

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA
OBTENÇÃO DE ÁCIDO MANDÉLICO A
PARTIR DE MANDELATO DE ETILA
UTILIZANDO LIPASES**

Tânia Teodoro da Silva Ticom

**Rio de Janeiro
2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA OBTENÇÃO DE
ÁCIDO MANDÉLICO A PARTIR DE MANDELATO DE ETILA
UTILIZANDO LIPASES**

Tânia Teodoro da Silva Ticom

**Dissertação submetida como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientadores:

Profa. Dra. Gisela Maria Dellamora Ortiz

Prof. Dr. Joaquim Fernando Mendes da Silva

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Lúcia Moreira Campos Paiva

Prof. Dr. Antônio Ferreira Pereira

Prof. Dr. Marcelo de Pádula

Prof. Dr. Hélio de Mattos Alves (suplente)

Setembro de 2003

Esta dissertação foi realizada sob a orientação dos professores Gisela Maria Dellamora Ortiz, do Depto. de Fármacos da Faculdade de Farmácia/UFRJ e Joaquim Fernando Mendes da Silva, do Depto. de Química Orgânica do Instituto de Química/UFRJ com o apoio financeiro da CAPES, do PRONEX e do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FICHA CATALOGRÁFICA

T557o Ticom, Tânia Teodoro da Silva
Otimização de Parâmetros para Obtenção de Ácido Mandélico a Partir de Mandelato de Etila Utilizando Lipases / Tânia Teodoro da Silva
Ticom - Rio de Janeiro: UFRJ / FF, 2003.
x, 85f.: il.; 31 cm.
Orientadores: Profa. Dra. Gisela Maria Dellamora Ortiz e Prof. Dr. Joaquim Fernando Mendes da Silva
Dissertação (mestrado) - UFRJ / FF / Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2003.
Referências Bibliográficas: f. 75-85.
1. Lipase. 2. Rhizomucor miehei. 3. Ácido mandélico. 4. Hidrólise. 5. Esterificação. I. Dellamora-Ortiz, Gisela Maria e Silva, Joaquim Fernando Mendes da. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título

CDD574.19253

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

À Gisela e Joaquim pela orientação e incentivos recebidos. Pelo otimismo, determinação e paciência com minhas limitações, e principalmente por terem sensibilidade para saber o momento de serem exigentes e o de serem prestativos.

Ao professor Mauro pelo empréstimo do ultrassom, pela companhia agradável, e principalmente por ter sugerido a Gisela como orientadora.

À professora Mirian pela amizade, apoio e motivação nestes anos todos de convivência.

Às professoras Nádia e Sheila do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos pelo uso do titulador automático.

À Eliane do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos pela ajuda e boa vontade sempre que precisei.

À professora Fátima pelo esquema das reações das lipases.

À Renata, Fernanda, Regina e Tatiana do laboratório de Enzimologia Industrial, pela paciência em ouvir minhas lamentações.

Aos meus pais e irmãs, pela preocupação e pela disposição em me ajudar.

Às minhas queridas filhas Lorena e Cecília pela ajuda na digitação deste trabalho e, principalmente, por terem suportado a (dura) convivência comigo neste período.

Aos mestres espirituais por me fazerem entender que tudo valeu a pena.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

I - INTRODUÇÃO	1
1 - Histórico	1
2 - Reações Enzimáticas	2
3 - Lipases	3
3.1 - Definição	3
3.2 - Estrutura e Aspectos Cinéticos	3
3.3 - Fonte	6
3.4 - Produção	6
3.5 - Purificação	7
3.6 - Propriedades	8
3.6.1 - Propriedades Físico-químicas	8
3.6.2 - Especificidade	9
3.7 - Imobilização	10
3.8 - Reações	12
3.9 - Aplicações	14
3.10 - Utilização em Síntese Orgânica e em Resolução de Misturas Racêmicas	16
3.10.1 - Ácidos alfa-hidroxi carboxílicos aromáticos – Ácido Mandélico	18
4 - Planejamento Fatorial	23
II - OBJETIVOS	25
1 - Objetivo geral	25
2 - Objetivos Específicos	25

