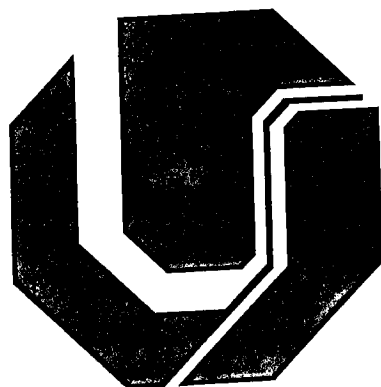


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**A UTILIZAÇÃO DE LIPASES IMOBILIZADAS EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO
EM MEIO NÃO AQUOSO**

Marcelo Teixeira Leite

Uberlândia - MG

1999

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

SISBI/UFU



1000197374

MON
663.15
L53 Em
TES/MEM

**A UTILIZAÇÃO DE LIPASES IMOBILIZADAS EM REAÇÕES DE
ESTERIFICAÇÃO EM MEIO NÃO AQUOSO**

Marcelo Teixeira Leite

**Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos necessários à obtenção
do título de Mestre em Engenharia Química,
área de concentração em Desenvolvimento de
Processos Químicos**

**Uberlândia-MG
1999**

37816

DA/99 SISBI/UFU
197374 ex. 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

FU-00011687-8

0062-41260

L533u Leite, Marcelo Teixeira, 1970-
A utilização de lipases imobilizadas em reações de esterificação em meio não
aquoso / Marcelo Teixeira Leite. Uberlândia, 1999.
59f. : il.
Orientador: Euclides Honorio de Araujo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Curso de
Mestrado em Engenharia Química.
Bibliografia: f. 56-59.
1. Enzimas - Aplicações industriais. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Esterificação
(Química). 4. Lipase. I. Universidade Federal de Uberlândia, Curso de Mestrado em
Engenharia Química. II. Título.


CDU: 663.15

UTILIZAÇÃO DE LIPASES IMOBILIZADAS EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM MEIO NÃO AQUOSO

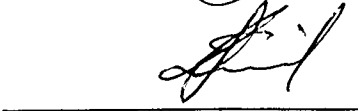
Marcelo Teixeira Leite

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE
MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Euclides Honório de Araújo
Orientador - (PPG-EQ/UFU)


Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras
Co-orientador - (DEQUI/UFU)


Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
(PPG-EQ/UFU)


Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka
(UFSCar)

UBERLÂNDIA, MG, BRASIL

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii

CAPÍTULO PÁGINA

1 – Introdução	1
----------------	---

2 – Revisão Bibliográfica

2.1 – Enzimas

2.1.1 – Introdução	4
2.1.2 – Cofatores enzimáticos	5
2.1.3 – Efeito do pH na atividade enzimática	6
2.1.4 – Efeito da temperatura nas reações enzimáticas	6
2.1.5 – A energia livre de ativação e os efeitos dos catalisadores	7
2.1.6 – Cinética das reações catalisadas por enzimas: a equação de Michaelis-Menten	8
2.1.7 – Inibição enzimática	11
2.1.7.1 – Inibição competitiva	12
2.1.7.2 – Inibição incompetitiva	12
2.1.7.3 – Inibição não competitiva	13
2.1.7.4 – Inibição irreversível: modificação enzimática	14

2.2 – Enzimas imobilizadas	15
----------------------------	----

2.2.1 – Métodos de imobilização	15
2.2.1.1 – Imobilização em suporte sólido através de ligação covalente	16
2.2.1.2 – Ligação cruzada	17
2.2.1.3 – Adsorção	17

2.2.1.4 – Enzimas em meio orgânico	18
2.2.1.5 – Imobilização em polímero gel	19
2.2.1.6 – Imobilização em microcápsulas	19
2.2.1.7 – Imobilização em membranas	19
2.2.1.8 – Imobilização em sistema bifásico	20
2.3 – A utilização da Lipozyme e da Novozym 435 em reações de esterificação	21
2.3.1 – Aplicações na área farmacêutica	21
2.3.2 – Síntese de surfactantes	22
2.3.3 – Síntese de triacilgliceróis	24
2.3.4 – Deacidificação de óleos	25
2.3.5 – Síntese de emulsificantes	25
2.3.6 – Produção de aromas	26
2.4 – Pervaporação	31
2.5 – Análise quantitativa de ácidos graxos utilizando um método colorimétrico	33
3 – Materiais e métodos	
3.1 – Materiais	34
3.2 – Métodos experimentais	
3.2.1 – Preparação das enzimas	35
3.2.2 – Determinação da atividade enzimática	35
3.2.3 – Síntese do oleato de n-butila	36
3.2.4 – Produção da membrana de acetato de celulose	39
3.2.5 – Determinação da concentração do ácido oleico presente no meio reacional pelo método do acetato cúprico	
3.2.5.1 – Preparação da solução de acetato cúprico-piridina	40
3.2.5.1 - Curva padrão do ácido oleico	40
3.2.5.3 – Determinação da conversão	41

4 – Resultados e discussão

4.1 – Sínteses do oleato de n-butila utilizando a Lipozyme como catalisador	
4.1.1 – Influência da temperatura sobre a atividade enzimática	43
4.1.2 – Influência da quantidade de enzima sobre a formação de produtos	44
4.1.3 – Efeito da viscosidade sobre a conversão	46
4.1.4 – Efeito da utilização de excesso de reagentes sobre a formação de produtos	47
4.2 – Sínteses do oleato de n-butila utilizando a Novozym 435 como catalisador	
4.2.1 – Influência da temperatura sobre a atividade enzimática	49
4.2.2 – Influência da quantidade de enzima sobre a formação de produtos	50
4.2.3 – Efeito da viscosidade sobre a conversão	51
4.2.4 – Efeito da utilização de excesso de reagentes sobre a formação de produtos	52

5 – Conclusões	54
-----------------------	----

6 – Referências bibliográficas	56
---------------------------------------	----

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar a performance de duas lipases, Lipozyme e Novozym 435, em reações de esterificação em meio não aquoso. O objeto do estudo foi a síntese enzimática do oleato de n-butila. Os ensaios foram conduzidos em um reator de pervaporação, onde removeu-se seletivamente a água formada durante a reação, através de uma membrana não porosa de acetato de celulose. Deste modo, deslocou-se o equilíbrio da reação, aumentando a formação de produtos. As conversões foram determinadas pelo método do acetato cúprico. A esterificação do ácido oleico com o n-butanol foi realizada em diferentes condições de temperatura, viscosidade do meio e proporção entre os reagentes. Na reação catalisada pela Lipozyme, a atividade enzimática variou inversamente com a temperatura, sendo máxima a 30°C e mínima a 60°C. A diminuição da viscosidade do meio através da introdução de um solvente, o isoctano, provocou um grande aumento na conversão. Incrementos na dosagem de enzima não exerceram influência sobre a produtividade da reação. A utilização de um excesso de n-butanol resultou em um aumento na conversão. Este aumento foi causado pela diminuição da viscosidade do meio, e não pelo deslocamento do equilíbrio da reação. Na reação catalisada pela Novozym 435, a atividade enzimática foi praticamente a mesma no intervalo entre 30°C e 60°C. A conversão mostrou ser diretamente proporcional à quantidade de enzima aplicada ao meio, até o limite de 10% (m/m) do total de ácido oleico. A produtividade da reação não se alterou perante variações na viscosidade do meio e na proporção entre os reagentes.

PALAVRAS-CHAVE: lipases, esterificação, pervaporação, atividade enzimática.

The purpose of this work was to study the performance of two lipases, Lipozyme and Novozym 435, in lipase-catalyzed esterifications in nonaqueous medium. The focus of this study was the enzymatic synthesis of n-butyl oleate. A pervaporation reactor was set up to carry out the reactions. Pervaporation selectively removes water from the reaction mixture using a nonporous polymeric membrane, cellulose acetate. Conversions were determined by the cupric acetate method. In the synthesis of n-butyl oleate catalyzed by Lipozyme, the lipase activity decreased with an increase in the reaction temperature. Maximum activity was achieved at 30°C. At 60°C the activity was minimal. The decrease in reaction mixture viscosity by addition of a solvent caused a great increase in conversion. On the other hand, increments on the amount of enzyme used in the reaction mixture did not affect the formation of products. In the synthesis of n-butyl oleate using Novozym 435, the enzymatic activity was the same in the range between 30°C-60°C. The conversion was directly proportional to the amount of enzyme until the limit of 10% (m/m) on oleic acid. Changes on the viscosity and amount of butanol did not affect the reaction productivity.

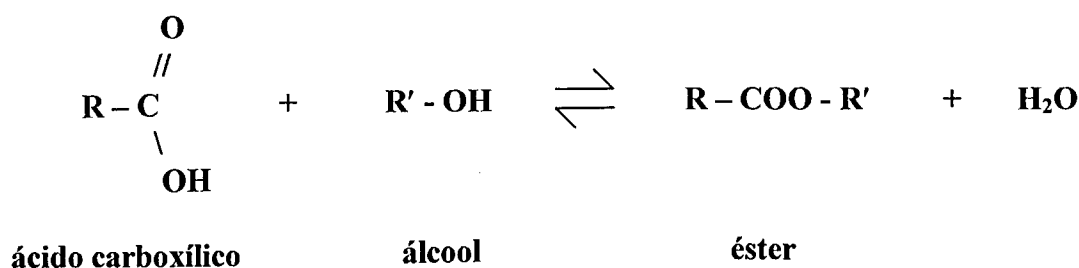
KEY WORDS: lipases, esterification, pervaporation, enzymatic activity

1 - INTRODUÇÃO :

Nos últimos anos, vem tornando-se crescente o interesse pelo estudo das reações de modificação de óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída a um conjunto de fatores. Com o aumento da oferta de óleos e gorduras no mercado internacional, tornou-se necessário o desenvolvimento de processos visando transformar esse excesso de lipídeos em derivados alternativos de valor comercial. Além disso, sendo matérias-primas de origem vegetal e animal, os lipídeos constituem-se em recursos renováveis. Este é um aspecto relevante tanto do ponto de vista econômico quanto do ponto de vista ambiental.

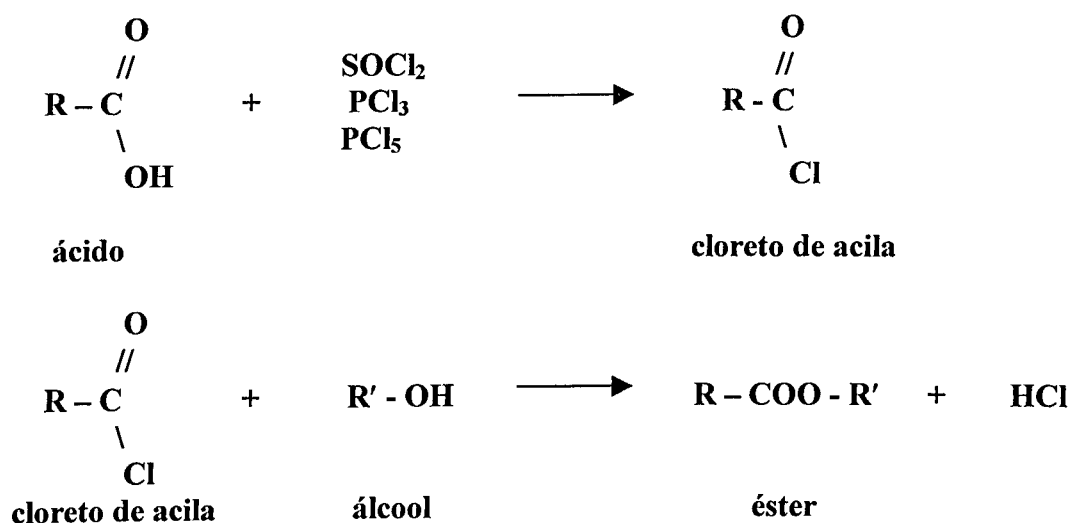
As reações de modificação de óleos e gorduras mais promissoras industrialmente são a hidrólise, a esterificação e a interesterificação. Em particular, as reações de esterificação vêm despertando grande interesse pela diversidade de produtos de importância comercial que originam. Através dessas reações são obtidos produtos utilizados pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e de sabões e detergentes, dentre outras.

A esterificação é uma reação entre um ácido carboxílico e um álcool, produzindo um éster e água:



Na reação acima pode-se observar a ocorrência, no sentido inverso, da reação de hidrólise. A esterificação direta é, portanto, a reação inversa da hidrólise dos lipídeos.

A natureza reversível da reação representa uma desvantagem na preparação de ésteres diretamente a partir dos ácidos. A preferência pela via indireta através dos cloretos de acila deve-se ao fato de ambas as reações - preparação do cloreto de acila, a partir do ácido, e preparação do éster, a partir do cloreto de acila - serem essencialmente irreversíveis e se produzirem completamente.



A esterificação direta, todavia, tem a vantagem de ocorrer em uma única etapa. O deslocamento do equilíbrio químico, no sentido da formação dos produtos, permite melhorar a utilidade desta reação, tornando-a comercialmente viável. Deste modo, pode-se ou empregar um dos reagentes em excesso, ou promover a remoção contínua da água, ou ambos.

Industrialmente, a esterificação direta é conduzida em altas temperaturas, que variam de acordo com o produto a ser obtido. A síntese de ésteres metílicos e etílicos ocorre a temperaturas entre 75° C e 100° C. Já a produção de vários triacilgliceróis ocorre entre 130° C e 250° C (SWERN, 1982). Os catalisadores comumente utilizados são os ácidos sulfúrico concentrado, clorídrico anidro, benzeno-sulfônico e tolueno-sulfônico. Porém, como estas substâncias podem provocar o escurecimento dos produtos, outros catalisadores foram pesquisados e vêm sendo utilizados. Destacam-se os cloretos de estanho, o cloreto de zinco, o ácido hipofosfórico e o pó de zinco, dentre outros. Entretanto, esses compostos também possuem certas desvantagens. Alguns se volatilizam do meio reacional, outros tornam-se inativos acima de certas temperaturas (SWERN, 1982).

As reações de hidrólise, esterificação, interesterificação e transesterificação podem ser catalisadas por uma classe de enzimas, as lipases. Em relação ao processo industrial convencional, a esterificação enzimática possui vantagens que justificam a sua aplicação: (i) a alta especificidade das enzimas evita a formação de subprodutos; (ii) a reação é conduzida em temperaturas brandas, entre 25° C e 60° C, resultando numa considerável economia de energia; (iii) as enzimas não provocam o escurecimento dos produtos, eliminando assim etapas posteriores de branqueamento; (iv) com a remoção contínua da água e o excesso de reagentes, pode-se chegar a 100% de síntese de produtos (ERGAN, 1991).

Além disso, os progressos alcançados na área de biocatálise apontam enzimas cada vez mais eficientes e com preços mais acessíveis. Em adição, os avanços na tecnologia de biorreatores tornam os processos enzimáticos mais adequados à produção industrial.

Neste trabalho foi estudada a utilização de enzimas na esterificação de ácidos graxos. As lipases aqui utilizadas foram a Lipozyme IM e a Novozym 435, ambas produzidas em escala industrial pela Novo Nordisk.

A Lipozyme é uma lipase 1,3 - específica imobilizada, desenvolvida para catalisar reações de esterificação e de interesterificação. Esta enzima é obtida a partir de uma cepa selecionada do *Mucor miehei*. O gene responsável pela produção da lipase é transferido do *Mucor miehei* para um organismo hospedeiro, o *Aspergillus oryzae*. A enzima é imobilizada em uma resina fenólica macroporosa de troca aniônica. A Novozym 435 é uma lipase obtida da *Candida antarctica*, desenvolvida para catalisar reações de esterificação. O gene responsável pela produção da lipase é transferido da *Candida antarctica* para o *Aspergillus oryzae*. A enzima é imobilizada em uma resina acrílica macroporosa (NOVO NORDISK, 1992).

Nos últimos anos, estas enzimas vêm sendo largamente empregadas nas reações de modificação de óleos e gorduras. Portanto, escolhemos realizar a síntese do oleato de n-butila para estudar a atuação da Lipozyme IM e da Novozym 435 na esterificação de ácidos graxos, com os seguintes objetivos:

- i - verificar a influência da temperatura sobre a atividade das enzimas;
- ii - verificar o efeito da viscosidade sobre a velocidade da reação;
- iii - observar o efeito do excesso de reagentes sobre a atividade enzimática e sobre a síntese de produtos;
- iv - comparar a performance das enzimas frente às diferentes condições citadas acima.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Enzimas

2.1.1 – Introdução

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. O termo enzima é derivado do latim e significa “no levedo”. Esta denominação foi utilizada pela primeira vez em 1877, porém muito anteriormente já se suspeitava que os catalisadores biológicos participavam da fermentação do açúcar para formar o álcool (LEHNINGER, 1995).

