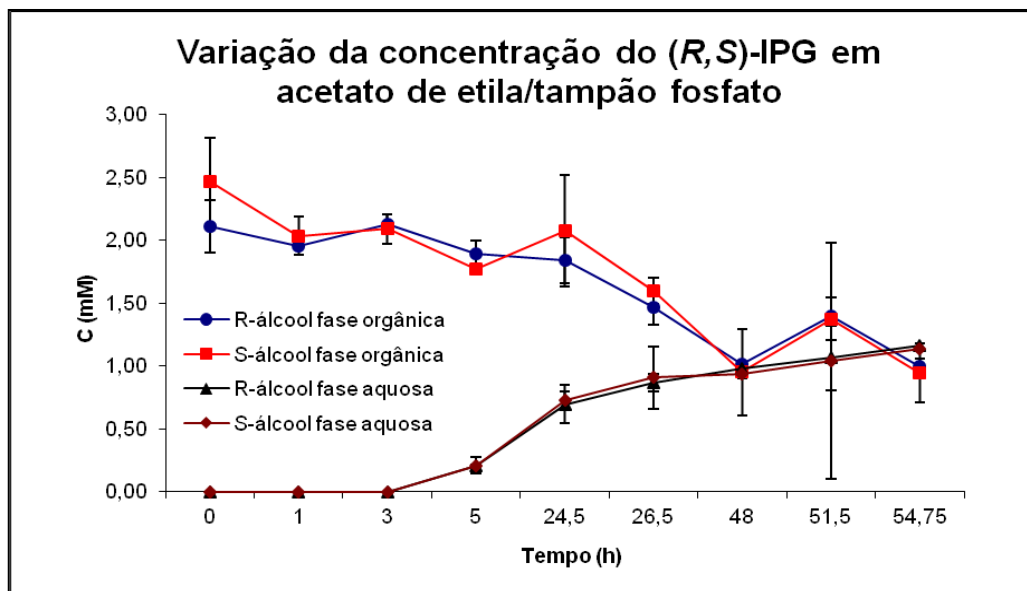


Figura 4.45: Variação da concentração do (S)-IPG e (R)-IPG na fase aquosa e na fase orgânica (acetato de etila). Sendo a concentração inicial de (R,S)-IPG na fase orgânica de 4,88 mM, volume das fases igual a 140 mL e temperatura do processo igual a 23°C.

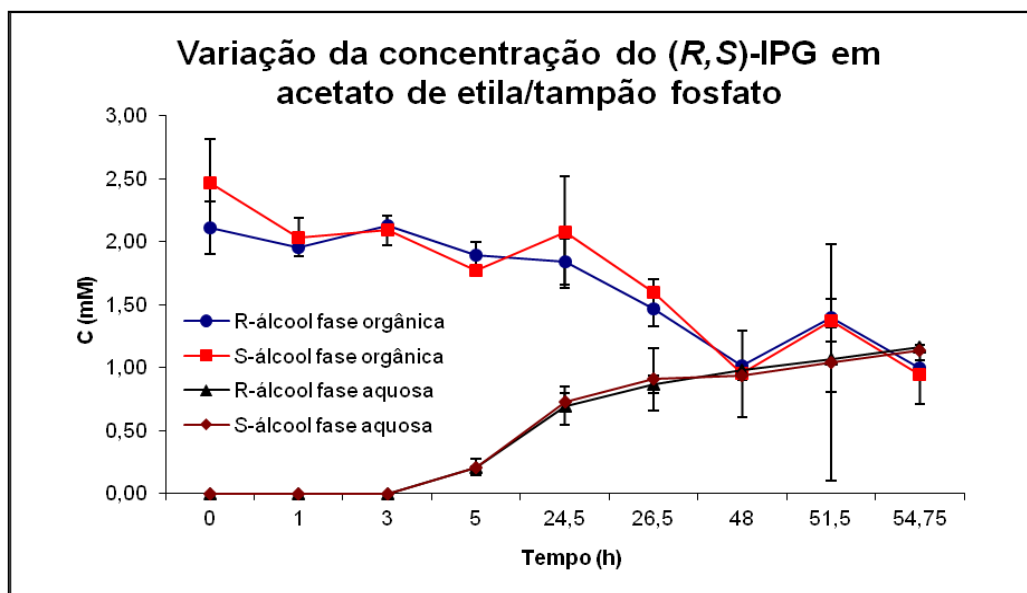


Figura 4.46: Variação da concentração do (S)-IPG e (R)-IPG na fase aquosa e na fase orgânica (tolueno). Sendo a concentração inicial de (R,S)-IPG na fase orgânica de 5,88 mM, volume das fases igual a 140 mL e temperatura do processo igual a 23°C.

Comparando-se as Figuras 4.45 e 4.46 é possível verificar que a transferência do álcool para a fase aquosa (tampão fosfato) foi mais rápida quando tolueno foi utilizado como solvente. O fato da transferência de massa do álcool ser mais rápida em tolueno está relacionada a sua maior hidrofobicidade, ou seja, menor afinidade com o álcool. Tal fato pode ser comprovado também por meio dos valores dos coeficientes de partição do

álcool entre o solvente e a fase aquosa, 0,16 e 1,09 para o tolueno e acetato de etila, respectivamente.

É importante mencionar também que nestes experimentos a temperatura utilizada foi a ambiente (23°C). Além disso, agitação foi fornecida ao sistema por meio de agitadores magnéticos, a fim acelerar a transferência de massa nas regiões adjacentes a superfície da membrana.

Estes ensaios serviram apenas para o dimensionamento de um reator com recirculação das fases e maior área de permeação. Para tanto, foi necessário a obtenção de alguns dados experimentais, como o fluxo do álcool através da membrana e a taxa de reação.

Desta forma, o contactor de membranas consistiu de um módulo com membranas planas dividido em várias sessões, cada qual com área nominal de membrana em torno de 19,64 cm² e volume morto de 5,9 cm³. A metodologia aplicada no desenvolvimento deste sistema seguiu os mesmos propósitos do sistema do com apenas uma membrana. A Figura 4.47 apresenta o sistema utilizado para a reação e separação do octanoato de (R,S)-IPG. Membranas comerciais de nylon foram utilizadas no processo, e devido a baixa retenção de atividade após a imobilização da lipase Amano AK. Desta forma, a lipase foi mantida apenas confinada no reator pela membrana, que impediu a permeação da enzima para fase aquosa.