III - MATERIAL E MÉTODOS	26
1 - Material	26
1.1 - Reagentes e Produtos Químicos	26
1.2 - Enzimas	26
2 - Métodos	26
2.1 - Imobilização da Enzima	25
2.1.1 - Tratamento das Resinas Phenyl-Sepharose® e Octyl-Sepharose®	26
2.1.2 - Adsorção da Enzima	27
2.2 - Reações de Esterificação	27
2.2.1 - Esterificação de ácido mandélico catalisada por lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	27
2.2.2 - Esterificação de ácido mandélico catalisada por lipase de <i>Candida rugosa</i>	27
2.2.3 - Esterificação de ácido mandélico com álcool isoamílico	28
2.3 - Reações de Transesterificação	28
2.3.1 - Transesterificação de ácido mandélico com acetato de vinila	28
2.3.2 - Transesterificação de mandelato de etila com acetato de vinila	29
2.3.3 - Transesterificação catalisada por lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada	29
2.4 - Reações de Hidrólise	29
2.5 - Hidrólise do Mandelato de Etila	30
2.6 - Análise Estatística	30
2.7 - Métodos Analíticos	31
2.7.1 - Medida de Atividade Lipásica	31
2.7.2 - Quantificação de Proteínas	31
2.7.3 - Determinação do Grau de Esterificação por CLAE	32
2.7.4 - Determinação do Excesso Enantiomérico	32

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1 - Esterificação do Ácido Mandélico	33
1.1 - Reações de Esterificação	33
1.2 - Reações de transesterificação	35
1.3 - Reações de Hidrólise	36
2 - Hidrólise do Mandelato de Etila	37
3 - Determinação do Excesso Enantiomérico	71
V - CONCLUSÕES	74
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ASP- ácido aspártico

CMC- concentração micelar crítica

CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO- dimetilsulfóxido

ee- excesso enantiomérico

E- enzima

GLU- ácido glutâmico

HIS- histidina

Kda- kilodaltons

Lipo livre- Lipozyme® não imobilizada

Lipo-OS- Lipozyme® imobilizada em Octyl-Sepharose®

Lipo-PS- Lipozyme® imobilizada em Phenyl-Sepharose®

P- produto

rpm- rotações por minuto

SDS- dodecil sulfato de sódio

SER- serina

S- substrato

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das conformações fechada e aberta da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	5
Figura 2 - Reações catalisadas por lipases	14
Figura 3 - Rotas sintéticas de produção do ácido (R)-mandélico	23
Figura 4 - Lipase na forma “aberta” imobilizada em suporte hidrofóbico. Equilíbrio entre formas “fechada” e “aberta” de lipase solúvel (livre)	39
Figura 5 - Mecanismo provável de agregação das lipases	42
Figura 6 - Esquema dos diferentes estados físico-químicos de moléculas de éster em meio aquoso	70

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com 1U, 9U, 22U e 54U de Lipo livre	40
Gráfico 2 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo livre 1U/9U	46
Gráfico 3 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo livre 22U/54U	47
Gráfico 4 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto com 1U e 9U de Lipo livre	47
Gráfico 5 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto com 22U e 54U de Lipo livre	48
Gráfico 6 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo livre 1U/54U	49
Gráfico 7 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto com 1U e 54U de Lipo livre	49
Gráfico 8 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com 1U, 9U, 22U e 54U de Lipo-OS	51
Gráfico 9 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com 1U, 9U, 22U e 54U de Lipo-PS	52
Gráfico 10 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo-OS 1U/9U	54
Gráfico 11- Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo-OS 9U/54U	54
Gráfico 12 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto com 9U e 54U de Lipo-OS	55
Gráfico 13- Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo-OS 1U/54U	56
Gráfico 14 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto com 1U e 54U de Lipo-OS	56
Gráfico 15- Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo-PS 1U/9U	57