A primeira teoria geral de catálise química, publicada em 1835 por J. J. Berzelius, incluía um exemplo do que se conhece hoje como uma enzima, a diastase do malte, e indicava que a hidrólise do amido era melhor catalisada pela diastase do que pelo ácido sulfúrico. Ainda que Louis Pasteur reconhecesse que a fermentação era catalisada por enzimas, ele postulou, em 1860, que elas estavam intrinsecamente ligadas com a estrutura e a célula do levedo. Foi, portanto, um grande acontecimento na história da pesquisa enzimática quando, em 1897, Eduard Buchner conseguiu extrair da célula do levedo as enzimas que catalisam a fermentação alcoólica. Tal feito demonstrou claramente que essas importantes enzimas, que catalisam um percurso metabólico importante na produção de energia, podem operar independentemente das estruturas celulares. Entretanto somente muitos anos mais tarde é que uma enzima foi isolada pela primeira vez em forma cristalina pura. Isso foi feito por J. B. Sumner, em 1926, com a enzima urease, isolada dos extratos do feijão-soja. Sumner apresentou evidências de que os cristais eram de uma proteína e concluiu, contrariando a opinião predominante, que as enzimas eram proteínas, o que não foi aceito de imediato. Somente durante o período de 1930 a 1936, durante o qual J. Northrop cristalizou as enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina, é que a natureza protéica das enzimas foi estabelecida definitivamente (LEHNINGER, 1995).

Ainda que a maioria das enzimas envolvidas nas atividades metabólicas fundamentais das células tenham sido identificadas, muitos problemas importantes permanecem sem solução, incluindo o controle genético da síntese enzimática, os mecanismos moleculares pelos quais a atividade enzimática é regulada, e o papel das formas múltiplas de certas enzimas no desenvolvimento e na diferenciação celular (LEHNINGER, 1995).

Acima de tudo, não sabe-se ainda, em termos moleculares, de que maneira as enzimas catalisam as reações químicas com eficiência, precisão e especificidade tão elevada (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

2.1.2 - Cofatores Enzimáticos

Algumas enzimas dependem, para exercer sua atividade, somente de sua própria estrutura como proteína, enquanto outras requerem também um ou mais componentes não-proteicos chamados cofatores. O cofator pode ser um íon metálico ou uma molécula orgânica chamada de coenzima; algumas enzimas requerem ambos. Os cofatores são geralmente estáveis ao calor, enquanto que muitas proteínas enzimáticas perdem sua atividade pelo aquecimento. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado holoenzima. Quando o cofator é removido, a proteína remanescente, que é, ela própria, cataliticamente inativa, recebe o nome de apoenzima (LEHNINGER, 1995).

Algumas enzimas requerem íons metálicos como cofatores. Em tais enzimas o íon metálico pode servir como : (i) o centro catalítico primário; (ii) um grupo de ligação para unir o substrato e a enzima em conjunto através da formação de um complexo de coordenação; (iii) um agente estabilizando a conformação da proteína enzimática em sua forma cataliticamente ativa. As enzimas que requerem íons metálicos são algumas vezes denominadas metaloenzimas. Em algumas metaloenzimas, o componente metálico sozinho já possui uma atividade catalítica primitiva, que é grandemente acentuada pela proteína enzimática; por exemplo, a enzima ferro-porfirínica catalase, que catalisa a decomposição muito rápida do peróxido do hidrogênio em água e oxigênio (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

Os sais de ferro simples também catalisam essa reação, porém numa velocidade muito menor. As coenzimas funcionam usualmente como transportadores intermediários dos grupos funcionais, de átomos específicos, ou de elétrons que são transferidos na reação enzimática global. Quando a coenzima está firmemente ligada à molécula enzimática, ela é geralmente denominada grupo prostético. Em alguns casos, todavia, a coenzima está ligada frouxamente e funciona em essência como um dos substratos específicos daquela enzima (LEHNINGER, 1995).

2.1.3 - Efeito do pH na atividade enzimática

A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima; acima ou abaixo desse pH, a atividade se reduz. A inter-relação da atividade enzimática com o pH para qualquer enzima depende do comportamento ácido-básico da enzima e do substrato, bem como de muitos outros fatores que são, em geral, difíceis de analisar quantitativamente. A forma do perfil de atividade em função do pH varia usualmente com a concentração do substrato, um vez que o K_M da maioria das enzimas se altera com o pH. Essas curvas serão mais significativas se a enzima for mantida saturada com o substrato em todos os valores de pH testados. Em muitos estudos da cinética enzimática, o pH é mantido constante no ótimo ou próximo deste (LEHNINGER, 1995).

O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH de seu meio intracelular normal, que pode estar situado na parte ascendente ou descendente de seu perfil de atividade em função do pH. Isso sugere que a inter-relação pH - atividade enzimática pode ser um fator de controle intracelular da atividade da enzima (LEHNINGER, 1995).

2.1.4 - Efeito da temperatura nas reações enzimáticas

Tal como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas geralmente aumenta com a temperatura, dentro de certa faixa de temperatura na qual a enzima é estável e mantém atividade integral. A velocidade da maioria das reações enzimáticas se duplica aproximadamente para cada elevação de 10° C na temperatura (LEHNINGER, 1995).

Ainda que as reações catalisadas por enzimas pareçam muitas vezes apresentar um ótimo de temperatura, as enzimas, sendo proteínas, são desnaturadas pelo calor, e se tornam inativas à medida que a temperatura é elevada além de um certo ponto. O “ótimo” aparente de temperatura é, assim, resultante de dois processos: (i) o aumento usual na velocidade de reação com a temperatura e (ii) o valor crescente de desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica. Ainda que muitas enzimas sejam inativadas em temperaturas acima de 55° C, algumas são bastante estáveis e mantêm a atividade em temperaturas muito mais elevadas, como, por exemplo, as enzimas de várias espécies de bactérias termofílicas que habitam as fontes de água quente, que ainda apresentam atividade em temperaturas superiores a 85° C .

Algumas enzimas, como a ribonuclease, perdem sua atividade pelo aquecimento, mas recuperam-na rapidamente pelo resfriamento, indicando que sua cadeia polipeptídica desenovelada rapidamente retorna à sua conformação nativa (LEHNINGER, 1995).

2.1.5 - A energia de ativação e os efeitos dos catalisadores

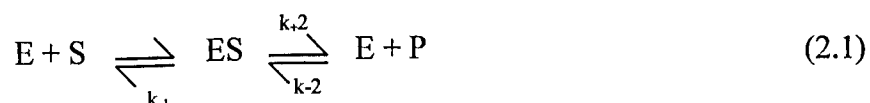
Uma reação química tal como $A \longrightarrow B$ ocorre porque uma determinada fração da população de moléculas A, em um instante qualquer, possui energia suficiente para atingir uma condição ativada, denominada estado de transição, no qual a probabilidade de que uma ligação química se forme ou se rompa para originar o produto P é muito elevada. Esse estado de transição está no alto da barreira energética que separa os reagentes e os produtos. A velocidade de uma determinada reação química é proporcional à concentração dessa espécie do estado de transição. A energia livre de ativação ΔG é a quantidade de energia necessária para levar todas as moléculas, em 1 mol de uma substância, a uma temperatura determinada, à condição de transição no ponto mais elevado da barreira de ativação.

Existem duas maneiras gerais pelas quais a velocidade de uma reação química pode ser aumentada. Uma é pela elevação na temperatura, que provoca um aumento na movimentação térmica e na energia, o que aumenta o número de moléculas capazes de passar ao estado de transição acelerado, assim, a velocidade das reações químicas. Em muitas reações, a velocidade de reação, aproximadamente, duplica quando se eleva a temperatura 10° C. A velocidade de uma reação química pode também ser acelerada pela adição de um catalisador. Os catalisadores se combinam transitoriamente com os reagentes para produzir um estado de transição que apresenta uma energia de ativação menor do que o estado de transição da reação não-catalisada. Assim, eles aceleram as reações químicas pela redução da energia de ativação da reação. Quando os produtos de reação se formam, os catalisadores livres se regeneram (LEHNINGER, 1995).

2.1.6 - Cinética das reações catalisadas por enzimas : a equação de Michaelis-Menten

Os princípios gerais da cinética das reações químicas se aplicam às reações catalisadas por enzimas, porém eles mostram também um aspecto distinto que não se observa usualmente em reações não-enzimáticas, a saturação com o substrato (LEHNINGER, 1995). Em uma concentração baixa de substrato, a velocidade inicial de reação (v_0) é aproximadamente proporcional à concentração do substrato, e a reação é, assim, aproximadamente de primeira ordem com relação ao substrato. Todavia, à medida que a concentração do substrato aumenta, a velocidade inicial da reação se reduz e não mais se torna aproximadamente proporcional à concentração do substrato; nessa zona, a reação é de ordem mista. Com um aumento posterior na concentração do substrato, a velocidade de reação torna-se essencialmente independente da concentração do substrato e aproxima-se assintoticamente de uma velocidade constante. Nessa faixa de concentrações do substrato, a reação é essencialmente de ordem zero com relação ao substrato, e a enzima é considerada como saturada com seu substrato. Todas as enzimas mostram o efeito de saturação, porém este varia amplamente em relação à concentração de substrato necessária para produzi-lo (LEHNINGER, 1995). Esse efeito de saturação levou alguns cientistas precursores, em particular A. J. Brown e também V. Henri, à hipótese de que o substrato e a enzima reagem reversivelmente para formar um complexo, como uma etapa essencial na reação catalisada.

Em 1913, uma teoria geral de ação enzimática e cinética foi desenvolvida por L. Michaelis e M. L. Menten, que foi mais tarde ampliada por G. E. Briggs e J. B. S. Haldane. Essa teoria, que é fundamental para a análise quantitativa de todos os aspectos da cinética enzimática e inibição, é melhor desenvolvida para o caso simples de uma reação na qual existe somente um substrato. A teoria de Michaelis-Menten considera que a enzima E se combina primeiramente com o substrato S para formar o complexo enzima-substrato ES; este se rompe, então, em uma segunda etapa para formar a enzima livre e o produto P:



Essas reações são consideradas reversíveis; as constantes de velocidade para as direções da esquerda para a direita e da direita para a esquerda têm, respectivamente, uma indicação positiva e uma negativa.

A velocidade inicial da reação representada pela equação (2.1) é igual à velocidade de desdobraimento do complexo enzima substrato, ES, para a qual pode-se escrever a equação de velocidade de primeira ordem.

$$v_0 = k_{+2}[ES] \quad (2.2)$$

Entretanto, uma vez que nem k_{+2} nem $[ES]$ podem ser determinados diretamente, deve-se encontrar uma expressão alternativa para v_0 em termos de outras variáveis que podem ser medidas mais facilmente. Através da equação (2.1) e de um balanço de massa para a enzima, chega-se à equação de Michaelis-Menten (SEGEL, 1993):

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.3)$$

onde

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-1}} \quad (2.4)$$

A dedução desta equação foge do escopo deste trabalho.

A equação de Michaelis-Menten inter-relaciona a velocidade inicial, a velocidade máxima e a concentração inicial de substrato. Uma correlação numérica importante resulta desta equação, no caso especial em que a velocidade inicial da reação é exatamente a metade da velocidade máxima, isto é, quando $v_0 = 1/2 V_{\max}$

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.5)$$

Dividindo por V_{\max}

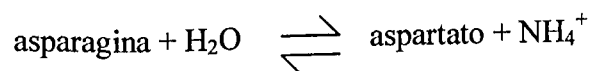
$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.6)$$

Rearranjando, obtém-se

$$\begin{aligned} K_M + [S] &= 2[S] \quad \therefore \\ K_M &= [S] \end{aligned} \quad (2.7)$$

Observa-se assim que K_M , a constante de Michaelis-Menten, é igual a concentração de substrato na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima. O K_M para uma reação de um substrato tem a dimensão de moles por litro, e é independente da concentração enzimática. Esta constante é uma característica importante e útil, fundamental não somente para a descrição matemática da cinética enzimática mas também para o ensaio quantitativo da atividade enzimática nos tecidos e para a purificação da enzima. Além disso, a concentração de substrato que produz metade da velocidade máxima é um índice útil para a análise de alguns mecanismos reguladores de atividade enzimática.

Um exemplo marcante de pesquisa médica mostra a utilidade do K_M de outra maneira. Alguns tipos de leucemia animal e humana (uma forma de câncer em que os leucócitos proliferam anormalmente) podem ser suprimidos pela administração intravenosa da enzima asparaginase que catalisa a reação (LEHNNINGER, 1995):

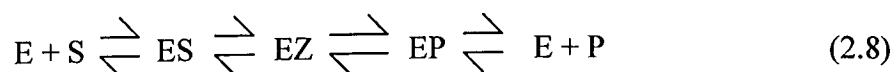


Esse fato levou à conclusão de que a asparagina presente no sangue é um nutriente essencial para o crescimento dos leucócitos da leucemia; a asparaginase intravenosa causa a hidrólise da asparagina a aspartato, o qual não pode satisfazer as necessidades de asparagina.

Durante a pesquisa para fontes de asparaginase adequada para o tratamento da leucemia, constatou-se, surpreendentemente, que nem todas as asparaginases eram eficientes na supressão da leucemia experimental. A razão foi finalmente encontrada: as asparaginases de fontes diferentes - animais, vegetais e bacterianas - diferem amplamente em seu K_M para a asparagina. Uma vez que a concentração da asparagina no sangue é muito baixa, a administração de uma asparaginase de uma outra espécie só poderá ser efetivamente terapêutica se o seu valor de K_M for suficientemente reduzido para hidrolisar a asparagina rapidamente na concentração baixa em que ela se encontra no sangue.

O comportamento cinético da maioria das enzimas é mais complexo do que o observado em uma reação ideal simples de um substrato, como foi visto. Um dos aspectos é que esta dedução considerou que, em uma reação de um substrato, existe somente um

complexo de enzima-substrato; todavia parece atualmente provável que muitas reações enzimáticas de um só substrato possam envolver dois ou três complexos intermediários, como indicado na seqüência:



Onde EZ é o complexo de transição de estado e EP é um complexo enzima-produto. Além disso, somente uma minoria das reações enzimáticas apresenta um único substrato; a maioria das enzimas tem dois ou mais substratos e pode ter dois ou mais produtos. A análise cinética das reações enzimáticas que envolvem múltiplos reagentes e múltiplos produtos é complexa; entretanto a correlação de Michaelis-Menten continua sendo o ponto de partida para a análise da cinética de todas as reações enzimáticas.

2.1.7 - Inibição enzimática

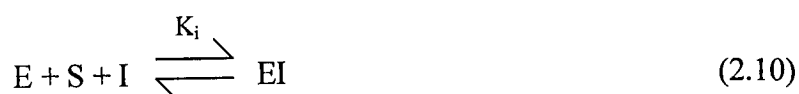
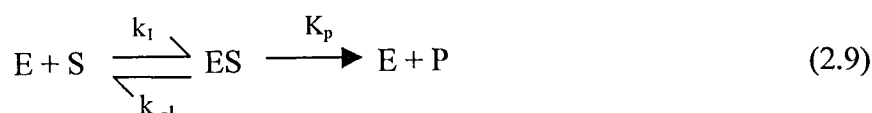
A partir do estudo dos inibidores enzimáticos, inestimável informação foi obtida quanto ao mecanismo e seqüência da catálise enzimática, especificidade enzimática para o substrato, natureza e grupamentos funcionais na manutenção da conformação ativa da molécula da enzima. Além disso, a inibição de certas enzimas por metabólitos específicos é um elemento importante na regulação do metabólito intermediário (LEHNINGER, 1995).

Os três tipos principais de inibição enzimática reversível - competitivo, não competitivo e incompetitivo - podem ser distinguidos experimentalmente pelos efeitos do inibidor sobre a cinética de reação da enzima, que pode ser analisada em termos da equação básica de velocidade de Michaelis-Menten. Para a análise cinética válida, o inibidor deve combinar rápida e reversivelmente com a enzima ou com o complexo enzima-substrato.

2.1.7.1 - Inibição competitiva

Um inibidor competitivo é uma substância que se combina com uma enzima livre, impedindo a ligação entre a enzima e o substrato. Ou seja, o inibidor e o substrato são mutuamente exclusivos na maioria dos casos de competição entre o inibidor e o substrato (SEGEL, 1993).

O mecanismo que descreve a inibição competitiva é ilustrado abaixo:



Onde:

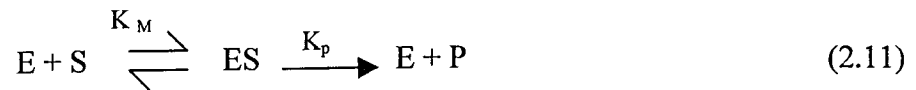
I = concentração do inibidor

K_i = constante de inibição

A partir da relação entre a estrutura molecular de um inibidor competitivo e sua afinidade pela enzima, expressa por K_i , informação valiosa sobre a estrutura e a geometria do sítio ativo pode ser obtida. Essa é uma abordagem importante para o mapeamento dos sítios ativos das enzimas (LEHNINGER, 1995).

2.1.7.2 - Inibição Incompetitiva

A inibição incompetitiva, nome esse não muito adequado, caracteriza-se pelo fato de o inibidor não se combinar com a enzima livre nem afetar sua reação com seu substrato normal; contudo ele se combina com o complexo enzima-substrato para originar um complexo inativo enzima-substrato-inibidor, incapaz de sofrer a etapa subsequente da reação para produzir o produto normal:



A constante do inibidor é, assim,

$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (2.13)$$

Essas inter-relações mostram que o grau de inibição pode aumentar quando a concentração do substrato é aumentada.