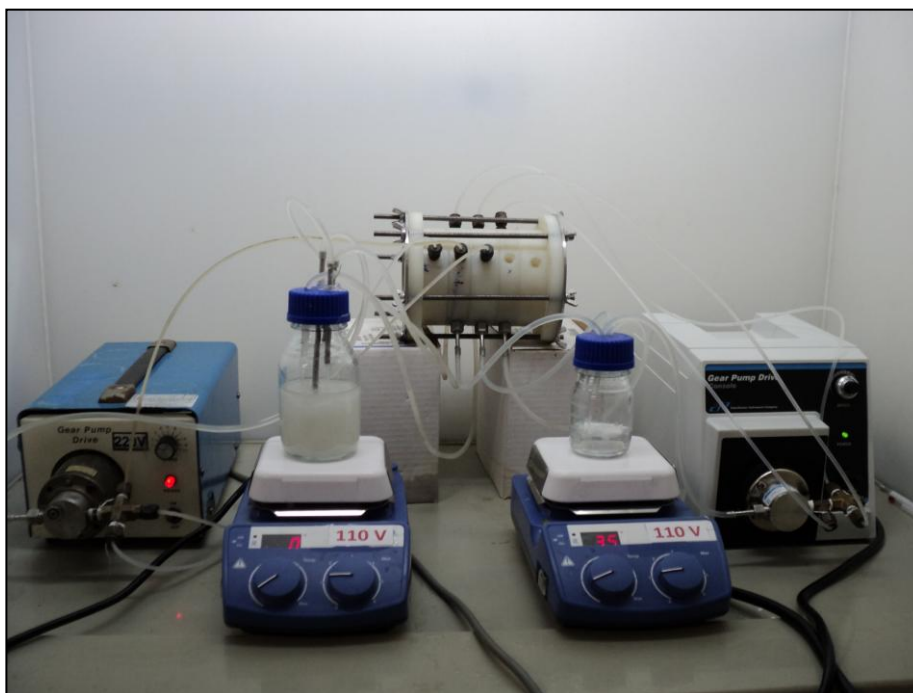


Figura 4.47: Sistema de contactores de membranas utilizado na resolução racêmica do éster octanoato de (R,S)-IPG.

Os ensaios com módulo foram conduzidos com vazão de 2 mL/s, tanto para fase orgânica, quanto para a aquosa. Entretanto, verificou-se que houve a mistura entre as fases, o que foi atribuído a diferença de pressão entre os dois lados da membrana ocasionada pelo escoamento das fases aquosa e orgânica. Para que não haja mistura de fases em um processo que utiliza membrana como contactor, deve-se obedecer a relação de La Place:

$$\Delta P \leq (2 * \sigma) / R_p \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde: ΔP = Diferença de pressão entre os dois lados da membrana; [dina/cm²]

R_p = Raio do poro; [cm]

σ = Tensão interfacial; [dina/cm]

Para os solventes estudados as tensões interfaciais foram de 6,8 dina/cm e 36,1 dina/cm para o acetato de etila e tolueno, respectivamente (Donahuaen e Bartell, 1961). Baseado nos valores de tensões superficiais e no tamanho médio do poro da membrana de nylon, (0,92 μ m), observa-se que da vazão fornecida pela bomba irá ocorrer mistura entre as fases.

Para evitar a mistura das fases as opções seriam a utilização de outro solvente ou de membranas com menor tamanho de poros. A troca do solvente necessitaria uma nova otimização das condições de reação e a utilização de membranas com poros menores apresenta a dificuldade de fornecimento comercial. Desta foram, optou-se em utilizar uma membrana composta de PEI recoberta por uma camada densa e fina PVA, preparada no Laboratório de Processos com Membranas. A escolha por este material se deu pelo fato do mesmo ser um polímero hidrossolúvel, com baixo potencial a formação de incrustações, quimicamente estável e de baixo custo. Ademais, utilizando-se uma membrana densa de PVA, o valor de ΔP poderia ser igual ou até mesmo maior do que o que estava sendo utilizado anteriormente. O PVA por ser hidrofílico incha na presença de água, possibilitando a passagem, por difusão, da molécula de álcool, com maior afinidade pela água.

Para os testes com reação e separação simultâneas, utilizando a membrana de PVA/PEI, a temperatura foi mantida a 30°C e as vazões da fase aquosa e da fase orgânica foram de 5,14 e 6,4 L/h, respectivamente. Empregaram-se três sessões no contactor de membranas, correspondendo a uma área de permeação de 58,92 cm². Os

volumes de fase orgânica e aquosa foram 200 e 50 mL, respectivamente, e a concentração inicial do substrato cerca de 4mM. Os frascos contendo as fases aquosa e orgânica foram mantidos fechados para evitar evaporação do solvente. A quantidade de enzima adicionada na fase orgânica foi de 166 mg, correspondendo a cerca de 30 U. Para a dispersão da enzima foi adicionado 10% em volume de solução tampão, formando um sistema emulsionado.

A Figura 4.48 apresenta o perfil de concentrações nas fases aquosa e orgânica, enquanto a Figura 4.49 apresenta a resolução enantiomérica do octanoato de (*R,S*)-IPG em acetato de etila.

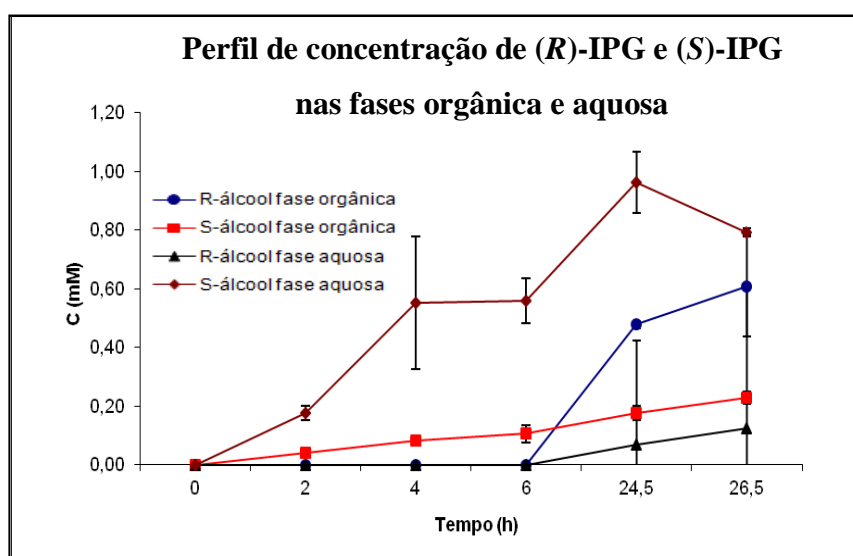


Figura 4.48: Variação da concentração do (*S*)-IPG e (*R*)-IPG nas fases aquosa e orgânica em acetato de etila a 30°C. Sendo a atividade inicial da lipase Amano AK igual a 30 U e a concentração do octanoato de (*R,S*)-IPG igual a 4mM. Os volumes da fase orgânica e aquosa foram 200 e 50 mL, respectivamente, e sendo que 10 % da fase orgânica foi água.