Gráfico 16 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo-PS 22U/54U	58
Gráfico 17- Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo-PS 1U/22U	58
Gráfico 18 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto com 1U e 22U de Lipo-PS	59
Gráfico 19- Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo-PS 1U/54U	60
Gráfico 20 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto com 1U e 54U de Lipo-PS	60
Gráfico 21- Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a Lipo-OS e Lipo-PS 1U/54U	61
Gráfico 22 - Efeito da concentração de enzima sobre a influência da hidrofobicidade do suporte na conversão de substrato em produto com 1U e 54U de lipase	62
Gráfico 23 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da hidrofobicidade do suporte na conversão de substrato em produto com 1U e 54U de lipase	62
Gráfico 24 - Efeito do tempo de reação sobre a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto com 1U e 54U de lipase	63
Gráfico 25 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com 1U de Lipo livre, Lipo-OS e Lipo-PS	64
Gráfico 26 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com 9U de Lipo livre, Lipo-OS e Lipo-PS	65
Gráfico 27 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com 22U de Lipo livre, Lipo-OS e Lipo-PS	66
Gráfico 28 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com 54U de Lipo livre, Lipo-OS e Lipo-PS	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Aplicações industriais das lipases	14
Tabela II - Percentual de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico utilizando as diferentes preparações enzimáticas, em diferentes concentrações	37
Tabela III - Coeficientes dos efeitos principais e de interação sobre a conversão de mandelato de etila em ácido mandélico	44
Tabela IV - Excesso enantiomérico do mandelato de etila não reagido	72

RESUMO

Os ácidos α -hidroxicarboxílicos aromáticos são uma classe importante de compostos que podem ser produzidos por vias enzimáticas. Entre eles, encontra-se o ácido mandélico e seus derivados, considerados os mais importantes sob o ponto de vista comercial. O ácido (R) mandélico é tanto um intermediário versátil para produtos farmacêuticos, quanto um agente de resolução em processos quirais.

Lipases são enzimas com crescente interesse em biocatálise em função da especificidade por um grande número de substratos, além de sua alta seletividade e/ou estereoespecificidade. Suas propriedades catalíticas podem ser facilmente moduladas pelas condições de reação, e pequenas variações na estrutura da enzima podem causar significativas mudanças em suas propriedades. A fim de alcançar um bom rendimento do produto de reação, torna-se necessário realizar a escolha certa dos parâmetros de reação que irão influenciar a atividade, seletividade e estabilidade da enzima.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a obtenção do ácido mandélico a partir de mandelato de etila utilizando diferentes preparações de lipase de *Rhizomucor miehei*, sendo estas não imobilizada (**Lipo livre**) ou imobilizadas em dois suportes com hidrofobicidades distintas (**Lipo-OS e Lipo-PS**).

Os resultados obtidos permitiram verificar que as reações apresentaram comportamentos muito diferentes. A enzima imobilizada no suporte mais hidrofóbico (**Lipo-OS**) mostrou-se mais eficiente que as demais preparações enzimáticas na conversão do mandelato de etila em ácido mandélico. Quanto maior a concentração da enzima utilizada, maior foi a produção de ácido mandélico até 7 horas de reação, para todas as preparações enzimáticas. O tempo de reação foi o fator mais importante para todas as preparações enzimáticas. A atuação da enzima livre foi favorecida por uma alteração no meio reacional, não sendo suficiente, porém, para que fossem alcançados níveis mais altos que os obtidos com a **Lipo-OS**. Além disso, a análise estatística demonstrou interação entre os fatores concentração de enzima e tempo de reação, para todas as concentrações utilizadas.

O presente trabalho permitiu estabelecer alguns parâmetros relevantes, tais como tempo de reação, concentração de enzima e tipo de preparação enzimática, a serem utilizados em futuros estudos empregando planejamento fatorial, de forma a estabelecer as melhores condições para reações de hidrólise por lipases.

ABSTRACT

An important class of compounds which can be produced by means of enzymatic routes are aromatic α -hydroxy carboxylic acids. Among them, mandelic acid and derivatives thereof are regarded as the most important representatives from a commercial point of view. (R) mandelic acid is both a versatile intermediate for pharmaceuticals and a resolving agent in chiral resolution processes.

Lipases are enzymes with a growing interest in biocatalysis because of their broad specificity and their high selectivity and/or stereospecificity. The catalytic properties of lipases can be very easily modulated by the reaction conditions. Significant changes in the enzyme properties have also been reported after chemical modification of the enzyme surface. In order to provide adequate yields, it is necessary to make the right choice of the reaction parameters with respect to enzyme activity, selectivity and structural stability.