Assim como no caso da inibição não competitiva, para qualquer valor de I, não existe valor de S que leve toda a enzima à forma ES (SEGEL, 1993).

2.1.7.3 - Inibição Não-Competitiva

Um inibidor não-competitivo pode combinar seja com a enzima livre seja com o complexo enzima-substrato, interferindo na ação de ambos. Os inibidores não-competitivos ligam-se a um sítio da enzima diferente do sítio ativo, muitas vezes ocasionando a deformação da enzima, de modo que ela não forma o complexo ES na velocidade usual e, uma vez que ele se forma, o complexo ES não se desdobra na velocidade normal para originar os produtos. Esses efeitos não são revertidos pelo aumento da concentração do substrato (LEHNINGER, 1995).

Na inibição não-competitiva, a reação com o inibidor produz duas formas inativas, EI e ESI,



para as quais existem duas constantes de inibição, que podem ou não ser iguais:

$$K_I^{EI} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (2.16)$$

$$K_I^{ESI} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (2.17)$$

O tipo mais comum da inibição não-competitiva é dado pelos reagentes que podem se combinar reversivelmente com alguns grupos funcionais da enzima (fora do sítio ativo) que são essenciais na manutenção da atividade catalítica da conformação tridimensional da molécula enzimática. Algumas enzimas (mas não todas) que possuem um grupamento essencial -SH são inibidas não-competitivamente pelos íons de metais pesados sugerindo que tais grupos -SH devem estar intactos para que a enzima mantenha sua conformação nativa normal. (LEHNINGER, 1995).

Algumas enzimas que requerem íons metálicos para apresentar atividade são inibidas não-competitivamente por agentes capazes de ligar o metal essencial. Por exemplo, o agente quelante etilenodiamina-tetracetato (EDTA) liga-se reversivelmente ao Mg^{2+} e outros cátions bivalentes inibindo, assim, não-competitivamente algumas enzimas que requerem esses íons para sua atividade.

2.1.7.4 - Inibição Irreversível: Modificação Enzimática

Na inibição reversível das enzimas, o inibidor participa em um equilíbrio nitidamente reversível, que se estabelece com rapidez, com a enzima ou o complexo enzima-substrato, equilíbrio esse que pode ser analisado em termos do formalismo de Michaelis-Menten. Contudo algumas enzimas sofrem inativação irreversível quando são tratadas com agentes capazes de modificar através de ligação covalente e permanente, um grupo funcional necessário para a catálise tornando a molécula enzimática inativa. Esse tipo de inibição não pode ser analisado pelos princípios de Michaelis-Menten, que consideram a formação dos complexos EI ou ESI como reversível. Muitas vezes essa inibição irreversível se estabelece lentamente em comparação com a cinética de reação normal da enzima, de modo que a inibição é inicialmente incompleta, porém aumenta de maneira contínua com o tempo, devido à modificação química de uma fração progressiva de moléculas enzimáticas.

2.2 - Enzimas Imobilizadas

Enzimas são catalisadores biológicos que, como outros catalisadores, não são consumidas nas reações em que participam. Entretanto em muitos casos, as enzimas são solúveis no meio onde são utilizadas, e não são recuperadas no final da reação. Obviamente, os processos tornam-se mais econômicos com a reutilização da enzima, desde que esta possa ser recuperada de uma maneira conveniente.

Kennedy; Cabral (1987) apud NAGODAWITHANA; REED (1993) definiram enzimas imobilizadas como “enzimas que são fisicamente confinadas ou localizadas em regiões definidas do espaço com retenção das suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente”. Alguns autores usam uma definição mais restrita, incluindo apenas enzimas que são ligadas a um material sólido.

A primeira publicação de um trabalho sobre imobilização de enzimas foi feita por Nelson; Griffin (1916) apud NAGODAWITHANA; REED (1993). Eles promoveram a adsorção da invertase em hidróxido de alumínio, com a retenção da atividade catalítica. Desde então, especialmente durante as últimas décadas, um vasto número de métodos de imobilização de enzimas tem sido apresentado.

O primeiro processo comercial utilizando enzimas imobilizadas ocorreu no Japão, em 1969. Tratava-se da produção de L-aminoácidos pela L-aminoacilase (Chibata, 1976 apud NAGODAWITHANA; REED, 1993). Atualmente, vários processos industriais utilizando enzimas imobilizadas estão em operação. Alguns exemplos são comentados no item 2.3.

2.2.1 - Métodos de Imobilização

A imobilização de enzimas pode ser feita por métodos químicos ou por métodos físicos. No primeiro caso, as enzimas são ligadas a um suporte através de ligações químicas. Isto simplifica o manuseio da enzima, permitindo que ela seja separada facilmente do meio através de uma filtração, ou ainda que seja utilizada em um reator de leito fixo.

Às vezes, a ligação química entre a enzima e o suporte é desnecessária, e a adsorção física em um polímero gel pode ser suficiente. Se o meio reacional for líquido, a enzima pode ser retirada por uma membrana impermeável à ela porém permeável aos substratos e produtos.

Uma outra possibilidade é o uso de um sistema bifásico, no qual a enzima é confinada em uma das fases (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

2.2.1.1 - Imobilização em um suporte sólido através de ligação covalente

Vários métodos de imobilização de enzimas em material sólido através de ligações covalentes têm sido desenvolvidos. Na maior parte deles, aminoácidos de resíduos de lisina constituem o principal grupo reativo. Entretanto, em muitos casos, as ligações ocorrem devido a grupos sulfidril da cisteínas, ou hidroxifenólicos das tirosinas, carboxilas dos ácidos glutâmico e aspártico e, ocasionalmente, outros grupos (Srere; Uyeda, 1976 apud NAGODAWITHANA; REED, 1993).

Muitos materiais sólidos podem ser usados como suporte nas imobilizações de enzimas. O principal pré-requisito é que o material possua propriedades físicas e químicas adequadas ao reator e às condições de operação da reação. Além disso, o suporte deve conter grupos funcionais adequados para ligarem-se às enzimas.

Outras características importantes estão ligadas às dimensões das partículas dos suportes. Partículas pequenas diminuem as limitações de transferência de massa, porém, quando utilizadas em reatores de leito fixo, levam à grandes quedas de pressão. As partículas devem ser porosas com uma grande área superficial, para que possam conter uma grande quantidade de enzima, resultando em um preparado com alta atividade.

Vários polissacarídeos são utilizados como suporte em imobilização de enzimas, como a agarose, a dextrana, o amido e a celulose. Estes compostos contém muitos grupos hidroxila que podem ser usados como ligantes. Outros materiais são utilizados nas imobilizações, como os poliácridatos, a bentonita e vários tipos de vidros.

Normalmente, a imobilização das enzimas é conduzida em duas etapas. Inicialmente, o suporte é tratado com reagentes que ativam alguns dos seus grupos funcionais. Em seguida, o suporte ativado é misturado à enzima e a imobilização é atingida. Alguns dos reagentes utilizados na ativação dos suportes contém grupos amina ou hidroxila, como mostrado na Figura 2.1. O brometo de cianogênio foi largamente utilizado no passado, porém caiu em desuso devido à sua alta toxicidade. Na indústria alimentícia, o glutaraldeído é um reagente freqüentemente utilizado na imobilização de enzimas. Os grupos amina do suporte e das

enzimas podem formar bases Schiff com os grupos aldeído do glutaraldeído, como mostra a Figura 2.1.

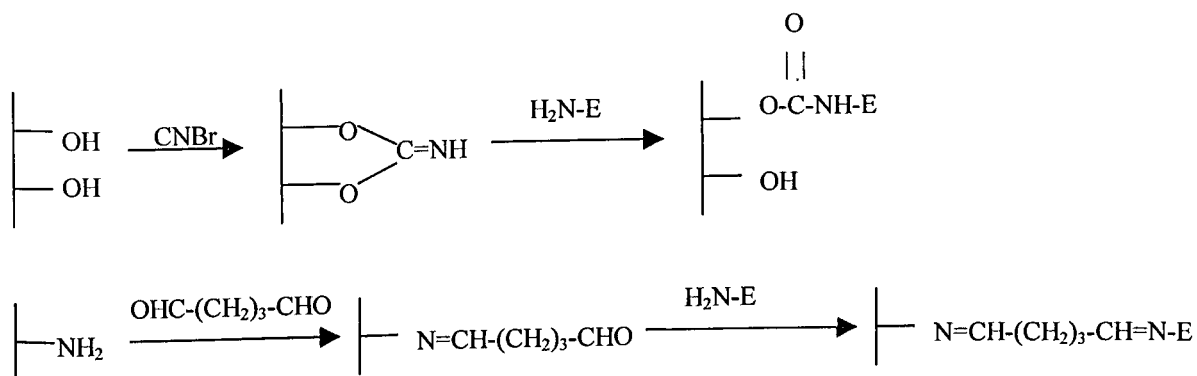


Figura 2.1 – Exemplos de imobilização de enzimas em suporte sólido através de ligações covalentes.

2.2.1.2 - Ligação Cruzada

Um outro método de imobilização consiste em efetuar ligações cruzadas entre as moléculas da enzima, através de reagentes interligantes adequados. Deste modo, a enzima funciona como catalisador e como suporte. Como resultado obtém-se agregados de cadeia extremamente longa, que eventualmente podem tornar-se pouco solúveis.

O glutaraldeído é o reagente mais utilizado nas imobilizações por ligação cruzada. Este método é freqüentemente empregado juntamente com outras técnicas de imobilização de enzimas, como por exemplo a adsorção física (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

2.2.1.3 – Adsorção

A adsorção é o mais simples método de imobilização de enzimas.

O suporte é misturado com uma solução da enzima. Depois de algum tempo, o suporte com a enzima adsorvida é separado da solução através de uma filtração. As forças de atração entre o suporte e a enzima podem ser forças de Van der Waals, interações iônicas ou interações específicas. Os suportes comumente utilizados são a alumina, o carvão ativado, a

terra diatomácea e o vidro. Para se conseguir a imobilização através de interações iônicas, materiais como celulose, Sephadex e poliestireno vêm sendo amplamente utilizados.

A principal vantagem na utilização da adsorção como método de imobilização de enzimas é a sua simplicidade. A desvantagem é que pode ocorrer perda de enzima por dessorção, especialmente se as condições do meio reacional (pH, força iônica, etc.) forem drasticamente diferentes daquelas encontradas durante o processo de adsorção (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

2.2.1.4 - Enzimas em meio orgânico

As enzimas sempre foram utilizadas em meio aquoso. Entretanto, pesquisas mostram que as enzimas podem trabalhar muito bem em meios orgânicos, com pouca quantidade de água presente (Laane et al., 1987 apud NAGODAWITHANA; REED, 1993). A principal vantagem desta técnica comparada com o uso de meios reacionais aquosos é o incremento na conversão de substâncias hidrofóbicas devido ao incremento na solubilidade do substrato. Além disso, reações hidrolíticas podem ser revertidas, por exemplo, para a síntese de peptídeos a partir de aminoácidos.

Um caminho prático para preparar a enzima para ser utilizada em um meio orgânico é imobilizá-la em um suporte sólido. A enzima pode ser adsorvida pelo suporte ou simplesmente depositada sobre ele, através da secagem de uma mistura contendo o suporte e uma solução aquosa da enzima. Essas preparações necessitam de pequenas quantidades de água para tornarem-se ativas, geralmente menos de 1% do volume total do meio reacional (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

O risco de dessorção da enzima, neste caso, é pequeno, pois as enzimas são insolúveis em quase todos os solventes orgânicos. Os suportes comumente utilizados são o vidro e a terra diatomácea.

Uma outra técnica para o uso de enzimas em meio orgânico é adicioná-las, na forma de pó, diretamente sobre o solvente. Contudo, a adsorção em um suporte adequado aumenta consideravelmente a atividade do preparado.

2.2.1.5 - Imobilização em polímero – gel

Neste método, mistura-se a enzima a uma solução contendo um monômero adequado ao processo. A enzima é imobilizada durante o processo de polimerização do monômero. O monômero mais utilizado nesta técnica é a acrilamida

A enzima é dissolvida em uma solução aquosa contendo acrilomida e um bi-acrilato, para agir como interligante. A polimerização envolve dois riscos para a enzima. Os radicais formados durante a reação e os monômeros podem reagir com a enzima e inativá-la. Além disso, o calor gerado durante a polimerização também pode inativar a enzima.

Uma alternativa para a dissipação do calor é conduzir a polimerização em um meio orgânico. Desse modo, o calor gerado é absorvido pelo solvente (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

2.2.1.6 - Imobilização em microcápsulas

As enzimas podem ser imobilizadas em microcápsulas formadas por membranas permeáveis aos substratos e produtos, porém impermeáveis às enzimas.

Neste método, prepare-se uma emulsão com pequenas gotas de um monômero e de soluções aquosas de enzima, dispersas em um outro monômero. A polimerização ocorre na interface, resultando na imobilização da enzima. O tamanho das microcápsulas pode ser variado utilizando-se diferentes condições durante a emulsificação.

Os polímeros preparados por este método incluem poliamidas, poliuretanos e poliésteres (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

Muitos trabalhos utilizando esta técnica forma desenvolvidos para aplicações médicas, e não para bioconversões em escala industrial (CHANG, 1977).

2.2.1.7 – Imobilização em membranas

As membranas são utilizadas para reter as enzimas enquanto os produtos são retirados do reator. As membranas podem ser lisas ou porosas, e são confeccionadas com materiais permeáveis aos produtos e reagentes, porém impermeáveis às enzimas.

As reações de redução de cetoácidos em aminoácidos vêm sendo conduzidas em reatores que utilizam membranas (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

2.2.1.8 – Imobilização em sistema bifásico

Conduzindo uma reação enzimática em um sistema bifásico, a enzima pode ser retida em uma das fases, enquanto os produtos são removidos do reator através da outra fase.

Os sistemas bifásicos podem ser dos tipos fase orgânica/fase aquosa ou fase aquosa/fase aquosa. Sistemas fase orgânica/fase aquosa vêm sendo utilizados com sucesso na produção de substâncias hidrofóbicas, como os esteróides. Os solventes (fase orgânica) devem ser escolhidos levando-se em conta a sua capacidade de dissolver os substratos e produtos e a sua influência sobre a enzima. Pode ocorrer desnaturação da enzima na interfase, especialmente se o meio for vigorosamente agitado.

Os sistemas bifásicos fase aquosa/fase aquosa, utilizados em reações enzimáticas, são obtidos através da mistura de soluções aquosas de dois polímeros incompatíveis (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

2.3 - A UTILIZAÇÃO DA LIPOZYME E DA NOVOZYM 435 EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO :

A Lipozyme é uma lipase 1,3 - específica desenvolvida para catalisar reações de interesterificação e esterificação. Esta enzima é obtida a partir de uma cepa selecionada do *Mucor miehei*. O gene responsável pela produção da lipase é transferido do *Mucor miehei* para um organismo hospedeiro, o *Aspergillus oryzae*. A lipase é então imobilizada em uma resina fenólicas de troca aniônica. Na Figura 2.2 encontra-se uma ilustração desta lipase, na sua forma livre.

A Novozym 435 é uma lipase não específica desenvolvida para catalisar a síntese de ésteres. Trata-se de uma enzima obtida a partir de uma cepa da *Candida antarctica*. O gene responsável pela produção da lipase é transferido da *Candida antarctica* para um organismo hospedeiro, o *Aspergillus oryzae*. A enzima é então imobilizada em uma resina acrílica macroporosa. Na Figura 2.3 encontra-se uma ilustração desta lipase, na sua forma livre.

Recentemente, com o desenvolvimento da Novozym 435 para a síntese de ésteres, a NOVO NORDISK recomenda a utilização da Lipozyme apenas em reações de interesterificação e da Novozym 435 em reações de esterificação. Entretanto, vários pesquisadores continuam a utilizar a Lipozyme em reações de esterificação, apresentando resultados satisfatórios.

Nos últimos anos, a Lipozyme e a Novozym 435 vêm sendo largamente utilizadas na fabricação de vários produtos de interesse comercial, com aplicações nas áreas farmacêutica, de cosméticos, alimentícia, de sabões e detergentes e de lubrificantes, dentre outras.

2.3.1 - APLICAÇÕES NA ÁREA FARMACÊUTICA :

Na indústria farmacêutica, há uma crescente necessidade de preparação de compostos opticamente ativos puros.

Dentre as várias técnicas disponíveis de resolução de misturas racêmicas, as que utilizam enzimas tornaram-se as mais populares atualmente (DUAN et al., 1997). A principal razão para isto é que as enzimas estão cada vez mais eficientes e baratas, em função dos avanços na área da biocatálise (KLIBANOV, 1989; CABRAL, 1994).

As condições brandas da reação, a alta enantioseletividade e as características biodegradáveis das enzimas também contribuem para tornar a resolução enzimática cada vez mais atrativa.