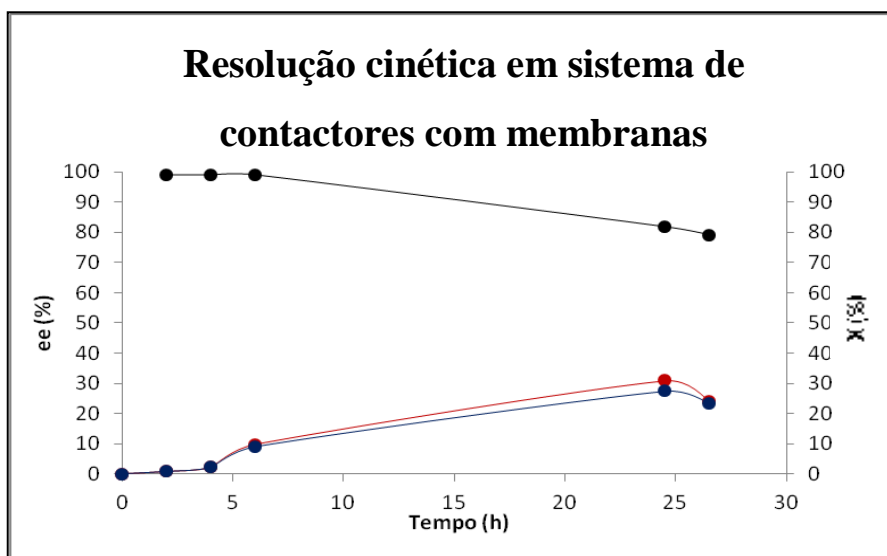


Figura 4.49: Resolução cinética do octanoato de (*R,S*)-IPG em acetato de etila a 30°C. Sendo a concentração inicial do éster 4mM e a atividade enzimática inicial da lipase Amano AK igual a 30 U. (●) ee(P) e (●) X e (●) ee(S).

Uma análise da Figura 4.49 mostra que até 6 horas foi possível obter de forma enantiopura o álcool ((*S*)-IPG), entretanto, após 20% de conversão o antípoda começou a se acumular no meio e este foi, então, também continuamente removido, logo, ocorreu uma queda no valor de ee(P). Além disso, é possível observar que nem todo enantiômero *S* foi extraído para a fase aquosa. Este feito pode ser devido a dois fatores: a produção (taxa de reação x volume da fase) do enantiômero *S* ser superior à vazão (fluxo x área de permeação) deste composto através da membrana; ou devido à existência de limitações difusionais na transferência de massa.

A resolução cinética, utilizando o contactor de membranas com maior área de permeação mostrou uma queda menos acentuada no valor de ee(P), indicando a efetividade da remoção simultânea do produto. Assim como no sistema convencional, enquanto o valor de ee(P) manteve-se elevado (em 99%) foi possível obter de forma enantiopura ((*S*)-IPG) e separada do octanoato de (*R,S*)-IPG.

Um aumento na área efetiva de filtração (contactor de fibras ocas, por exemplo) poderia aumentar a velocidade de extração do álcool da fase orgânica emulsionada, deslocando-se desta forma o equilíbrio.

De uma forma geral, os resultados apresentados no estudo do contactor de membranas mostram a viabilidade, ainda que bastante preliminar, de se efetuar a reação e a separação simultânea (*S*)-IPG.

CAPÍTULO 5

Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros

5.1. Conclusões

- O aumento no número de átomos da cadeia carbônica do éster obtido a partir do álcool aumentou valor de ee(P) na reação de hidrólise do octanoato de (R,S)-IPG para todas as lipases testadas.
- A lipase proveniente de *Pseudomonas fluorescens*, forneceu tanto o produto na forma enantiopura, em baixas conversões (< 20 %), quanto o substrato (X > 85%).
- O aumento da atividade de água no meio reacional gerou um aumento na conversão, visto que trata-se de uma reação de hidrólise. Entretanto esse aumento não foi acompanhado pelo aumento de ee(P).
- A faixa de pH estudada para esta enzima também mostrou que o pH neutro foi o mais eficaz para o reconhecimento maior pelo produto, neste caso o (S)-IPG.
- O ensaios de resolução cinética mostraram que, além da lipase ter afinidade por solventes mais hidrofílicos, só há separação enantiomérica quando a velocidade específica da reação é menor .
- Membranas mais hidrofóbicas foram as que mostraram melhores resultados em relação à imobilização enzimática.

- Imobilizações *via* adsorção hidrofóbica, de uma forma geral, foram as que apresentaram melhores resultados em relação ao parâmetro retenção de atividade.
- O processo *via* ligação covalente provavelmente gerou perda da estrutura terciária da enzima gerando valores inferiores de retenção de atividade.
- A imobilização da lipase Amano AK por adsorção hidrofóbica não gerou bons resultados, visto que as atividades retidas ficaram abaixo de 30%. Desta forma, optou-se pela utilização da enzima confinada no reator de membrana.
- A viabilidade em se realizar a reação e a separação simultânea do álcool proposto neste trabalho, (*R,S*)-IPG ficou evidenciada, apesar dos ensaios preliminares, com o uso do contactor de membranas. Entretanto, novos ensaios variando-se fluxo, área de extração, bem como outros parâmetros relevantes devem ser avaliados a fim de melhorar o desempenho do processo.
- Este trabalho apresentou apenas um estudo inicial, mas a ideia é utilizar contactores de membranas em uma série de reações de resolução enantiomérica, imobilizando-se ou não o biocatalisador. Comparando-se com um processo tradicional, onde todos os substratos e produtos encontram-se misturados com o biocatalisador, e, portanto, onde a etapa de separação é essencial, o uso do contactor de membranas é de longe uma alternativa mais viável, visto que o produto é recuperado isento de subprodutos, necessitando apenas de uma etapa de concentração que é comum a qualquer processo escolhido.