The aim of this work was to study production of mandelic acid from ethyl mandelate catalysed by different preparations of lipase from *Rhizomucor miehei*, non-immobilized (**Lipo livre**) or immobilized in two different hydrophobic supports (**Lipo-OS** and **Lipo-PS**). The most efficient enzyme preparation for hydrolysis of ethyl mandelate into mandelic acid was lipase immobilized on Octyl-Sepharose® (**Lipo-OS**), the most hydrophobic support. The higher the enzyme concentration employed, the highest the mandelic acid concentration obtained up to 7 hours, for all the enzyme preparations (non-immobilized or immobilized on both hydrophobic support). Results showed that reaction time was the most important parameter in every case. Performance of the non-immobilized preparation was favored by an alteration of the reaction medium, which nevertheless was insufficient to attain the highest conversion levels obtained with **Lipo-OS**. Statistical analysis demonstrated interaction between enzyme concentration and reaction time, for all of the enzyme concentrations for each of the enzyme preparations.

Thus, the present study allowed us to determine important parameters, such as reaction time, enzyme concentration and type of enzyme preparation, to be used in future studies utilizing statistical experimental design in order to establish the best conditions for hydrolysis reactions catalysed by lipases.

I – INTRODUÇÃO

1 - Histórico

Existem indícios do uso de processos mediados por enzimas desde as civilizações mais antigas. Estas podiam ser encontradas na natureza e utilizadas na produção de alimentos como queijo, cerveja, vinho, vinagre, e ainda, na fabricação de couro e linho. O desenvolvimento da indústria nas últimas décadas, em função dos avanços no conhecimento da produção bioquímica e dos processos fermentativos em larga escala, tornou possível a produção de enzimas purificadas e bem caracterizadas. Além disso, a utilização da tecnologia de DNA recombinante tem favorecido os processos de fabricação e permitido a comercialização de enzimas que anteriormente não podiam ser produzidas [KIRK, VAN-BORCHERT & FUGLSANG, 2002].

O avanço nos métodos de utilização de enzimas aumentou muito sua demanda. O número de enzimas usado comercialmente continua a se multiplicar devido às diversas transformações que estas podem catalisar. Atualmente, quase 4000 enzimas são conhecidas, dentre as quais 200 são comercialmente utilizadas, sendo a grande maioria de origem microbiana [SHARMA, CHISTI & BANERJEE, 2001]. Até 1960, o total das vendas de enzimas era de apenas poucos milhões de dólares anualmente [SHARMA, CHISTI & BANERJEE, 2001], passando a aproximadamente 1 bilhão de dólares em 1995 e chegando a 1,5 bilhão em 2002 [KIRK, VAN-BORCHERT & FUGLSANG, 2002]. A demanda mundial de enzimas é suprida por 12 produtores principais e 400 fornecedores. Aproximadamente 60% da oferta mundial total de enzimas industriais é proveniente da Europa. Pelo menos 75% destas (incluindo lipases) tem ação hidrolítica. As proteases dominam o mercado, totalizando aproximadamente 40% das vendas [SHARMA, CHISTI & BANERJEE, 2001].

2 - Reações enzimáticas

Reações biocatalíticas têm cada vez mais sua tecnologia estabelecida para a síntese ou modificação de moléculas orgânicas [POWEL, 1996]. Embora as reações catalisadas por enzimas muitas vezes também possam ser efetuadas usando-se catalisadores inorgânicos, o interesse pelos biocatalisadores como vetores tecnológicos expandiu-se consideravelmente [BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996]. Os biocatalisadores são capazes de promover uma grande variedade de reações, além de poderem ser utilizados em grande escala [GROGER, 2001]. De fato, as reações catalisadas por enzimas se assemelham àquelas realizadas pelo metabolismo dos seres vivos e, assim, os mecanismos de reação e processos associados são vistos como mais favoráveis ao meio ambiente do que os processos químicos clássicos [PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000].