Os profenos, formas racêmicas do ácido 2 - arilpropiónico, são um importante grupo de anti-inflamatórios não esteroidais. As suas propriedades terapêuticas são atribuídas quase exclusivamente ao enantiômero S (Famaey; Paulus, 1992 apud DUAN et al., 1997). Portanto, é necessária a resolução dos racematos dos profenos, de modo a se obter o composto biologicamente ativo puro. Nos últimos anos, essa resolução vem sendo feita utilizando-se lipases.

RANTAKYLA; AALTONEN (1994) realizaram a esterificação enantioseletiva do ibuprofeno em dióxido de carbono supercrítico. Foi utilizada uma mistura racêmica dos enantiômeros S(+) e R(-). A Lipozyme favoreceu a formação de ésteres do enantiômero S(+), que é a forma biologicamente ativa do ibuprofeno.

DUAN et al. (1997) utilizaram a Novozym 435 para resolver uma mistura dos isômeros R e S do cetoprofeno. A enzima promoveu a esterificação somente do R-cetoprofeno, permitindo assim a separação do S-cetoprofeno puro.

Outra grande vantagem das enzimas é a seletividade, característica de grande importância em reações envolvendo compostos polifuncionais. Nesses casos, a utilização de enzimas permite conduzir reações altamente seletivas, sem a necessidade do uso de grupos de proteção.

A esterificação do ácido láctico com diferentes álcoois foi estudada por FROM et al. (1997). Nessas reações, existe a possibilidade do ácido láctico atuar como doador de acil ou como nucleófilo, formando dímeros e oligômeros. Isto pode ser evitado ou pela adição de um protetor do grupo hidroxila, ou pelo uso de uma enzima com a qual o ácido láctico não se comporte como nucleófilo. FROM et al. optaram pela segunda alternativa, utilizando com sucesso a Novozym 435 como catalisador.

2.3.2 - SÍNTESE DE SURFACTANTES:

Os surfactantes são substâncias que alteram as propriedades da superfície de um líquido, ou da interface de um líquido e um sólido. Esses compostos são largamente empregados nas indústrias farmacêutica, de cosméticos, alimentícia e de sabões e detergentes.

Uma classe de surfactantes aniônicos de grande interesse comercial é obtida através da esterificação de ácidos graxos por carboidratos. Essa reação consiste na mono-acilação de mono ou oligossacarídeos, geralmente na presença de solventes e agentes solubilizantes.

As acilações de açúcares catalisadas por lipases são regioseletivas, oferecendo assim uma alternativa frente à pobre seletividade das sínteses realizadas pela rota química.

SCHLOTTERBECK et al. (1993) conduziram a monoacilação da frutose com o ácido esteárico, na presença do hexano. A Lipozyme foi utilizada como catalisador. A síntese de produtos, os isômeros estearato de β -1-frutopiranosose e estearato de 1-frutofuranose, só ocorreu com o auxílio de um solubilizante, o ácido fenilborônico. Os ácidos borônicos formam um complexo carboidrato-boronato, solúvel em solventes orgânicos não polares.

OGUNTIEMIN et al. (1993) realizaram a síntese de ésteres de glicose e frutose em diferentes condições. Os ésteres de frutose foram obtidos a partir de vários ácidos graxos: butírico, capríco, láurico, mirístico, palmítico, oleico, esteárico e aracdônico. As reações foram conduzidas a 40° C na presença do álcool t-butílico, e catalisadas pela SP 382 (*Candida* sp. imobilizada). Com a utilização dos ácidos capríco e láurico houve pouca formação de produtos (5 μ mol/ml e 6 μ mol/ml, respectivamente). Com os demais ácidos, os produtos foram obtidos em maiores quantidades (entre 20 e 25 μ mol/ml).

Os ésteres de glucose foram obtidos do ácido esteárico, utilizando os ácidos fenilborônico e butilborônico como solubilizantes, além de vários solventes: benzeno, heptano, hexano, t-metil, tolueno, dioxano e álcool t-butílico. As reações foram conduzidas por 46 horas a 40° C, e catalisadas pela Lipozyme. A maior formação de produtos (9,32 μ mol/ml) foi obtida utilizando-se o ácido fenilborônico e o heptano.

A síntese de ésteres dos anidrosorbitóis produz surfactantes utilizados principalmente na indústria alimentícia. Atualmente, os ésteres dos anidrosorbitóis são preparados comercialmente através da esterificação direta do sorbitol com um ácido graxo, em temperaturas entre 225-250°C e utilizando catalisadores ácidos. O resultado é uma mistura de mono e diésteres de sorbitol, além de sorbitanos e isosorbatos. Portanto, há a necessidade de desenvolver um processo que leve à formação de um único éster, sem produtos secundários.

MUKESH et al. (1993) realizaram a esterificação de isosorbato e sorbitol utilizando a Lipozyme. As reações foram conduzidas a 50° C, em um reator tubular cujo empacotamento consistia de enzima, sílica gel e reagente sólido (isosorbato ou sorbitol).

A esterificação do isosorbato produziu apenas monoleato, com 95% de conversão em 13 horas de reação. O sorbitol levou à formação de quantidades equivalentes de mono e

dioléato, com aproximadamente 42% de conversão. A adição do monoléato de sorbitano, um surfactante, fez com que essa conversão se elevasse para 75%.

As amidas graxas de N-metil taurina constituem um grupo extremamente importante de surfactantes aniônicos, estáveis em meio alcalino e com boa degradabilidade (LINFELD, 1968, apud MAUGARD, 1997). As rotas químicas utilizadas na síntese desses produtos possuem sérias desvantagens: altas temperaturas, que causam escurecimento dos produtos; o uso de solventes tóxicos; a formação de produtos secundários que devem ser eliminados no final da reação.

A produção de N-oleil-aurina de sódio foi realizada por MAUGARD et al. (1997), utilizando a Lipozyme e a Novozym 435 como catalisadores. O meio reacional consistia de ácido oleico e taurina de sódio em várias proporções, diluídos em hexano, a 55° C. Após 48 horas de reação, a maior conversão obtida foi 25%, utilizando os reagentes em proporções estequiométricas.

Os resultados conseguidos com a Novozym 435 foram similares aos obtidos com a Lipozyme.

2.3.3 - SÍNTESE DE TRIACILGLICERÓIS

A esterificação de ácidos graxos para a produção de triacilgliceróis, pela rota química, nem sempre é um processo comercialmente viável, principalmente por causa das altas temperaturas utilizadas. As condições mais brandas da reação, e a possibilidade de se obter produtos mais homogêneos, tornam a esterificação enzimática cada vez mais atraente.

ERGAN et. al. (1988) desenvolveram um trabalho pioneiro na síntese de triacilgliceróis. O meio reacional consistia de ácido oleico e glicerol em proporções estequiométricas, sem a presença de qualquer solvente orgânico. A reação, catalisada pela Lipozyme, foi conduzida a 34° C durante 4 semanas, atingindo 90% de síntese de trioleína. A água produzida era removida com o auxílio de peneiras moleculares.

Mais tarde, ERGAN; TRANI (1991), aperfeiçoando o experimento anterior, conseguiram quase 100% de formação de produtos em menos de 100 horas de reação. Neste experimento, uma bomba de vácuo conectada ao topo do reator promovia a remoção contínua da água, o que permitiu uma maior conversão em um menor tempo de reação.

2.3.4 - DEACIDIFICAÇÃO DE ÓLEOS

A redução da acidez de óleos hiperácidos, antes do refino, pode ser uma alternativa interessante para as indústrias de óleos e gorduras. Quando aplicado a óleos com alta acidez, o processo convencional de neutralização com soda cáustica pode levar à formação de grande quantidade de borras de sabão. Isto faz com que sejam criadas emulsões irreduzíveis, causando perdas significativas de óleo.

Alguns autores conseguiram reduzir a acidez de óleos hiperácidos a menos de 5%, utilizando lipases (Kurashige, 1987; Bhattacharyya et al., 1989 apud DUCRET et al., 1992).

DUCRET et al. (1992) determinaram as condições ótimas de reação para a deacidificação de um óleo reconstituído de alta acidez (37,7%). A composição do meio, em mmol/100g, era: 21,5 de triacilgliceróis, 38,9 de 1,3- diacilgliceróis, 17,3 de 1,2- diacilgliceróis, 23,8 de monoacilgliceróis, 136,1 de ácidos graxos livres e 10,2 de glicerol.

As condições ótimas da reação foram encontradas em 20mmHg de pressão, temperatura de 60° C e 5,5% de Lipozyme (massa de enzima/ massa do meio). Após 15 horas de reação, atingiu-se 93% de conversão dos ácidos graxos livres em mono, di e triacilgliceróis.

2.3.5 - SÍNTESE DE EMULSIFICANTES

Os emulsificantes são substâncias utilizadas para estabilizar uma emulsão, através da diminuição da tensão superficial entre as duas fases líquidas. Os monoacilgliceróis e os diacilgliceróis são largamente utilizados como emulsificantes nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia.

Pela rota química, os monoacilgliceróis são produzidos através da transesterificação entre triacilgliceróis e glicerol, em temperaturas superiores a 200° C. Uma grande desvantagem deste processo, além das altas temperaturas, é a formação de produtos secundários indesejáveis (OMAR et al., 1989; AKOH, 1993).

A produção de monoacilgliceróis por processos biocatalíticos, seja por esterificação direta ou por transesterificação, vem despertando grande interesse nos últimos anos. As temperaturas mais brandas e a minimização ou exclusão dos subprodutos indesejáveis contribuem para tornar a síntese enzimática cada vez mais atraente.

OMAR et al. (1989) examinaram a performance da Lipozyme na síntese do óleo glicerol acetona, composto que, por hidrólise, produz a monooleína. O meio reacional consistia de ácido oleico, glicerol acetona (2,2 dimetil 1,3 dioxolano 4 metanol) e Lipozyme, sem a presença de solventes orgânicos. As reações foram conduzidas a 40° C durante 48 horas. As maiores conversões (cerca de 90%) foram atingidas utilizando-se ácido oleico em excesso.

Há alguns anos, trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de comparar a utilização de fluidos supercríticos com os solventes orgânicos, em reações catalisadas por lipases.

Os fluidos supercríticos podem reduzir limitações de transferência de massa, devido à grande difusividade dos reagentes nesses meios e à baixa viscosidade da mistura reacional. Além disso, fluidos supercríticos fornecem meios convenientes para a separação dos produtos e recuperação dos reagentes.

MARTY et al. (1990) conduziram a síntese do oleato de etila em dióxido de carbono supercrítico. A reação foi catalisada pela Lipozyme. O resultado foi 100% de conversão em apenas 80 minutos, a 13 MPa e 40° C.

AKOH (1993) estudou as atuações da Lipozyme e da SP 382 (lipase imobilizada da *Candida antarctica*) na produção de mono e diacilgliceróis. O objeto do estudo foi a esterificação do ácido oleico com 1,2- ou 2,3-isopropilideno glicerol, na ausência de solventes.

As reações foram conduzidas durante 48 horas à temperatura de 65° C. Foi utilizado um reator aberto, permitindo assim a evaporação da água produzida durante a reação.

Os diferentes substratos empregados não afetaram a conversão total da reação, que foi de aproximadamente 70%. Entretanto, notou-se que, na presença do 2,3- isopropilideno glicerol, a Lipozyme produziu mais monooleína e menos dioleína do que a SP 382.

2.3.6 - PRODUÇÃO DE AROMAS

As indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos há muito tempo utilizam os aromas artificiais para realçar ou conferir aroma e sabor aos seus produtos. Essas substâncias são obtidas ou por esterificação direta dos ácidos graxos, ou pela reação entre o álcool e o cloreto de acila obtido do ácido graxo.

Há alguns anos, as indústrias vêm substituindo os aromas artificiais pelos naturais, obtidos a partir dos óleos essenciais, que conferem ao produto maior qualidade, pureza e menor toxicidade. Porém, os altos custos envolvidos nos processos de extração das matérias primas e os baixos rendimentos freqüentemente tornam os aromas naturais economicamente inviáveis.

Uma alternativa é utilizar os aromas sintetizados por processos biocatalíticos, considerados naturais pelas agências reguladoras. (GILLIES et al., 1987; LANGRAND et al., 1988; AKOH, 1993; CASTRO et al., 1997).

LANGRAND et al. (1988) testaram treze lipases comerciais na síntese de butiratos, propionatos e acetatos de isoamila e de geranila, empregados como aromas naturais nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia. O meio reacional era formado por ácido e álcool, em proporções equimolares, e heptano, utilizado como solvente.

As reações foram conduzidas a 37° C por 24 horas. A Lipozyme foi uma das enzimas que apresentaram os melhores resultados, principalmente nos ésteres dos ácidos butírico e propiônico.

Para evitar problemas de separação, flamabilidade e toxicidade vários pesquisadores têm optado por conduzir a produção de aromas sem a utilização de solventes (Leltgeb; Knez, 1990, Fregapane et al., 1991, Gandhi et al., 1995 apud LANGRAND, 1988, OGUNTMEIN et al., 1995). KARRA-CHAABOUNI et al. (1996) realizaram a esterificação dos ácidos propiônico e butírico com geraniol, na ausência de solventes. Foram utilizadas enzimas derivadas do *Rhizopus arrhizus* (Lipase 5700) e do *Mucor miehei* (esterase 30000, Piccantase B, lipase 193 e Lipozyme). As reações foram conduzidas a 37° C durante 150 horas. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização da esterase 30000, que levou à formação de 85% de butirato de geranila em 25 horas de reação. Empregando-se a Lipozyme, obteve-se 66% de conversão no mesmo período.

Nos últimos anos, a produção de ésteres do citrionelol tem sido objeto de vários estudos. CLAON; AKOH (1993) testaram as enzimas SP 382, SP 435 (lipases imobilizadas da *Candida antarctica*), Lipozyme IM 20 e IM 60 (lipases imobilizadas do *Mucor miehei*) e Palatase 1000L (lipase não imobilizada do *Aspergillus niger*) na produção de acetatos, butiratos, caproatos e caprilatos de geranila e de citrionelila. As reações foram conduzidas a 30° C e 200 rpm, durante 24 horas, utilizando o hexano como solvente. Com as enzimas SP 382 e SP 435, foram obtidos altos graus de conversão (entre 90% e 100%) na formação de todos os ésteres. A Lipozyme IM 20 e a Lipozyme IM 60 levaram a resultados semelhantes na produção dos caproatos e caprilatos de geranila e de citrionelila. Em relação à produção dos

acetatos, estas enzimas obtiveram resultados pouco satisfatórios, entre 5% e 25% de síntese de produtos. Isto mostra que as lipases do *Mucor miehei* são mais sensíveis à inibição pelo ácido acético do que as lipases da *Candida antarctica*.

A utilização da Palatase 1000L levou à obtenção dos piores resultados, com conversões entre 1% e 22% para os ésteres do citrionelol, e entre zero e 40% para os ésteres do geraniol.

CASTRO et al. (1997) estudaram a produção do acetato de citrionelila, catalisada pela Lipozyme IM 20, por três diferentes métodos: esterificação direta, alcoólise e transesterificação. Chegou-se à conclusão que a alcoólise é o melhor caminho para a síntese de ésteres do ácido acético, quando utilizam-se lipases do *Mucor miehei* como catalisadores.

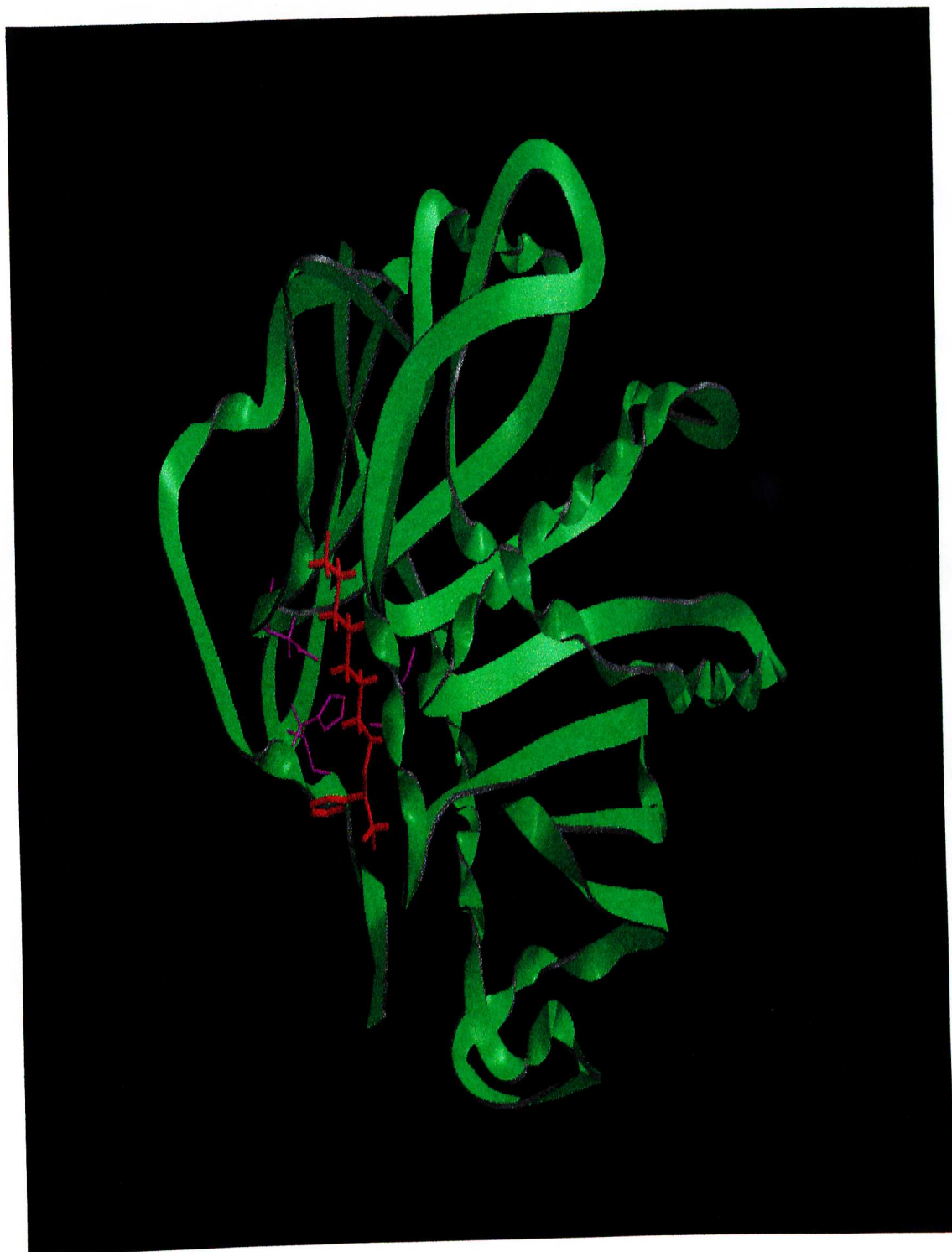


Figura 2.2 – Ilustração de uma lipase obtida do *Mucor miehei*.