5.2. *Sugestões para trabalhos futuros*

- Dar continuidade a operação do contactor com membranas planas em modo contínuo variando-se algumas variáveis de processo tais como a vazão, área e forma da membrana, dentre outros.
- Efetuar as resoluções enantioméricas em sistema com fibras ocas, alterando-se o diâmetro das fibras, bem como a densidade de empacotamento.
- Testar as mesmas concentrações de enzima em temperatura igual ou inferior a -44°C a fim de confirmar os resultados obtidos por Sakai e col. (1998).
- Comparar economicamente o processo de resolução enzimática do octanoato de (R,S) -IPG *via* processo tradicional e utilizando-se um contactor de membranas.
- Investigar a otimização do processo de esterificação enantiosseletiva com enzimas comerciais e não comerciais para o (R,S) -IPG.
- Avaliar outros suportes para imobilização desta lipase, tais como os desenvolvidos no LABIM em conjunto com o laboratório do Professor José Carlos Pinto da COPPE/UFRJ.
- Avaliar o uso de células íntegras no processo contínuo, a fim de diminuir os custos de produção, recuperação e imobilização da lipase utilizadas no processo.

CAPÍTULO 6

Bibliografia

Akova A., Ustun G.; “Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on Celite at different pH values”, *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 355-359, 2000.

Al-Duri B., Yong Y.P.; “Lipase immobilization: equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports“, *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 207-215, 2000.

Albarez N. E. F. K.; “Obtenção de óxido de cério com alta área superficial específica”. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1996.

Albrecht W., Hilke R., Kneifel K., Weigel Th., Peinemann K.-V.; “Selection of microporous hydrophobic membranes for use in gas/liquid contactors: An experimental approach”. *Journal of Membrane Science*, v. 263, p.66-76, 2005.

Aires Barros M. R., “Biocatálise em solventes orgânicos”. Boletim Biotecnologia, disponível online em dequim.ist.utl.pt/bbio/72/pdf/BiocatSolOrg.pdf, capturado em 17/10/2011.

Almeida R. V., “Clonagem, expressão, caracterização e modelagem estrutural de uma esterase termoestável de *Pyrococcus furiosus*”. Tese de doutorado, COPPE/UFRJ, Brasil, pp.109, 2005.

Almeida R. V., Branco R. V., Santos B. C. P., Lima C.S., Campbell S. M., Martins O. B., Antunes O. A. C., Freire D.M.G.; “Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: isotherms,

hyperactivation and purification”. *Biochemical Engineering Journal*, v.39, p.531 - 537, 2008.

Araújo E. M., Melo T. J. A.; Santana L. N. L., Neves, G. A., Ferreira, H. C., Lira, H. L., Carvalho L. H., Ávila Jr. M. M.; Pontes M. K. G., Araújo I. S.; “The influence of organo-bentonite clay on the processing and mechanical properties of nylon 6 and polystyrene composites”. *Materials Science and Engineering: B* , v.112, p.175, 2004.

Balcão, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X.; "Bioreactors with immobilized lipases". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416, 1996.

Balcão, V.M; Malcata, F. X. 1998. "On the performance of a hollow-fiber bioreactor for acidolysis catalyzed by immobilized lipase", *Biotechnology and Bioengineering*, v.60, 1, pp.114 – 123, 1998.

Basri M., Yunus W. M. Z. W., Yoong W. S., Ampon K., Razak C. N.A. Razak, Salleh A. B.; “Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters”. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 66, p. 169-173, 1996.

Basseti F.J.; “Preparação, caracterização e aplicação de membranas poliméricas microporosas assimétricas”, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2002.

Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernandez-Lafuente R., Huguet J., Guisán J. M., "A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases *via* interfacial adsorptions on strongly hydrophobic supports". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 58,5, p. 486-493, 1998.

Bayramoğlu, G. Hazerb B., Altıntaş B., Arıca M. Y.; “Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green

apple flavor (ethyl valerate) synthesis”. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 372-378, 2011.

Beatriz A., Araújo Y. J. K.; Lima D. P.; “Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas”. *Química nova*, v. 34, 2, p. 306-319, 2011.

Benjamin S., Pandey, A.; “*Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology”. *Yeast*, v.12, p.1069-1087, 1998.

Berglund P; “Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis”. *Biomolecular Engineering*, v. 18, p. 13-22, 2001.

Bevilaqua J. V., “Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático”. Tese de Doutorado, pp. 165, COPPE/UFRJ, 2005.

Blanco R. M., Terreros P., Fernández-Perez M., Otero C., Diaz-González G.; “Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 83–93, 2004.

Blaser H. U., Schmidt E.; “Asymmetric catalysis on industrial scale: challenges, approaches and solutions”. Wiley: Weinheim, Germany 2004.

Boom R.M., “Membrane formation by immersion precipitation: the role of polymeric additive”, Ph. D. Thesis, Universiteit Twente, Enschede, 1992.

Bon E., Freire D. M. G., Mendes M .F., Soares F. V.; “Immobilization of *Aspergillus niger* β -D- glucosidase on aminated chitin and alumina/alginate”. *Biomass*, v. 11, p.1-8, 1986.

Borges C. P., “Fibras ocas compostas para remoção de poluentes orgânicos de soluções aquosas pelo processo de pervaporação”, Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 1993.

Bornscheuer U.T; “Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis”. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, p.73-81, 2002.

Bosley J.A., Peilow A. D.; “Immobilization of Lipases on Porous Polypropylene:Reduction in Esterification Efficiency at Low Loading”. **Journal of the American Oil Chemists' Society** , v.74, n. 2 , p. 107-111, 1997.

Bothun G.D., Knutson B.L., Strobel H.J., Nokes S.E.; “Massa transfer in hollow fiber membrane contactor extraction using compressed solvents”. **Journal of Membrane Science**, v. 227, p.183-196, 2003.

Bradford, M.M.; "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248–254, 1976.

Branco R. V, Gutarra M. L. E., Freire D. M. G., Almeida R. V.; “Immobilization and characterization of a recombinant thermostable lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on supports with different degrees of hydrophobicity. **Enzyme Research**, v. 1, p. 1-8, 2010.

Brígida A. I. S., “Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais”. Tese de Doutorado, EQ/UFRJ, 2010.

Bruno L. M, Pinto G. A. S., Castro H. F., Lima-Filho J.L., Melo E. H. M.; “Variables that affect immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane”. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 371-375, 2004.

Burton M.E., Shaw L.M, Shaw L. M., Schentag J.J., Evans W. E.; “Applied pharmacokinetics and pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring, 4 ed; Lippincot Williams & Wikins: Pennsylvania, 2006.

Cardoso C. L.; “Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas”. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

Carneiro-da-Cunha M. G., Rocha J. M. S., Garcia F. A. P., Gil M. H., “Lipase immobilization on to polymeric membranes”. *Biotechnology Techniques*, v. 13, p. 403-409, 1999.

Carvalho R.B.; Borges C.P.; Nobrega R., “Membranas celulósicas para osmose inversa e nanofiltração preparadas pela extrusão simultânea de duas soluções poliméricas”, In: Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, pp. 245, Natal, RN, Brasil, Agosto, 2002.