Fonte: Kluyver Laboratory for Biotechnology.

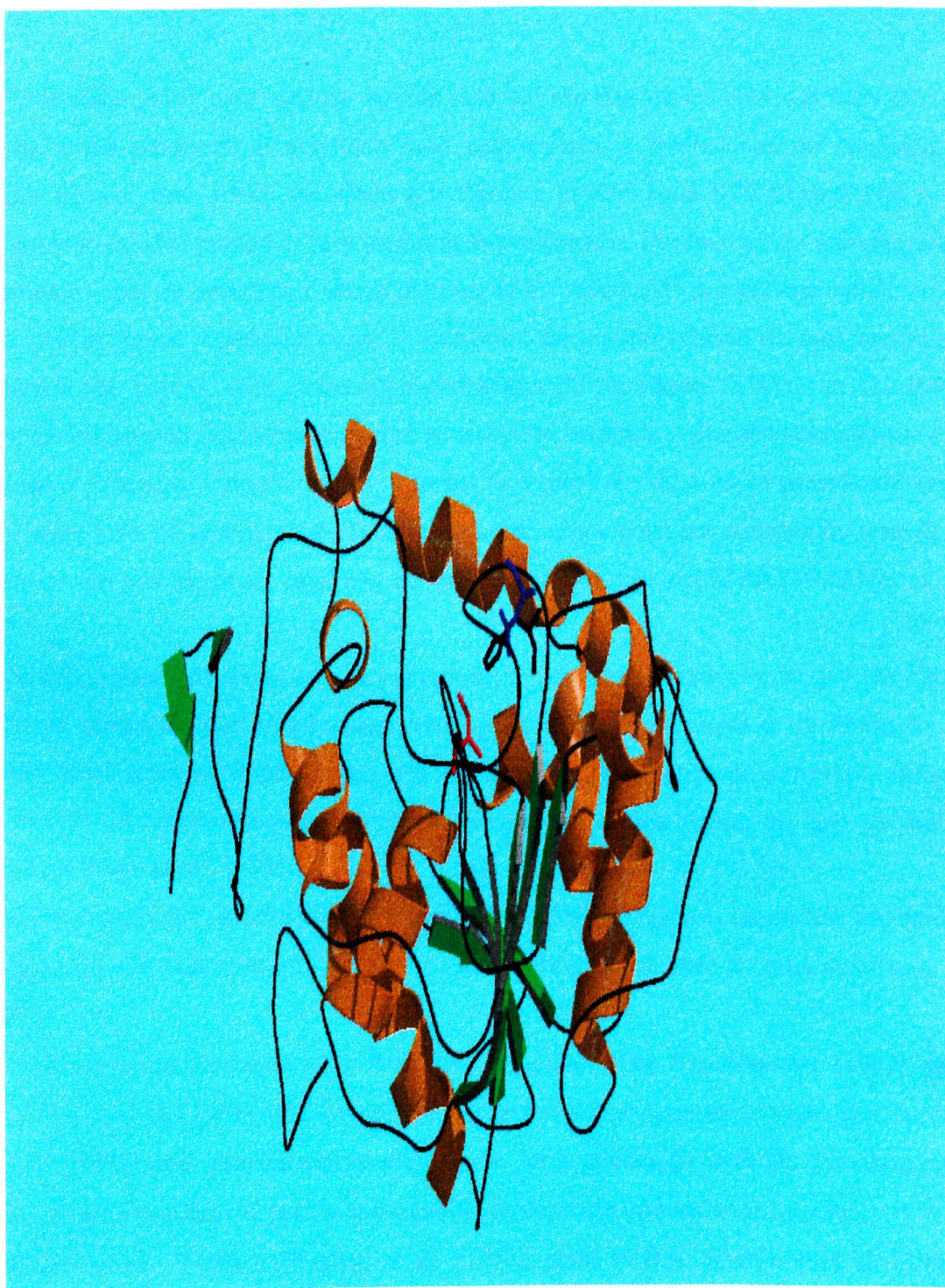


Figura 2.3 – Ilustração de uma lipase obtida da *Candida antarctica*.

Fonte: Kluyver Laboratory for Biotechnology.

2.4 – PERVAPORAÇÃO

O processo onde uma mistura líquida está em contato direto com um lado de uma membrana, e um permeado é removido pelo lado oposto, é frequentemente chamado de permeação líquida. Este termo foi usado por Binning (1906) apud STRATHMANN et al. (1991), em seus estudos pioneiros com membranas poliméricas. Porém, devido à presença das fases líquida e vapor no processo, o termo permeação foi substituído por pervaporação.

A pervaporação é definida como o transporte de líquido através de uma membrana homogênea e não porosa, com evaporação simultânea do permeado (KWON et al., 1995). Portanto, de um lado da membrana encontra-se o líquido, mantido à pressão atmosférica, e no lado oposto o permeado é removido sob a forma de vapor, devido à baixa pressão de vapor existente neste lado do sistema. Esta baixa pressão de vapor pode ser conseguida através da utilização de um gás inerte ou pelo uso de uma bomba de vácuo (STRATHMANN et al., 1991).

Os fenômenos de transporte na pervaporação são mais complexos do que em outros processos de separação por membranas, como diálise, osmose reversa e ultrafiltração. O mecanismo deste processo divide-se em três etapas: adsorção seletiva do permeado, difusão seletiva através da membrana, e dessorção do permeado, na fase vapor, no lado oposto da membrana (KWON et al., 1995).

Kahlenberg (1906) apud STRATHMANN et al. (1991) registrou um estudo qualitativo sobre a separação de uma mistura de álcool e hidrocarbonetos, através de uma membrana de borracha.

A primeira investigação quantitativa foi conduzida por Hagerbaumer (1955) apud STRATHMANN et al. (1991), que utilizou uma membrana microporosa de vidro para separar misturas líquido-líquido, especialmente azeótropos. Uma separação definida foi observada, sugerindo um grande potencial para a aplicação do método em operações industriais.

Heisler et al. (1956) e Binning et al. (1958) apud STRATHMANN et al. (1991), utilizaram uma membrana polimérica não porosa para a separação de uma mistura líquido-líquido. Os estudos de Binning foram mais extensivos, resultando em uma alto grau de separação e em altas taxas de permeação.

OKAMOTO et al. (1993) apud KWON et al. (1995), utilizaram com sucesso a pervaporação para remover a água formada durante a esterificação do ácido oleico com o etanol, utilizando o ácido p-tolueno sulfônico como catalisador. No mesmo ano, VAN der

PADT et al. apud KWON et al. (1995) tornaram-se os primeiros a utilizar a pervaporação em processos enzimáticos. Eles promoveram a remoção da água produzida na síntese de triacilgliceróis por lipase imobilizada. O método foi aplicado somente em meios reacionais livres de solvente, pois foi utilizada uma membrana porosa de acetato de celulose. Em meios reacionais que utilizam solventes, este tipo de membrana poderia permitir a remoção, juntamente com a água, do próprio solvente utilizado.

KWON et al. (1995) utilizaram a pervaporação para remover a água formada durante a esterificação do ácido oleico com o n-butanol, na presença da Lipozyme. Por ocorrer na presença de um solvente, o isoctano, a pervaporação tornou-se possível graças à utilização de uma membrana não porosa de acetato de celulose, permeável somente à água.

2.5 - ANÁLISE QUANTITATIVA DE ÁCIDOS GRAXOS UTILIZANDO UM MÉTODO COLORIMÉTRICO

A quantidade de ácidos graxos em um meio reacional pode ser determinada por titrimetria, colorimetria, cromatografia, métodos isotópicos, enzimáticos e imunológicos (Jensen, 1983 apud KWON; RHEE, 1986).

Segundo JENSEN (1983), os métodos mais práticos são a colorimetria com sabões de cobre e a titrimetria, sendo o primeiro mais eficiente do que o segundo.

A colorimetria relaciona a quantidade de ácidos graxos com a absorbância da amostra. A absorbância é medida depois que os ácidos graxos são convertidos a sabões de cobre por reagentes coloridos. Esta técnica, que originalmente utilizava $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como reagente de cobre e trietanolamina como reagente colorido, foi desenvolvida por Duncombe (1963) apud KWON; RHEE (1986). Mais tarde, vários pesquisadores apresentaram modificações e melhorias, adequando o método aos seus objetivos particulares (Bains et al., 1964; Bowyer et al., 1978; Shipe et al., 1980; Hron, 1981; Sahasrabudhe, 1982; Radding et al., 1983 apud KWON; RHEE, 1986). Lowry; Tinsley (1976) apud KWON; RHEE (1986) desenvolveram um método de determinação de ácidos graxos utilizando acetato cúprico-piridina como reagente colorido. Entretanto, todos esses métodos colorimétricos seguiam as mesmas etapas: (i) extração dos ácidos graxos do meio reacional, utilizando algum solvente; (ii) evaporação do solvente; (iii) adição do reagente colorido; (iv) centrifugação, para separação da fase aquosa; (v) determinação da absorbância da amostra.

KWON; RHEE (1986) apresentaram uma simplificação do método desenvolvido por LOWRY; TINSLEY (1976), utilizando o isoctano como solvente ao invés do benzeno, eliminando assim as etapas de evaporação do solvente e de centrifugação da amostra. Isto foi conseguido pelo fato da solubilidade em água do isoctano ser muito menor do que a do benzeno.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 - REAGENTES

- Lipozyme IM (lipase obtida do *Mucor miehei*, imobilizada em resina fenólica).
- Novozym 435 (lipase obtida da *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica).
- Ácido oleico
- n-butanol
- Isoctano
- Acetato cúprico
- Piridina
- Acetato de celulose
- Acetona

As enzimas foram gentilmente doadas pela NOVO NORDISK.

Os reagentes químicos utilizados possuem grau de pureza analítico.

3.1.2 – EQUIPAMENTOS:

- Reator de pervaporação
- Banho termostático
- Bomba de vácuo

3.2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 - PREPARAÇÃO DAS ENZIMAS

Antes da sua utilização, a Lipozyme IM necessitava de uma preparação para tornar-se ativa. Essa preparação consistia em manter a enzima em agitação lenta por 30 minutos, dentro de um recipiente fechado contendo água deionizada. A quantidade de água era suficiente para manter toda a enzima submersa.

Em seguida, o recipiente era mantido à baixas temperaturas (entre 5° C e 10° C) por no mínimo 8 horas. Por fim, separava-se a enzima da água utilizando-se um papel-filtro.

Este processo permitia que a Lipozyme assumisse a sua conformação ativa, tornando-se adequada para catalisar reações de esterificação e de interesterificação.

A Novozym 435 não requer nenhuma preparação antes de ser utilizada em reações de esterificação.

3.2.2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Segundo normas do fabricante, a determinação da atividade da Lipozyme deve ser feita através da interesterificação do óleo de girassol puro com o ácido decanóico, a 70°C, durante 60 minutos. A taxa da reação é determinada medindo-se a quantidade de ácido decanóico incorporado às posições 1 e 3 dos triglicerídeos do óleo de girassol.

A atividade é então expressa em BAUN (Batch Acidolysis Units Novo) por grama de enzima. Uma unidade BAUN corresponde a 1 μ mol de ácido decanoico incorporado, por minuto, aos triglicerídeos do óleo de girassol (NOVO NORDISK, 1992).

A determinação da atividade da Novozym 435 deve ser feita através da esterificação do ácido láurico com o 1-propanol, a 60°C, durante 15 minutos. A taxa da reação é determinada medindo-se a quantidade de laurato de propila formado.

A atividade é então expressa em PLU (Propyl Laurate Units) por grama de enzima. Uma unidade PLU corresponde a 1 μ mol de laurato de propila formado por minuto (NOVO NORDISK, 1992).

Neste trabalho, as enzimas foram recebidas da NOVO NORDISK com atividades declaradas de 7 BAUN/g para a Lipozyme e 7000 PLU/g para a Novozym 435. Os testes de

atividade não foram executados segundo as normas da NOVO NORDISK (1992), devido à falta de maiores informações por parte do fabricante. Era necessário conhecer, por exemplo, detalhes sobre a proporção entre os reagentes, a rotação do agitador, a composição do óleo de girassol (no caso da Lipozyme), e o método de remoção da água formada durante a reação (no caso da Novozym 435). Portanto, o teste de atividade das enzimas foi realizado da seguinte forma: quando do recebimento das enzimas, realizou-se a esterificação do ácido oleico com o n-butanol. O meio reacional consistia de 0,20 mol de ácido oleico e 0,20 mol de n-butanol.

Na reação catalisada pela Lipozyme, empregou-se 2,82 g de enzima ou 5% (m/m) da quantidade de ácido oleico utilizado. Na reação catalisada pela Novozym 435, empregou-se 5,64 g de enzima ou 10% (m/m) da quantidade de ácido oleico utilizado.

As reações foram conduzidas a 30°C e 300 rpm, durante 6 horas. Os resultados obtidos foram idênticos aos exibidos pelas Figuras 4.1 e 4.6.

Esses testes foram repetidos mensalmente durante 8 meses, que foi o período de realização dos diversos experimentos contidos neste trabalho. Os resultados para cada enzima foram sempre os mesmos. Logo, a atividade das enzimas durante o período de realização dos ensaios manteve-se constante.

É importante ressaltar que os testes aqui realizados não buscavam quantificar a atividade das enzimas, e sim garantir que todos os experimentos foram realizados com as enzimas à mesma atividade.

3.2.3 – SÍNTESE DO OLEATO DE N-BUTILA

A síntese do oleato de n-butila através da esterificação direta é um processo reversível. Ácido oleico e n-butanol reagem formando oleato de n-butila e água.

Quando escolhe-se realizar a produção de um éster pela esterificação direta, geralmente adota-se um método de remoção da água formada no meio, com a finalidade de deslocar o equilíbrio da reação. Neste trabalho, a água foi removida por um processo de pervaporação.

A esterificação do ácido oleico com o n-butanol foi realizada em um reator de pervaporação, mantido parcialmente imerso em um banho termostático. Este reator é composto de dois compartimentos, como mostra a Figura 3.1. Na parte superior foi

introduzido o meio reacional. Entre os compartimentos fixou-se uma membrana não porosa de acetato de celulose, para permitir a remoção seletiva da água formada durante a reação. A membrana era disposta sobre um papel-filtro, e ambos eram suportados por um disco de aço inox sinterizado. As membranas utilizadas eram produzidas conforme descrito no item 3.2.3. A força motriz necessária para a remoção da água era garantida por uma bomba de vácuo, conectada ao compartimento inferior do reator.

As sínteses do oleato de butila foram realizadas em diferentes condições, com variações na temperatura, nas quantidades de enzima e nas proporções entre os reagentes. Entretanto, algumas condições foram utilizadas em todos os experimentos: (i) os reagentes foram vigorosamente misturados no reator, por 10 segundos, antes da introdução da enzima; (ii) as reações foram conduzidas a 300 rpm; (iii) o vácuo aplicado ao compartimento inferior do reator foi mantido em 680 mmHg.

Os experimentos são discutidos com detalhes nos itens 4.1 e 4.2.

As conversões foram determinadas medindo-se as concentrações do ácido oleico no meio reacional através do método do acetato cúprico, conforme descrito no item 3.2.4.