Carvalho P. O. Calafati S. A., Marassi M., Silva D. M., Contesini F. J., Bizaco R.; “Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas”. *Química Nova*, v. 28, 4, p. 614-621, 2005.

Castilho L.R., “Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells”, **série Fortschritt-Berichte**, VDI-Verlag, Alemanha, 2001.

Castro H. F., Silva M. L., Silva G. L.; “Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase”. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17, p. 4-7, 2000.

Chen C.S., Fujimoto Y., Girdaukas G., Sih C. J., “Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers”. *Journal American Chemical Society*, v.104, p. 7294-7299, 1982.

Christensen M.W., Andersen L., Husum T.L., Hirk, O.; “Industrial lipase immobilization”. *European Journal of Lipid Science Technology*, v. 105, p. 318-321, 2003.

Choi W. J., Lee K. Y., Kamg H. S., Lee S. .; “Biocatalytic enantioconvergent separation of racemic mandelic acid”. *Separation and Purification Technology*, v. 53, p. 178-182, 2007.

Costa V. E. U., Amorim H. L. N.; “O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente”. *Química Nova*, v. 22, n.6, p. 863-873, 1999.

Cunha A. G.; “Produção e imobilização de lipases microbianas em suportes com diferentes graus de hidrofobicidade”. Dissertação de mestrado submetida ao Instituto de Química da UFRJ, 2007.

Cunha A. G., Fernández-Lorente G., Bevilaqua J. V., Destain J., Paiva L. M. C., Freire, D. M. G., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M.; “Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase: a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.146, p.49 -56, 2008.

Cunha A. G., Fernández-Lorente G., Gutarra M. L. E., Bevilaqua J. V., Almeida R. V., Paiva L. M. C., Laduente R. F., Guisan J. M., Freire D. M. G.; “Separation and Immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.156, p.563 - 575, 2009.

Cyler M., Grochulski P., Kazlauskas R. J., Schrag J. D., Bouthillier F., Rubin B., Serreqi A. N., Gupta A. K.; “A structural basis for the chiral preferences of lipases”. *Journal American Chemical Society*, v. 116, p. 3180-3186, 1994.

Cygler M.; Schrag J. D.;” Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases”. *Methods in Enzymology*, v.284, p.3-27, 1997.

De Castro H. F., Mendes A. A., Santos J. C., Aguiar C. L.; “Modificação de óleos e gorduras por biotransformação”. *Química Nova*, v. 27, 1, p. 146-156, 2004.

Dalla-Vecchia R., Nascimento M. G., Soldi V.; “Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros”. *Química Nova*, v.27, 4, p.1-16, 2004.

Di Luccio M.; “Membranas microporosas planas e do tipo fibra-oca a partir de sistemas contendo policarbonato como polímero base”, Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997.

Dimitriu E., Secundo F., Patarin J., Fechete I.; “Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 22, p. 119–133, 2003.

Ding H.B., Carr P.W., Cussler P.W.; “Racemic leucine separation by hollow-fiber extraction”. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v.38,10, p.1493-1498, 1992.

Donahuaen D. J., Bartell F. E.; “The boundary tension at water organic liquid interfaces”. *University of Michigan*, v. 56, p. 480-484, 1961.

Espeso J., Lozano A. E., De La Campa J. G., Abajo J.; “Effect of substituents on the permeation properties of polyamide membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 280, p. 659-655, 2006.

Faber, K., “Biotransformation in Organic Chemistry: A textbook”. Third Edition, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlim, cap. 1-3, 1997.

Fai Liu A. M.; “Developing novel lipases from *Bacillus thermocatenulatos* to improve enantioselectivity by directed evolution”. Tese de doutorado, McGill University, Canada, 1999.

Fernandez-Lafuente R., Armisen P., Sabuquillo P., Fernández-Lorente G., Guisán J. M., “Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports”, *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, p. 185-197, 1998.

Fernandez-Lorente G., Terreni M., Mateo C., Bastida A, Fernandez-Lafuente R., Dalmasas P., Huguet J., Guisán J.M., "Modulation of lipase properties in macroaqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a

chiral ester by immobilized *Pseudomonas lipases*", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 389-396, 2001.

Ferrato F., Carriere F., Sarda L., Verger R.; "A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation". *Methods in Enzimology*, v. 284, part B, p. 327-347, 1997.

Freire D. M. G., Sant'anna Jr. G. L., "Hydrolysis of starch with immobilized glucoamylase: a comparison between two types of expanded-bed reactor". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.26, p.23 - 33, 1990.

Freire D.M.G.; "Imobilização de amiloglicosidase em quitina – caracterização e testes em reatores contínuos de leito expandido", Tese de Mestrado, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 1988.

Freire D. M. G., Castilho, L. R.; "Lipases em biocatálise". *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, cap. 16, p.369-385, 2008.

Frings K., Koch M., Hartmeier W.; "Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents". *Enzyme and microbial technology*, v. 25, p.303-309, 1999.

Gabelman A., Hwang, S.; "A theoretical study of dense gas extraction using a hollow fiber membrane contactor". *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 37, p. 157 – 172, 2006.

Gabelman A., Hwang, S.; "Hollow fiber membrane contactor". *Journal of Membrane Science*, v. 159, p.61-106, 1999.

Ghanem A., Abou,- Enein H. Y., "Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents". *Tetrahedrom: Asymmetry*, v. 15, p. 3331-3351, 2004.

Giorno L., Molinari R., Natoli M., Drioli E., Hydrolysis and regioselective transesterification catalyzed by immobilized lipases in membrane bioreactors, *Journal of Membrane Science*, v.125, p.177, 1997.

Gitlesen T., Bauer M., Adlercreutz P.; “Adsorption of lipase on polypropylene powder”. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1345, p.188–196, 1997.

Gotor V. F., Brieva R., Gotor V.; “Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals”, *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, v. 40, pp. 111-129, 2006.

Guisán J. M., Sabuquillo P., Fernandez-Lafuente R., Fernandez-lorente G.; “Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylemine”, *Journal of molecular Catalysis B: enzymatic*, v. 11, p. 817-824, 2001.

Gutarra M. L. E., Mateo C., Freire D. M. G., Torres F. A. G., Castro A. M., Guisan J. M., Palomo J. M.; “Oriented irreversible immobilization of a glycosylated *Candida antarctica* B lipase on heterofunctional organoborane-aldehyde support”. *Catalysis*, v. 1, p. 260-266, 2011.