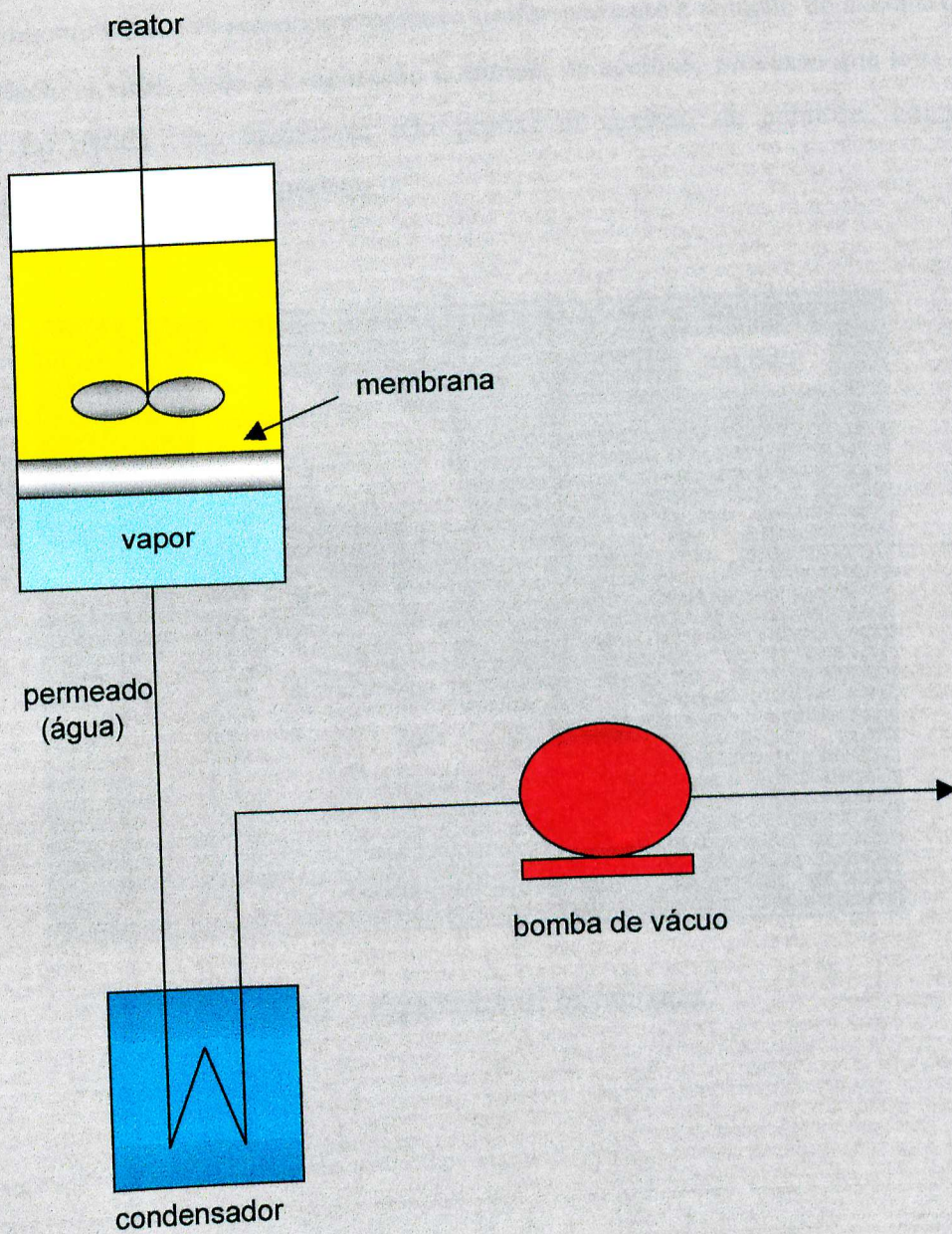


Figura 3.1 – Diagrama da montagem experimental

3.2.4 - PRODUÇÃO DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE:

Para a fabricação da membrana, uma mistura contendo 25% de acetato de celulose e 75% de acetona (v/v) foi mantida em agitação lenta, por um agitador magnético, durante 24 horas. A solução obtida foi uniformemente distribuída sobre uma placa de vidro, utilizando-se um espalhador (Figura 3.2). Neste equipamento, a rosca sem fim movimentava horizontalmente a base. O raspador espalhava uniformemente a solução de acetato de celulose sobre a placa de vidro. Após a evaporação completa da acetona, processo que leva cerca de 3 minutos, foi obtida uma membrana não porosa de acetato de celulose, completamente transparente, com 20 μm de espessura.

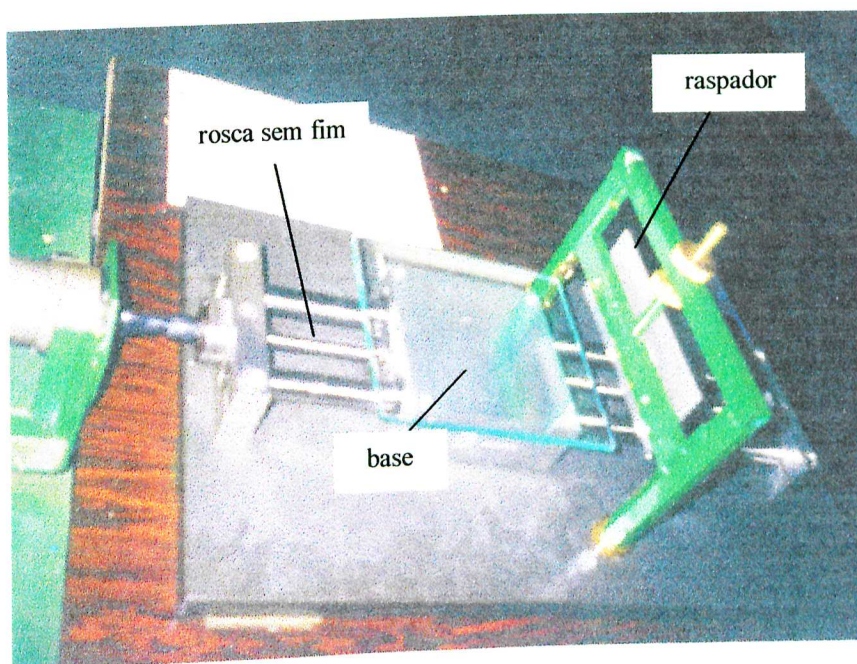


Figura 3.2 – Espalhador de membranas.

3.2.5 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OLEICO NO MEIO REACIONAL PELO MÉTODO DO ACETATO CÚPRICO:

3.2.5.1 – PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ACETATO CÚPRICO-PIRIDINA:

Foi preparada uma solução 5% (m/v) de acetato cúprico. A solução foi filtrada, utilizando-se um papel-filtro. O pH foi ajustado para o valor 6,1 adicionando-se piridina, gota a gota.

3.2.5.2 – CURVA PADRÃO DO ÁCIDO OLEICO:

Amostras contendo de 2,0 a 120 μmol de ácido oleico foram diluídas em 5 mL de isoctano. Adicionou-se 1 mL da solução de acetato cúprico-piridina. A mistura foi vigorosamente agitada 60 segundos, e então deixada em repouso por 30 segundos até a fase aquosa separar-se completamente da solução de isoctano e ácido oleico.

A curva padrão da concentração de ácido oleico versus absorvância (Figura 3.3), foi determinada medindo-se a absorvância da solução de isoctano e ácido oleico, a 715 nm. O sobrenadante de uma mistura de 5 mL de isoctano e 1 mL de acetato cúprico-piridina, sem a presença do ácido oleico, foi utilizado como prova em branco.

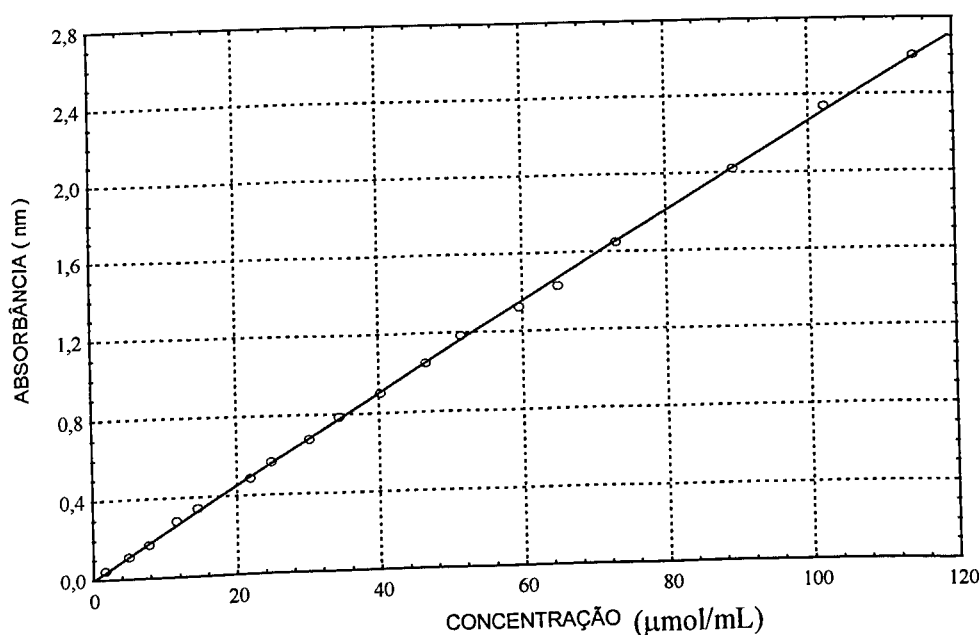


Figura 3.3 – Absorvância das soluções-padrão de ácido oleico e isoctano, em função da concentração de ácido oleico.

Através de uma regressão linear, obtém-se para a curva acima a seguinte equação:

$$A = 0,22670 * C - 0,002272 \quad (3.1)$$

com $R = 0,99978437$ e $R^2 = 0,99956879$, onde A é a absorbância a 715 nm, e C é a concentração de ácido oleico da solução, em $\mu\text{mol/mL}$.

3.2.5.3 – DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO:

Em intervalos de tempo de uma hora, contados a partir do início da reação, amostras contendo 0,5 mL foram retiradas do meio reacional e centrifugadas, para a separação da enzima. Então 50 μL da amostra centrifugada foram diluídos em 5 mL de isoctano, adicionando-se em seguida 1 mL da solução de acetato cúprico-piridina. A mistura foi vigorosamente agitada por 60 segundos, e deixada em repouso por 30 segundos até a fase aquosa separar-se completamente da solução de isoctano e ácido oleico. Em seguida, foi efetuada a leitura da absorbância dessa solução, a 715 nm.

Para se obter a concentração de ácido oleico de uma dada amostra, a partir da leitura da sua absorbância, faz-se um pequeno rearranjo na equação 3.1, obtendo-se:

$$C = \frac{A}{0,22670} + 0,01002 \quad (3.2)$$

A conversão da reação pode ser definida em relação ao ácido oleico como:

$$X(\%) = \frac{N_0 - N}{N_0} * 100 \quad (3.3)$$

Onde:

X = conversão da reação em um dado instante.

N_0 = número de moles do ácido oleico no instante $t=0$.

N = número de moles do ácido oleico em um dado instante.

A equação 3.3 pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$X(\%) = \frac{C_0V_0 - CV}{C_0V_0} \quad (3.4)$$

Ou

$$X(\%) = 1 - \frac{CV}{C_0V_0} \quad (3.5)$$

C_0 = concentração do ácido oleico no instante $t=0$.

C = concentração do ácido oleico em um dado instante.

Considerando desprezível a variação do volume do meio durante o processo, pode-se escrever

$$X(\%) = 1 - \frac{C}{C_0} \quad (3.6)$$

Combinando-se as equações (3.2) e (3.6), chega-se a :

$$X(\%) = 1 - \frac{(A/0,22670 + 0,01002)}{(A_0/0,22670 + 0,01002)} \quad (3.7)$$

Onde A_0 representa a absorbância da amostra retirada do meio no instante $t=0$.

A equação (3.7) foi utilizada para a determinação das conversões em função do tempo, partindo das absorbâncias das amostras retiradas do meio no instante $t=0$ e em um instante t qualquer.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - SÍNTESES DO OLEATO DE N-BUTILA UTILIZANDO A LIPOZYME COMO CATALISADOR

4.1.1 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para muitas reações não-enzimáticas, a taxa da reação aumenta continuamente com o incremento da temperatura. No caso das reações enzimáticas, existe uma temperatura ótima para a qual a produtividade da reação é máxima. Acima desta temperatura, a formação de produtos decresce devido à inativação térmica da enzima. A temperatura ótima de uma reação enzimática é resultado dos efeitos opostos do incremento da temperatura sobre a taxa da reação e sobre a taxa da inativação térmica da enzima (PARKIN, 1993).

Para se analisar a variação da atividade da Lipozyme em função da temperatura, foram conduzidos experimentos a 30, 40, 50 e 60° C. O meio reacional consistia de 0,30 mol de ácido oleico, 0,30 mol de n-butanol e 2,82 g de enzima. A quantidade de enzima corresponde a 5% (m/m) do ácido oleico utilizado. A dosagem recomendada pela NOVO NORDISK (1992) é de 5% a 10% do substrato utilizado.

Como pode ser visto na Figura 4.1, à medida em que os experimentos eram realizados em maiores temperaturas, a conversão diminuía. Após 6 horas de reação, a maior conversão foi de 73%, obtida a 30° C. Nas demais temperaturas, 40°C, 50°C e 60°C, obteve-se, respectivamente, 62%, 41% e 12% de conversão. Provavelmente, em temperaturas superiores a 30°C, o efeito do incremento da temperatura sobre a taxa de inativação superou o efeito sobre a taxa da reação, levando a enzima à inativação.

Resultados semelhantes foram obtidos por OMAR et al. (1989), no estudo da produção de monoacilgliceróis a partir do glicerol acetona, utilizando a Lipozyme. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 30°C a 50°C. Foi verificado que a temperatura ótima da reação era 30°C.

RANTAKYLA (1994), promovendo a esterificação enantioselectiva do ibuprofeno através da utilização da Lipozyme, verificou que a temperatura ótima do processo era de 45°C. Os experimentos foram realizados no intervalo de 40°C a 60°C.

De acordo com a NOVO NORDISK (1992), “A Lipozyme pode ser utilizada em temperaturas entre 30°C e 70°C. Entretanto, antes de se escolher a temperatura da reação, deve-se considerar a reatividade e a viscosidade dos reagentes, a possibilidade de formação de

sub-produtos térmicos e a necessidade de solventes. Geralmente, quanto menor a temperatura, maior a produtividade das enzimas”.

Por ter sido a temperatura na qual a enzima apresentou maior atividade, os experimentos seguintes foram realizados a 30°C.

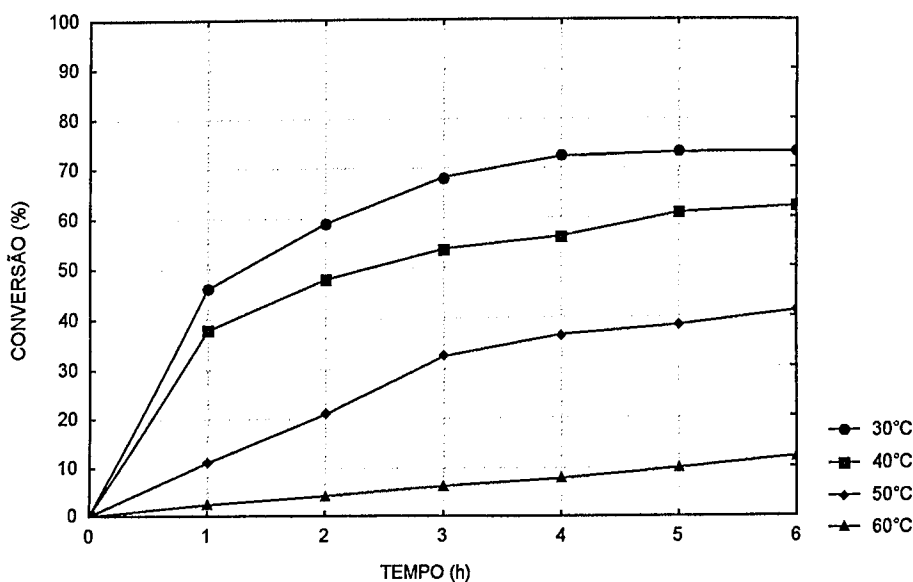


Figura 4.1 – Influência da temperatura sobre a atividade da Lipozyme.