Gutman A.L., Brenner D., Boltanski A.; “Convenient practical resolution of racemic alkyl-aryl alcohols *via* enzymatic acylation with succinic anhydride in organic solvents”. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 4, p.839-844, 1993.

Halling P. J., “Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis”. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, p. 178-206, 1994.

Hasan F., Shah A. A., Hameed A.; “Industrial applications of microbial lipases”. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.

Hilal N., Kochkodan V., Nigmatullin R., Goncharuk V., Al-Khatib L.; “Lipase-immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: comparison of various approaches to membrane preparation”. *Journal of Membrane Science*, v.268, p.198-207, 2006.

Hof R. P., Kellogg R. M.; “Synthesis and lipase-catalyzed resolution of 5-(hydroxymethyl)-1,3-dioxolan-4-ones: masked glycerol analogs as potential building blocks for pharmaceuticals”. *Organic Chemistry*, v. 61, p. 3423-3427, 1996.

Hoq M. M., Yamane T., Shimizu S., Funad T., Ishida S.; “Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membranes bioreactor”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.62, p.1016-1021, 1985.

Hult K., Norin T.; “Enantioselectivity of some lipases: control and prediction”. *Pure and Applied Chemistry*, v. 64, p. 1129-1134, 1992.

Jaeger K., Dijkstra B. W., Reetz M.T.; “Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases”, *Annual Review of Microbiology*, v.53, p. 315-351, 1999.

Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Van Heuvel M., Misset O.; “Bacterial lipases”. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, v. 15, p. 29-63, 1994.

Jaeger K. E., Reetz M. T.; “Microbial lipases form versatile tools for biotechnology”. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 396-403, 1998.

Jaeger K. E., Eggert T.; “Lipases for biotechnology”. *Biotechnology*, v. 13, p. 390-397, 2002.

Júnior I. J. S., Veredas V., Santos M. A. G., Santana C.C.; “Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala”. *Química Nova*, v. 29, 5, p. 1027-1037, 2006.

Kazlauskas R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T., Cuccia, L. A. J; *The Journal of Organic Chemistry*, v.56, p.2656–2665, 1991.

Kazlauskas R. J., Bornscheuer U. T.; “Biotransformation with Lipases”. A Multi Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology, (ed.) Rehm, H.J., Pihler G., Stadler, A., Kelly, P. J.W. New York: Wiley VCH Verlag, v. 8, pp. 37-192, 1998.

Kennedy J. F., “Enzyme technology”. In: Rehm H. J., Reed G. *Biotechnology*, v.7, Weinheim, 1987.

Keneifel K., Nowak S., ALbrech W., Hilke R., Just R., Peinemann K-V., “Hollow fiber membrane contactor for air humidity control: modules and membranes”. *Journal of Membrane Science*, 276, p. 241-251, 2006.

Koskinen A. M. P., Klibanov A. M.; “ Enzymatic Reactions in Organic Media”. *Blackie Academic & Professional*, p.314 ; 1996.

Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I. M., Marchant R., Koutinas A. A.; “Immobilizations technologies and supports materials suitable in alcohol beverages production: review”. *Food Microbiology*, v. 21, p. 377-397, 2004.

Kronemberger F. A., Santa Anna L. M. M., Fernandes A. C. L. B., Menezes R. R., Borges C. P., Freire D. M. G.; “Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 147 p. 33-45, 2008.

Laane C., Boeren, S., Vos K., Veeger C.; “Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents”. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, p. 81-87, 1987

Lin G.Q, Li Y.M., Chan A. S. C.; “Principles and applications of asymmetric synthesis”. John Wiley & Sons, New York, 2001.

Lima A. W. O, Angnes L., “Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações e química analítica”. *Química Nova*, v.22, 2, p. 229-245, 1999.

Lima V. M. G., “. Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos”. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, pp. 140, 2004.

Liu A.M.F., Somers N.A., Kazlauskas R.J., Brush T.S., Zocher F., Enzelberger M.M., Bornscheuer U.T., Horsman G. P., Mezzetti A., Schimidt-Dannert C., Schimid R. D.; “Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: lipases from *Bacillus Thermocatenulatus* and *Phiostoma piliferum*, esterases from *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces diastatochromogenes*”. *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 545-556, 2001.

Ilanes A.; “Biotecnologia de enzimas“. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile, 1994.

Lopez J. L., Madson, S.L.; “A multiphase/extractive enzyme membrane reactor for production of diltiazem chiral intermediate”. *Journal of Membrane of Science*, v. 125, p. 189-211, 1997.

Lourenço T. C., Cassiano N. M., Cass Q. B.; “Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência”. *Química Nova*, v. 33, 10, p. 2155-2164, 2010.

Lozano P., Vllora G., Gómez D., Gayo A. B., Sánchez-Conesa J. A., Rúbio M., Iborra J. L.; “Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for Ester synthesis in supercritical carbon dioxide”. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 29, p. 121-128, 2004.

Lozano P., Diego T., Larnicol M., Vaultier M., Iborra J. L., “Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of racemic-phenylethanol in liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems”. *Biotechnoloy Letters*, v.28, p.1559-1565, 2006.

Long W.L., Knw P.C., Kamaruddin A.H., Bhatia S.; “Comparison of kinetic resolution between two racemic ibuprofen esters in an enzymatic membrane reactor”. *Process Biochemistry*, v.40, p.2417-2425, 2005.

Lundell K., Rajjola T., Kanerva L. T.; “Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida rugosa* lipases for the resolution of secondary alcohols: the effect of *Candida rugosa* isoenzymes”. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 86-93, 1998.

Madalozzo A. D., “Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, pp. 149, 2011.

Manjon A., Iborra J.L. and Arocas A.; *Biotechnology Letters*, v. 13, p. 339-344, 1991.

Martín-Matute, B.; Edin, M.; Bogár, K.; Kaynak, B. F.; Bäckvall, J. E. J. Am. Chem. Soc. , v.127, p.8817-8825, 2005.

Margolin A.L.; “Enzymes in the synthesis of chiral drugs”. *Enzyme and Microbial Technology*, v.7, p.113-119, 1996.

Mateo C., Palomo J. M., Fernández-Lorente G., Guisán J. M., Fernández-Lafuente R.; “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques”. *Enzyme Microbial Technology*, v.40, p.1451-1463, 2007.

Matsushima A., Kodera Y., Hiroto M.; “Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes”. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, v.2, p. 1-17, 1996.

Mavroudi M., Kaldis S. P., Sakellaropoulos G. P.; “Reduction of CO₂ emissions by a membrane contacting process”, *Fuel*, v. 82, p. 2153-2159, 2003.

Mavroudi M., Kaldis S. P., Sakellaropoulos G. P.; 2006, “A study of mass transfer resistance in membrane gas-liquid contacting processes”, *Journal of Membrane Science*, v. 272, p. 103-115, 2006.

Mendes A. A.; “Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para síntese enzimática do biodiesel”. Tese de doutorado em Engenharia Química - Universidade Federal de São Carlos, Brasil, pp. 194, 2009.

Merçon F., Sant’Anna Jr. G.L., Nobrega R., “Enzymatic Hydrolysis of Babassu oil in a membrane bioreactor”. *Journal of American Oil Chemists Society*, v.77, p.1043-1048, 2000.

Mezzetti A., Keith C., Kazlauskas R. J., “Highly enantioselective kinetic resolution of primary alcohols of type Ph-X-CH(CH₃)-CH₂OH by *Pseudomonas cepacia* lipase: effect of acyl chain length and solvent”. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 14, p. 3917-3924, 2003.

Miyazawa T., Kurita S., Sakamoto H., Otomatsu T, Hirose K., Yamada T.; “Resolution of 2,2-diphenyl-1,3-dioxolane-4-methanol via *Rhizopus* sp. lipase-catalyzed enantioselective transesterification with vinyl butanoate”. *Biotechnology Letters* , v. 21, 5, p. 447-450 ,1999.

Miyazawa T., Yukawa T., Koshiha T., Ueji S., Yanagihar R., Yamada T.; “Enzymatic resolution of 2-phenoxy-1-propanols through the enantioselective acylation mediated by *Achromobacter* sp. lipase”. *Biotechnology Letters*, v.23, p.1547–1550, 2001.

Molinari, R., Santoro M. E., Drioli E.; “Study and comparison of two enzyme membrane reactors for fatty acids and glycerol production”. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 33, p. 2591–2599, 1994.

Molinari F., Cavenago K. S., Romano A., Romano D., Gandolfi R.; “Enantioselective hydrolysis of (*R,S*)–Isopropylidenglycerol acetate with *Kluyveromyces marxianus*”. *Tetrahedron: Asymmetry*, v.15, p. 1945-1947, 2004.

Molinari F., Romano D., Gandolfi R., Kroppenstedt R. M., Marinelli F., “Newly isolated *Streptomyces* spp. as enantioselective biocatalysts: hydrolysis of 1,2-O-isopropylidene glycerol racemic esters. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, 4, p. 960-967, 2005.

Monti D., Ferrandi E.E., Righi M., Romano D., Molinari F. 2008. “Purification and characterization of the enantioselective esterase from *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553”. *Journal of Biotechnology*, v. 133, p.65-72, 2008.

Moreira M. A.; “Utilização de lipases em reações de epoxidação quimio-enzimática”. Tese de mestrado apresentada no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2003.

Moura J. M. L. N., Ribeiro A. P. B. R, Grimaldi R., Gonçalves L. A. G; “Reator de membranas enzimático e fluidos supercríticos: associação de processos”. *Química Nova*, v. 30, 4, p. 965-969, 2007.

Nakanishi K., Sakiyama T., Imamura K., “On the adsorption of proteins and solid surfaces, a common but very complicated phenomenon”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, 3, p. 232-244, 2001.

D. Nasipuri; Stereochemistry of Organic Compounds; John Wiley & Sons, New York, 1991.

Oliveira A. C; “Morfologia de membranas microporosas de poli (éterimida) utilizando nitrato de lítio como aditivo”, Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 1994.

Oliveira D., Feihmann 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*, v. 39, p. 117-123, 2006.

Paiva A. L., Balcão V. M., Malcata F. X.; "Bioreactors with immobilized lipases", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416, 1996.

Paiva A. L., Balcão V. M., Malcata F. X.; "Kinetics and mechanics of reactions catalyzed by immobilized lipases". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 187-204, 2000.

Palomo J. M., Segura R. L., Mateo C., Terrine M., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M.; "Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution", *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 16, p. 869–874, 2005.

Pancera S. M.; "Estudo das interações entre enzimas e polímeros: efeito do poli(etileno glicol) na atividade e na conformação estrutural de enzimas. Adsorção de enzimas sobre superfícies sólidas". Tese de doutorado em físico-química-Universidade de São Paulo, Brasil, pp. 114, 2006.

Pandey A., Benjamin S., Soccol C. R., Nigan P., Krieger N., Soccol V. T.; "The realm of microbial lipases in biotechnology". *Applied Biotechnology biochemistry*, v.29, p. 119-131, 1999.

Panzavolta F., Soro S., D'amato R., Palocci C., Cernia E., Russo M. V.; "Acetylenic polymers as new immobilization matrices for lipolytic enzymes", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v. 32, pp. 67–76, 2005.

Paques F. W., Macedo G.A.; "Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais". *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

Pereira C.C., 1999, Desenvolvimento de fibras ocas anisotrópicas para separação de gases, Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1999.

Persson M., Wehtje E., Adlercreutz P., "Immobilization of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum". *Biotechnology Letters* ,v. 22, 19, p.1571-1575, 2000.

Pinto G. F., Abarzúa E. G. O., Antunes O. A. C.; “Catálise enzimática com misturas de enantiômeros e com substratos pró-quirais: aspectos cinéticos”. *Cadernos didáticos de pós-graduação*, Ed. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

Pissilão C.; “Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila e síntese do acetato de geranoíla mediada por lipases”. Tese de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Pouderoyen G., Eggert T., Jaeger K. E., Dijkstra B. W.; “The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *Journal of Molecular Biology*, v. 309, p. 215 - 226, 2001.

Reetz, M.T.; “Lipases as practical biocatalysts”. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2002.

Rios G. M., Belleville M. P., Paolucci D., Sanchez J.; “Progress in enzymatic membrane reactors-a review”. *Journal of Membrane Science*, v. 242, p. 189-196, 2004.

Romano D., Falcioni F., Mora D., Molinari F., Buthe A., Ansorge-Schumacher M.; “Enhanced enantioselectivity of *Bacillus coagulans* in the hydrolysis of 1,2-O-isopropylidene glycerol esters by thermal knock-out of undesired enzymes”. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 16, p. 841-845, 2005.

Sabuquillo P., Reina J., Fernandez-Lorente G., Guisán J. M., Fernandez-Lafuente R.; “Interfacial affinity chromatography’ of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports actived with hydrophobic groups”, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1388, pp. 337-348, 1998.

Sharma R., Cristi Y., Banerjee U. C.; “Production, purification, characterization and applications of lipases”. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

Sharma S. & Agarwal G.P.; “Interactions of proteins with immobilized metal ions”, *Journal of Colloid and Interface Science*, v.243, p.61-72, 2001a.