4.1.2 – INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE ENZIMA SOBRE A FORMAÇÃO DE PRODUTOS

Para verificar a influência da quantidade de enzima presente no meio sobre a conversão, foram conduzidos dois experimentos. O meio reacional era formado por 0,30 mol de ácido oleico, 0,30 mol de n-butanol e: (i) 1,41 g de enzima ou 2,5% (m/m) do total de ácido oleico; (ii) 5,64 g de enzima ou 10% (m/m) do total de ácido oleico. Os resultados são comparados com o obtido no experimento anterior, onde foi utilizado 5% de enzima, que é o mínimo recomendado pelo fabricante. Como mostra a Figura 4.2, utilizando-se 2,5% de enzima, uma quantidade inferior ao mínimo recomendado, a conversão diminuiu drasticamente. Entretanto, utilizando-se 10% de enzima, que é a quantidade máxima

recomendada, a conversão foi praticamente a mesma daquela obtida com 5% de enzima. Após 6 horas de reação, as conversões foram de 44%, 73% e 75%, para quantidades de enzima correspondentes a 2,5%, 5% e 10% do total de ácido oleico, respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por ERGAN (1991), que realizou a esterificação do ácido oleico com o glicerol utilizando a Lipozyme. Foi observado que, empregando-se dosagens de enzima iguais a 5% ou 10% (m/m) do ácido oleico, os resultados foram praticamente os mesmos.

Como não houve um acréscimo significativo na conversão quando elevou-se a quantidade de enzima de 5% para 10%, empregou-se, nos demais experimentos, uma quantidade de enzima igual a 5% (m/m) do total de ácido oleico.

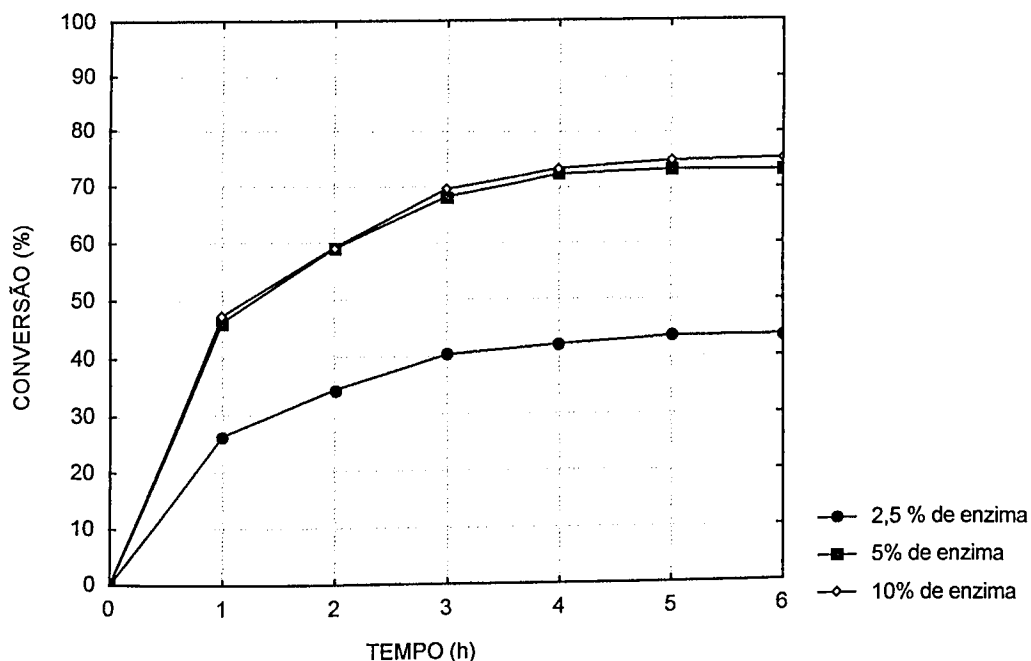


Figura 4.2 – Influência da quantidade de enzima aplicada ao meio reacional sobre a conversão.

4.1.3 – EFEITO DA PRESENÇA DE UM SOLVENTE SOBRE A VELOCIDADE DA REAÇÃO

Por tratar-se de uma catálise heterogênea, a reação em estudo é constituída basicamente por duas etapas: a transferência de massa, que inclui as etapas de adsorção dos reagentes e de dessorção dos produtos; e a reação enzimática nos sítios ativos do catalisador.

Buscando um incremento na velocidade da reação através de um aumento na transferência de massa, foi conduzido um experimento com a utilização do isoctano como solvente. Por ser inerte para a enzima e para reagentes e produtos, a função do isoctano era apenas diminuir a viscosidade do meio, aumentando assim a transferência de massa e conseqüentemente a velocidade da reação. O meio reacional consistia de 70 mmol de ácido oleico, 70 mmol de n-butanol e 0,987 g de enzima, em 120 ml de isoctano. Este volume de isoctano corresponde a quatro vezes a soma dos volumes do ácido oleico e do n-butanol (KWON et al., 1995; MUSTRANTA et al., 1993). O resultado é exibido pela Figura 4.3. Após 3 horas de reação, obteve-se uma conversão de 92%. No experimento realizado nas mesmas condições porém sem a presença do solvente (Figura 4.1), a conversão neste mesmo intervalo de tempo foi de apenas 68%.

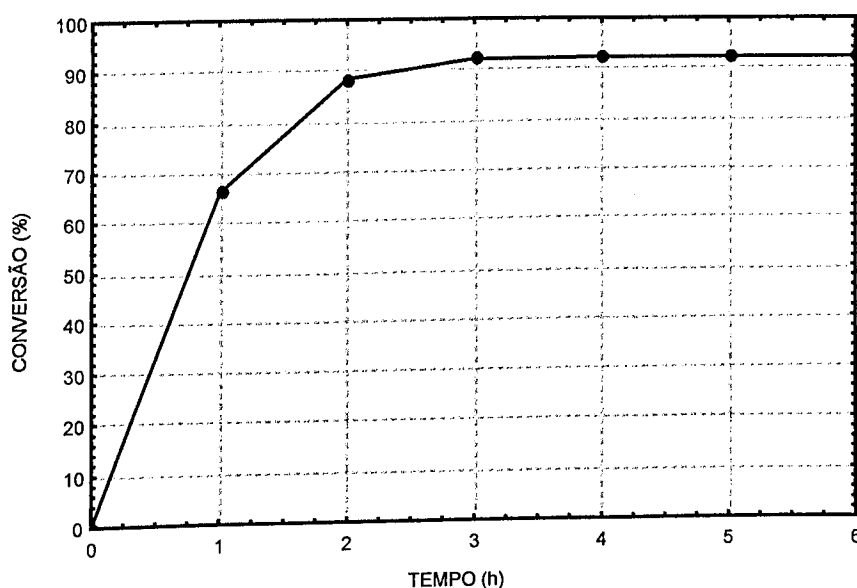


Figura 4.3 – Síntese do oleato de n-butila utilizando o isoctano como solvente.

Comparando os resultados exibidos pelas Figuras 4.2 e 4.3, observa-se que na síntese do oleato de n-butila catalisada pela Lipozyme, a velocidade da reação aumentou sensivelmente com a diminuição da viscosidade do meio, e praticamente não se alterou com o incremento na dosagem de enzima.

4.1.4 – EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE EXCESSO DE REAGENTES SOBRE A FORMAÇÃO DE PRODUTOS

Realizou-se um experimento para verificar se haveria um incremento na conversão empregando-se n-butanol em excesso. Ácido oleico e butanol foram utilizados na proporção 1:5 molar, respectivamente. A proporção estequiométrica é de 1:1 molar. O meio reacional consistia de 50 mmol de ácido oleico, 0,25 mol de butanol e 0,705 g de enzima.

Pelo princípio do deslocamento do equilíbrio, o aumento da concentração dos reagentes pode levar a um aumento na concentração dos produtos. Entretanto, o excesso de reagentes pode levar à inibição da enzima (CHALALAKSANANUKUL, 1992; CLAON; AKOH, 1993). Como mostra a Figura 4.4, o excesso de n-butanol provocou um aumento na conversão, se comparado com o experimento realizado com os reagentes em proporções estequiométricas (Figura 4.1). Portanto, pode-se concluir que a Lipozyme não sofre inibição pelo n-butanol.

Após 5 horas de reação, a conversão foi de 89%. Utilizando-se o isoctano, este valor foi alcançado em apenas 2 horas (Figura 4.3). Isto indica que o excesso de n-butanol pode não ter deslocado o equilíbrio da reação, e sim ter servido apenas para diminuir a viscosidade do meio, aumentando assim a velocidade da reação através de um aumento na transferência de massa.

Com o intuito de elucidar esta questão, foi realizado um experimento com excesso de n-butanol na presença do isoctano. O meio reacional era formado por 20 mmol de ácido oleico, 0,1 mol de n-butanol e 0,38 g de enzima, em 72 ml de isoctano. O ácido e o álcool foram empregados na proporção 1:5 molar, respectivamente. O volume de isoctano corresponde a quatro vezes a soma dos volumes do ácido oleico e do n-butanol.

Como mostra a Figura 4.5, o resultado foi praticamente idêntico ao obtido utilizando-se somente o isoctano. Isto mostra que o excesso de n-butanol, empregado no experimento

anterior, serviu apenas para diminuir a viscosidade do meio, e não para deslocar o equilíbrio da reação.

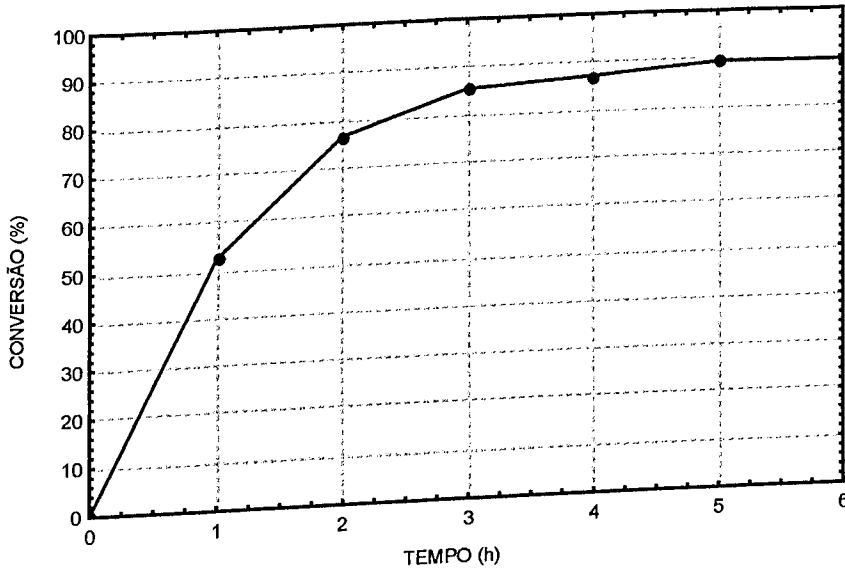


Figura 4.4 – Síntese do oleato de n-butila utilizando excesso de n-butanol.

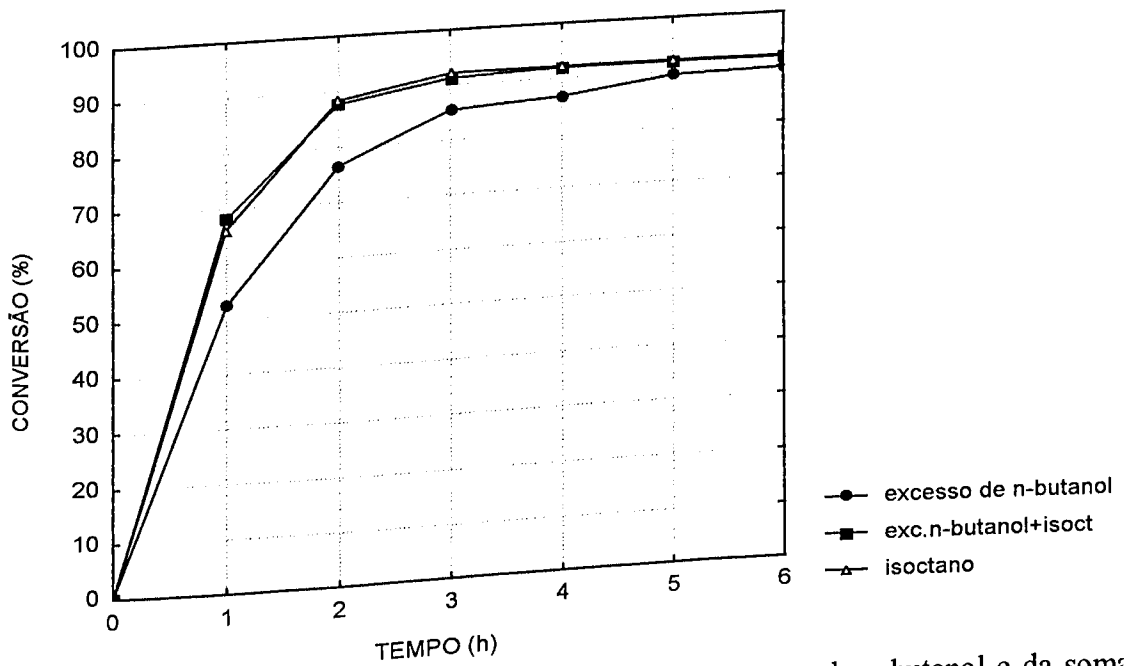


Figura 4.5 – Comparação entre os efeitos do isoctano, do excesso de n-butanol e da soma destes sobre a conversão de equilíbrio.

4.2 – SÍNTESES DO OLEATO DE N-BUTILA UTILIZANDO A NOVOZYM 435 COMO CATALISADOR

4.2.1 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A esterificação do ácido oleico com o n-butanol, catalisada pela Novozym 435, foi realizada em condições idênticas às utilizadas na síntese do oleato de n-butila catalisada pela Lipozyme.

Para se verificar a influência da temperatura sobre a atividade da enzima, foram conduzidos experimentos a 30, 40, 50, 60 e 70°C. O meio reacional consistia de 0,30 mol de ácido oleico, 0,30 mol de n-butanol e 2,82 g de enzima.

A Novozym 435, embora apresente uma atividade máxima a 70°C, geralmente é inativada em temperaturas superiores a 60°C. Para uma produtividade máxima, recomenda-se a sua utilização em temperaturas entre 40°C e 60°C (NOVO NORDISK, 1992).

Como pode ser visto na Figura 4.6, os resultados obtidos no intervalo entre 30°C e 60°C foram praticamente idênticos. Após 2 horas de reação, as conversões foram de aproximadamente 88%. Na temperatura de 70°C, a atividade enzimática diminuiu sensivelmente. Após três horas de reação, obteve-se uma conversão de 65%.

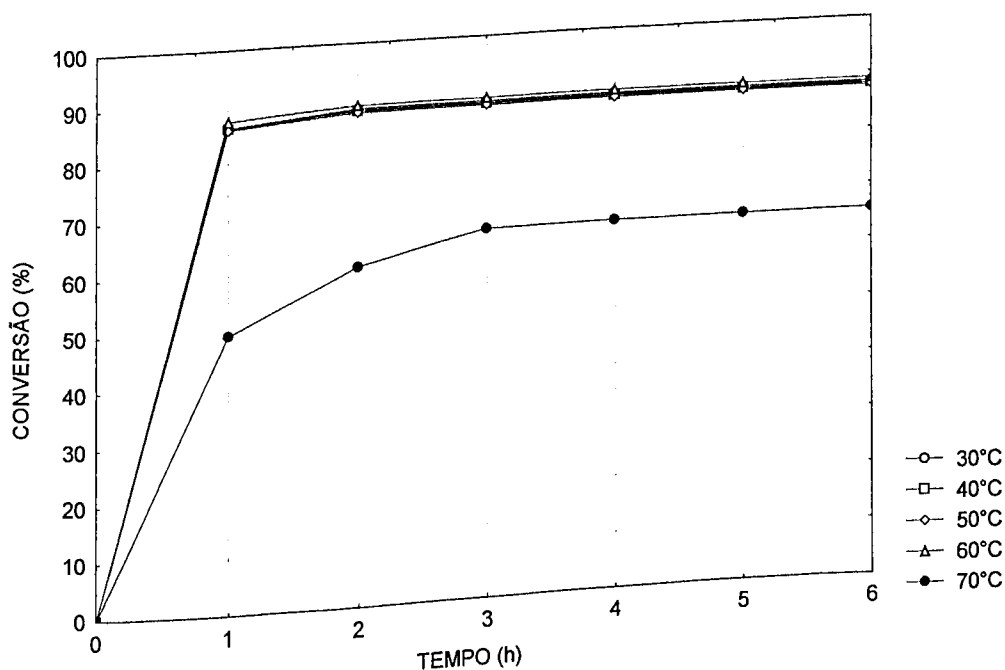


Figura 4.6 – Influência da temperatura sobre a atividade da Novozym 435.

Estes resultados confirmam as recomendações da NOVO NORDISK (1992), porém não permitem concluir sobre qual seria a temperatura ótima desta reação.

A linearidade da curva durante a primeira hora de reação confirma os resultados obtidos por HANSEN (1995), que estudou a esterificação do ácido mirístico com o n-propanol, catalisada pela Novozym 435

Como a enzima apresentou a mesma atividade no intervalo de 30°C a 60°C, optou-se por conduzir os experimentos seguintes a 30°C.

4.2.2 – INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE ENZIMA SOBRE A FORMAÇÃO DE PRODUTOS

Para verificar a influência da quantidade de enzima presente no meio sobre a conversão, foram conduzidos três experimentos. O meio reacional era formado por 0,30 mol de ácido oleico, 0,30 mol de n-butanol e: (i) 1,41 g de enzima ou 2,5% (m/m) do total de ácido oleico; (ii) 5,64 g de enzima ou 10% (m/m) do total de ácido oleico; (iii) 7,05 g de enzima ou 12,5% (m/m) do total de ácido oleico. Os resultados são comparados com o obtido no experimento anterior, onde foi utilizado 5% de enzima, que é o mínimo recomendado pelo fabricante.

Como mostra a Figura 4.7, a conversão aumentou à medida em que se aumentava a quantidade de enzima, até o limite de 10 % do total de ácido oleico. Utilizando-se 2,5 % de enzima, obteve-se 80% de conversão após 4 horas de reação; com 5 % de enzima obteve-se 88 % de conversão após 2 horas; com 10 % e 12,5 % de enzima obteve-se 96 % de conversão em apenas uma hora de reação.

Ao contrário do ocorrido com a Lipozyme, a quantidade de enzima aplicada ao meio exerceu uma forte influência sobre a produtividade da reação.

Como não ocorreu acréscimo na conversão quando se aumentou a quantidade de enzima de 10% para 12,5%, os experimentos seguintes foram conduzidos com uma dosagem de enzima de 10% (m/m) do total de ácido oleico.

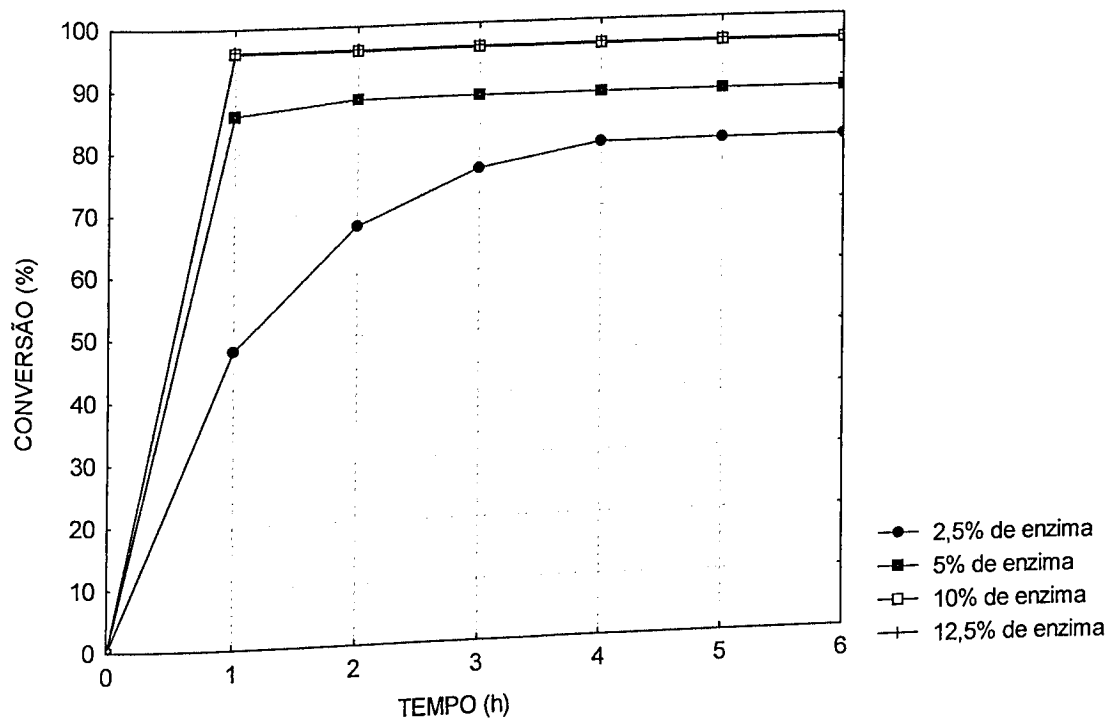


Figura 4.7 – Influência da quantidade de enzima aplicada ao meio reacional sobre a conversão.

4.2.3 – EFEITO DA PRESENÇA DE UM SOLVENTE SOBRE A VELOCIDADE DA REAÇÃO

Como no experimento realizado anteriormente com a Lipozyme, tentou-se aumentar a velocidade da reação através de um aumento na transferência de massa. Para tal foi conduzida uma reação com a presença do isoctano. O meio reacional consistia de 70 mmol de ácido oleico, 70 mmol de n-butanol e 1,974 g de enzima, em 120 mL de isoctano. O resultado é exibido pela Figura 4.8. Após uma hora de reação, obteve-se 96% de conversão. Analisando-se os resultados exibidos pelas Figuras 4.7 e 4.8, observa-se que na síntese do oleato de n-butila catalisada pela Novozym 435 a conversão variou diretamente com a quantidade de enzima presente no meio, e a velocidade da reação não se alterou com a introdução de um solvente.

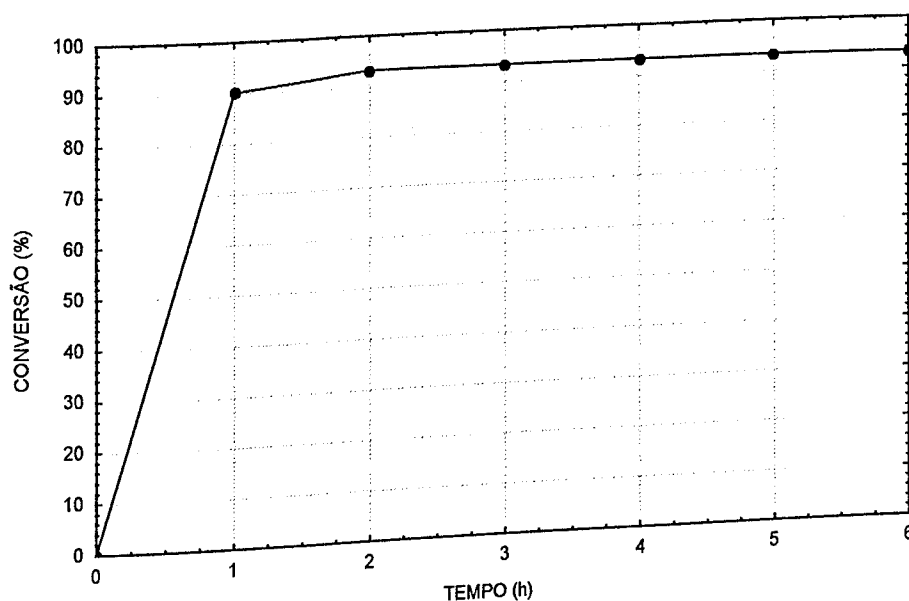


Figura 4.8 – Síntese do oleato de n-butila utilizando o isoctano como solvente.

4.2.4 – EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE EXCESSO DE REAGENTES SOBRE A FORMAÇÃO DE PRODUTOS

Um outro experimento foi realizado para verificar se haveria um incremento na conversão empregando-se n-butanol em excesso. Ácido oleico e butanol foram utilizados na proporção 1:5 molar, respectivamente. A proporção estequiométrica é de 1:1 molar. O meio reacional consistia de 50 mmol de ácido oleico, 0,25 mol de n-butanol e 1,410 g de enzima. Após uma hora de reação, obteve-se 96% de conversão (Figura 4.9).

Analisando os resultados exibidos pelas Figuras 4.7 e 4.9, conclui-se que o excesso de n-butanol não teve influência alguma sobre a conversão. Tal como a Lipozyme, a Novozym 435 não é inibida pelo n-butanol.

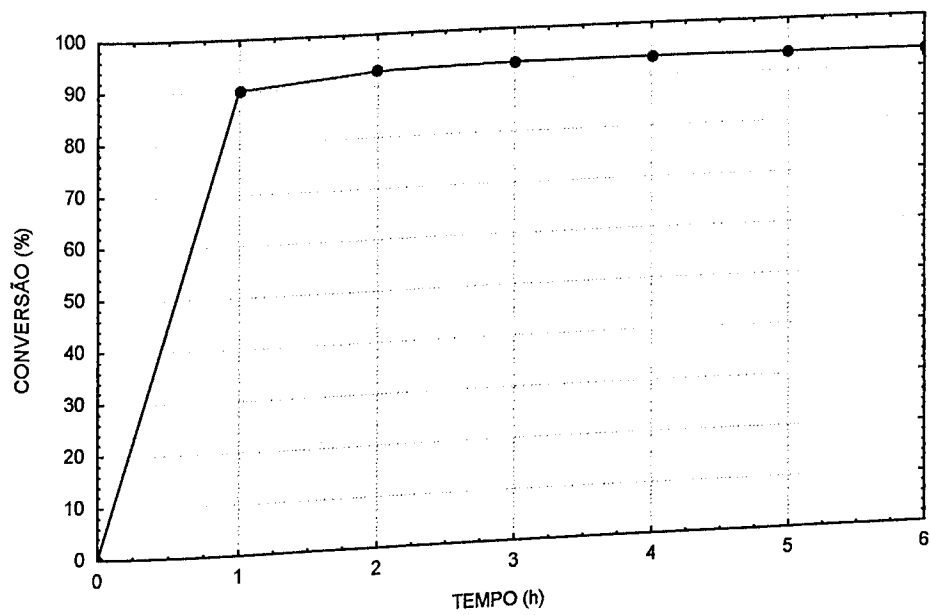


Figura 4.9 – Síntese do oleato de n-butila utilizando excesso de n-butanol.

5 – CONCLUSÕES:

- A síntese de monoésteres pela rota química leva a conversões entre 95% e 100%. A utilização da Lipozyme e da Novozym 435 na síntese do oleato de butila levou a conversões superiores a 90%, o que torna a esterificação enzimática tecnicamente competitiva.
- As altas conversões obtidas a 30°C mostram que a esterificação enzimática proporciona uma grande economia de energia. A síntese de monoésteres pela rota química utiliza temperaturas entre 70°C e 100°C.
- Entre 30°C e 60°C, a atividade da Lipozyme variou inversamente com a temperatura. A produtividade da reação foi máxima a 30°C, diminuindo continuamente à medida em que se aumentava a temperatura.
- A síntese do oleato de n-butila catalisada pela Lipozyme foi fortemente influenciada pela viscosidade. Diminuindo a viscosidade do meio através da utilização de um solvente, a velocidade da reação aumentou sensivelmente.
- Utilizando-se a Lipozyme, variações na dosagem de enzima, dentro dos limites de aplicação recomendados pelo fabricante (5-10%), não alteraram a produtividade da reação.
- O uso da Novozym 435 levou a maiores formações de produtos, em menores períodos de tempo.
- No intervalo entre 30°C e 60°C, a atividade da Novozym 435 não se alterou perante variações na temperatura. Acima de 60°C, a atividade diminuiu sensivelmente.
- Na síntese do oleato de n-butila catalisada pela Novozym 435, a conversão de equilíbrio mostrou ser diretamente proporcional à quantidade de enzima presente no meio, até o limite de 10% (m/m) do total de ácido oleico, mantendo-se constante para dosagens acima deste valor.

- Utilizando-se a Novozym 435, a conversão de equilíbrio praticamente não foi afetada pela variação na proporção entre os reagentes.
- A Lipozyme e a Novozym 435 não são inibidas pelo n-butanol.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALLINGER, N. L. et al. Química Orgânica. 2ª ed. Editora Guanabara Dois, 1988.
- AKOH, C. C. Lipase-catalyzed synthesis of partial glyceride. *Biotechnology Letters*, v. 15, n. 9, p 949-954, 1993.
- CASTRO, H. F., OLIVEIRA, P. C., PEREIRA, E. B. Evaluation of different approaches for lipase catalysed synthesis of citronellyl acetate. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 3, p 229-232, 1997.
- CLAON, P. A. & AKOH, C. C. Enzymatic synthesis of geraniol and citronellol esters by direct esterification in n-hexane. *Biotechnology Letters*, v. 15, n. 12, p 1211-1216, 1993.
- CÓRDOVA, A., HULT, K., IVERSEN, T. Esterification of methyl glycoside mixtures by lipase catalysis. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 1, p 15-18, 1997.
- CUNHA, R. N. & ARAÚJO, E. H. Crescimento da *Cândida rugosa*, atividade enzimática e hidrólise enzimática com lipases específicas e não específicas. Uberlândia, UFU, 1992. 82p.
- DUAN, G., CHING, C. B., LIM, E., ANG, C. H. Kinetic study of enantioselective esterification of Ketoprofen with n-propanol catalysed by a lipase in a organic medium. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 11, p 1051-1055, 1997.
- DUCRET, A., PINA, M., MONTET, D., GRAILLE, J. Biocatalysed deacidification reaction optimization on a model hyperacid oil. *Biotechnology Letters*, v. 14, n. 3, p 185-188, 1992.

- ERGAN, F., TRANI, M., ANDRÉ, G. Solvent free triglyceride synthesis using Lipozyme IM-20. *Biotechnology Letters*, v. 10, n. 9, p 629-634, 1988.
- ERGAN, F & TRANI, M., Effect of lipase specificity on triglyceride synthesis. *Biotechnology Letters*, v. 13, n. 1, p 19-24, 1991.
- FROM, M., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B. Lipase catalyzed esterification of latic acid. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 4, p 315-317, 1997.
- GUYOT, B., BOSQUETTE, B., PINA, M., GRAILLE, J. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 6, p 529-532, 1997.
- HANSEN, H.P. A new positional non-specific lipase for fat modification and ester synthesis. *Proc. World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils industry*, 1995.
- JANSEN, G. G. & HAAS, M. J. Lipase-catalyzed synthesis of oleic acid esters of polyethylene glycol 400. *Biotechnology Letters*, v. 16, n. 2, p 163-168, 1994.
- KARRA-CHAABOUNI, M., PULVIN, S., TOURAUD, D., THOMAS, D. Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. *Biotechnology Letters*, v. 18, n. 9, p 1083-1088.
- KLIBANOV, A. M. Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech*, v. 16, p 354-359.
- KWON, D. Y. & RHEE, J. S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *JAOCs*, v. 63, n. 1, p 89-92, 1986.
- KWON, S. J., SONG, K. M., HONG, W. H., RHEE, J. S. Removal of water produced from lipase-catalyzed esterification in organic solvent by pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 46, p 393-395, 1995.

- LANGRAND, G., TRIANTAPHYLIDES, C., BARATTI, J. Lipase catalyzed formation of flavour esters. *Biotechnology Letters*, v. 10, n. 8, p 549-554, 1988.
- LEHNINGER, A. L. *Bioquímica*. 2^a ed. Editora Edgard Blücher Ltda. 1995, v.1.
- MALCATA, F. X., REYES, R. H., GARCIA, H. S., HILL, C. G., AMUNDSON, C. H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - A review journal of *American Oil Chemical Society*, v. 67, n. 12, p 890-910.
- MARTY, A., CHULALAKSANANUKUL, W., CONDORET, J. S., WILLEMOT, R. M., DURAND, G. Comparison of lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane. *Biotechnology Letters*, v. 12, n. 1, p 11-16, 1990.
- MAUGARD, T., REMAUD-SIMEON, M., PETRE, D., MONSAN, P. Lipase-catalysed production of N-oleyl-taurine sodium salt in non-aqueous medium. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 8, p 751-753.
- MORRISON, R. & BOYD, R. *Química Orgânica*. 7^a ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1973.
- MUKESH, D., SHETH, D., MOKASHI, A., WAGH, J., TILAK, J. M., BANERJI, A. A., THAKKKAR, K. R. Lipase catalysed esterification of isosorbide and sorbitol. *Biotechnology Letters*, v. 15, n. 12, p 1243-1246, 1993.
- MUSTRANTA, A., FORSSEL, P., POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme Microbial Technology*, v. 15, n. 2, p 133-139, 1993.
- NAGODAWITHANA, T. & REED, G. *Enzymes in Food Processing*. 3 ed. London, Academic Press, 1993.
- NOVO NORDISK, Boletim técnico B 665 a-Gb 200 Denmark, 1992.

- OGUNTOMEIN, B. G., ERDMANN, H., SCHMID, R. D. Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotechnology Letters*, v. 15, n. 2, p 175-180, 1993.
- OMAR, I. C., SAEKI, H., NISHIO, N., NAGAI, S. Synthesis of acetone glycerol acyl esters by immobilized lipase of *Mucor miehei*. *Biotechnology Letters*, v. 11, n. 3, 1989.
- RANTAKYLA, M. & AALTONEN, O. Enantioselective esterification of ibuprofen in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase. *Biotechnology Letters*, v. 16, n. 8, p 825-830, 1994.
- RITTNER, H. Óleo de mamona e derivados. 1^a ed. São Paulo, 1996.
- SCHLOTTERBECK, A., LANG, S., WRAY, V., WAGNER, F. Lipase-catalyzed monoacylation of fructose. *Biotechnology Letters*, v. 15, n. 1, p 61-64, 1993.
- SEGEL, I. *Enzyme Kinetics*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 1993.
- STRATHMANN et alii. *Pervaporation in Biotechnology*. Amsterdam, Elsevier Science, 1991.
- SWERN, D. *Bailey's Industrial Oil and Fats Products*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 1982.
- VALIVETY, R. H., HAILING, P. J., MACRAE, A. R. Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media. *Biotechnology Letters*, v. 15, n. 11, p 1133-1138, 1993.