Sharma S., Agarwal G.P.” Interactions of proteins with immobilized metal ion: a comparative analysis using various isotherm models”, *Analytical Biochemistry*, v.288, p.126-140, 2001b.

Silva, G. A.; “Correlação entre Morfologia e Propriedades de Transporte de Diclorometano em Filmes de Poli(éterimida) (PEI)”, Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil, 1996.

Silva J.E. S., Jesus P.C.; “Evaluation of the catalytic activity of lipases immobilized on chrysotile for esterification”, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, 2, pp. 157-162, 2003.

Sakai T., Kishimoto T., Tanaka Y., Ema T., Utaka M.; “Low temperature method for enhancement of enantioselectivity in the lipase-catalyzed resolutions of Solketal and some chiral alcohols”. *Tetrahedron Letters*, v. 39, p. 7881-7884, 1998.

Sakai S., Liu Y., Yamaguchi T., Watanabe R., Kawabe M., Kawakami K.; “Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto electrospun polyacrylonitrile fibers through physical adsorption and application to transesterification in nonaqueous solvent”. *Biotechnology Letters*, v.32, p.1059-1062, 2010.

Salum T. F. C., “Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTB11 para síntese de ésteres etílicos”. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2010.

Sánchez A., Ferrer P., Serrano A., Valero O. F.; “A controlled fed-batch cultivation for the production of new crude lipases from *Candida rugosa* with improved properties in fine chemistry”. *Journal of Biotechnology*, v. 69, p. 169-182, 1999.

Sarda L., Desnuele P.; “Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion”. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.58, p. 513-521, 1958.

Simas A. B. C., Silva A. A. T., Cunha A. G., Assumpção R. S., Hoelz L. V. B ; Neves B. C., Galvão T. C. ; Almeida R. V., Albuquerque M. G., Freire D. M. G., de Alencastro R. B.; “Kinetic resolution of (*R,S*)-1,2-*O*-isopropylidene-3,6-di-*O*-benzylmyo-inositol by lipases: An experimental and theoretical study on the reaction of a key precursor of chiral inositols”. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* , v. 70, p. 32-40, 2011.

Soares C. M. F., De Castro H. F., Zanin G. M., De Moraes F.F., “Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.77/79, p. 745-757, 1999.

Sobral K. C. A., Rodriguez R. M. O., Oliveira R. D., Moraes F. F., Zanin G. M.; “Immobilization of cyclodextringlycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in commercial chitosan”. *Journal of Inclusion Phenomena and Mycrocyclic Chemistry*, v. 44, p. 383 – 386, 2002.

Sobral K. C. A., Rodriguez R. M. O., Oliveira R. D.; Olivo J. E.; Moraes F. F., Zanin G. M.; Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextringlycosyltransferase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105-108, p.809 – 819, 2003.

Straathof A. J. J., Jongejam J. A.; “The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction”. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 559-571, 1997.

Suan C., Sarmidi M. R.; “Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 28, p. 11-119, 2004.

Tan T., Wang F., Zhang H., “Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 18, p. 325-331, 2002.

Tardioli, P. W.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Giordano, R. L. C.,” Design of new immobilized stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins”. *Biotechnology Progress*, v.19, p.565-574, 2003.

Tincom T. T. S.; “Otimização de parâmetros para a obtenção de ácido mandélico a partir de mandelato de etila utilizando lipases”. Dissertação de mestrado em Farmacêutica- Universidade Federal do Rio de Janeiro, pp. 85, 2003.

Tischer W., Kaschie V.; "Immobilized enzymes: crystal or carriers". *Trends in Biotechnology*, v. 17, p. 326-335, 1999.

Torres R., Ortiz C., Pessela B. C.C., Palomo J. M., Mateo C., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R.; “Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions”. *Enzyme and microbial Technology*, v. 39, p.167-171, 2006.

Tsai S.W., Huang C.M.; “Enantioselective synthesis of (S)-suprofen ester prodrugs by lipase in cyclohexane.” *Enzyme and Microbial Technology*, v.25, 8-9, p.682-688, 1999.

Trusek-Holownia A., A. Noworyta; “Catalytic membrane preparation for enzymatic hydrolysis reactions carried out in the membrane phase contactor”. *Desalination*, v.144, p. 427-432, 2002.

Uppenberg J., Hansen M. F., Patkar S., Jones T. A.; “The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*”. *Structure*, v.15, p.293-308, 1994.

Vallikivi I., Lille U., Lookene A., Metsala A., Sikk P., Tõugu V., Vija H., Villo L., Parve O.; “Lipase action on some non-triglyceride substrates”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 22, p. 279-298, 2003.

Verger R.; “‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts”. *Trends in Biotechnology*, v. 15, p. 32-38, 1997.

Villeneuve P., Muderhwa J. M., Graille J., Haas M. J.; “Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.

Zimmermann A.; “Aplicação de resolução enzimática na síntese estereoseletiva de feromônios de agregação de insetos praga de palmáceas”. Tese de mestrado em Ciências Químicas, Universidade Federal do Paraná, pp. 102, 2005.

Wang Y., Hu Y., Xu J., Luo G., Dai Y.; “Immobilization of lipase with a special microstructure in composite hydrophilic CA/hydrophobic PTFE membrane for the chiral separation of racemic ibuprofen”. *Journal of Membrane Science*, v.293, p. 133-141, 2007.

Wilson L., Palomo J. M., Fernández-Lorente G., Illanes A., Guisán J. M., Fernández-Lafuente R.; “Improvement of the properties of a thermostable lipase from *Alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 975-980, 2006.

Yang Z.; Russell A.J.; “Fundamentals of non-aqueous enzymology. In: Koskinen A. M. P., Klivanov A. M., Enzymatic reactions in organic media. London Blackie Academic and Professional, p.43-69, 1996.

Ye. P., Xu Z., Wang Z., Wu J., Deng H., Seta P.; “Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly (acrylonitrile-co-maleic-acid) ultrafiltration hollow fiber membrane”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32, p. 115-121, 2005.

Zen H. A., Geraldes A. N., Ferreira H. P., Parra D. F., Lugão A. B.; “Preparação e caracterização de membranas de polipropileno para uso em célula combustível. Nono congresso brasileiro de polímeros. Capturado em 20/10/2011.

Sites:

<http://www.amano-enzyme.co.jp/>, capturado em 03/2011.

<http://apps.isiknowledge.com>, capturado em 20/08/2011.

<http://www.wikipedia.org>, capturado em 20/08/2011.

<http://www.bccresearch.com/report/BIO030F.html>, capturado em 03/2011.

.