O grande potencial biotecnológico das lipases se deve à versatilidade de suas propriedades como termorresistência, resistência a pH [TAIPA, AIRES-BARROS & CABRAL, 1992], estabilidade frente a solventes orgânicos [DELLAMORA-ORTIZ *et al*, 1997] e ainda ao fato de não requererem coenzimas [ELIBOL & OZER, 2000]. Além disso, as lipases são capazes de produzir uma grande variedade de produtos com alta pureza (e conseqüentemente alto valor agregado) resultantes de sua especificidade e estereosseletividade. A obtenção de enantiômeros puros por via enzimática apresenta como vantagem o fato de se utilizar condições mais brandas de temperatura, pH e pressão, devido à baixa energia de ativação envolvida, trazendo como conseqüência uma maior eficiência catalítica [PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000]. Sendo assim, são evitados problemas, tais como isomerização, racemização, epimerização e rearranjos, provenientes de condições mais extremas de reação [PATEL, 2002].

3 - Lipases

3.1 - Definição

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. Apresentam a peculiaridade de serem ativadas em presença de interfaces hidrofóbicas [BASTIDA *et al.*, 1998], além de mostrarem pouca atividade em soluções aquosas contendo substratos solúveis [MARTINELLE, HOLMQUIST & HULT, 1995].

Meios reacionais não-aquosos ou microaquosos favorecem os processos de esterificação, interesterificação e transesterificação [KLIBANOV, 1997].

3.2 - Estrutura e Aspectos Cinéticos:

A elucidação das estruturas tridimensionais de algumas lipases por cristalografia de raios X proporcionou um maior entendimento a respeito do mecanismo de ação dessas enzimas [SCHRAG & CYGLER, 1997]. As lipases são α/β -proteínas, formadas por um domínio de folhas β -pregueadas, dispostas paralelamente, interligadas e circundadas por α -hélices [JAEGER & REETZ, 1998].

Os resíduos catalíticos essenciais à atividade enzimática variam entre as espécies, sendo as tríades SER-GLU-HIS e SER-ASP-HIS as mais freqüentes [JAEGER, DYKSTRA & REETZ, 1999]. O resíduo de serina do sítio catalítico encontra-se localizado na volta entre uma α -hélice e uma folha β , sendo chamado “cotovelo” nucleofílico [EGGERT *et al.*, 2001].

Em muitos casos, o sítio ativo encontra-se protegido por uma cadeia polipeptídica similar a uma “tampa”, formada por resíduos hidrofóbicos [LAWSON *et al.*, 1994], tornando-o inacessível ao substrato [BRADY *et al.*, 1990]. Quando a enzima é submetida a meios aquosos, a exposição do sítio é termodinamicamente desfavorável, permanecendo então na conformação “fechada” ou inativa (Figura 1). No entanto, na presença de substratos

hidrofóbicos (interfaces) observa-se uma mudança na estrutura da enzima para a conformação ativa ou “aberta”, tornando o sítio ativo da enzima totalmente acessível ao substrato, explicando assim o fenômeno de ativação interfacial [FERRATO *et al.*, 1997; BRADY *et al.*, 1990; LAWSON *et al.*, 1994]. Já foi verificado, no entanto, que algumas lipases não apresentam esta “tampa”, como a lipase B de *Candida antarctica* e a lipase de cobaia e que também não sofrem ativação interfacial [UPPENBERG *et al.*, 1995; MARTINELLE, HOLMQUIST & HULT, 1995].

Os estudos realizados para se determinar a estrutura tridimensional das lipases revelaram heterogeneidade na seqüência de aminoácidos e localização da “tampa”, mas alguma homologia na estrutura terciária e no sítio ativo [PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000].

Durante muito tempo as lipases foram consideradas como uma classe especial de esterases [SCHMID & VERGER, 1998]. Muitos critérios têm sido estabelecidos para a diferenciação destas enzimas com base em suas habilidades de serem ou não ativadas por interfaces óleo-água. Porém, já é conhecido que nem todas as lipases são ativadas por interfaces, ao mesmo tempo em que a ausência de ativação não é um argumento concreto para se concluir que seja uma esterase [PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000]. Assim, uma lipase deve ser classificada não de acordo com seu comportamento interfacial, mas principalmente pela sua capacidade de hidrolisar acilgliceróis de cadeia longa [SCHMID & VERGER, 1998].

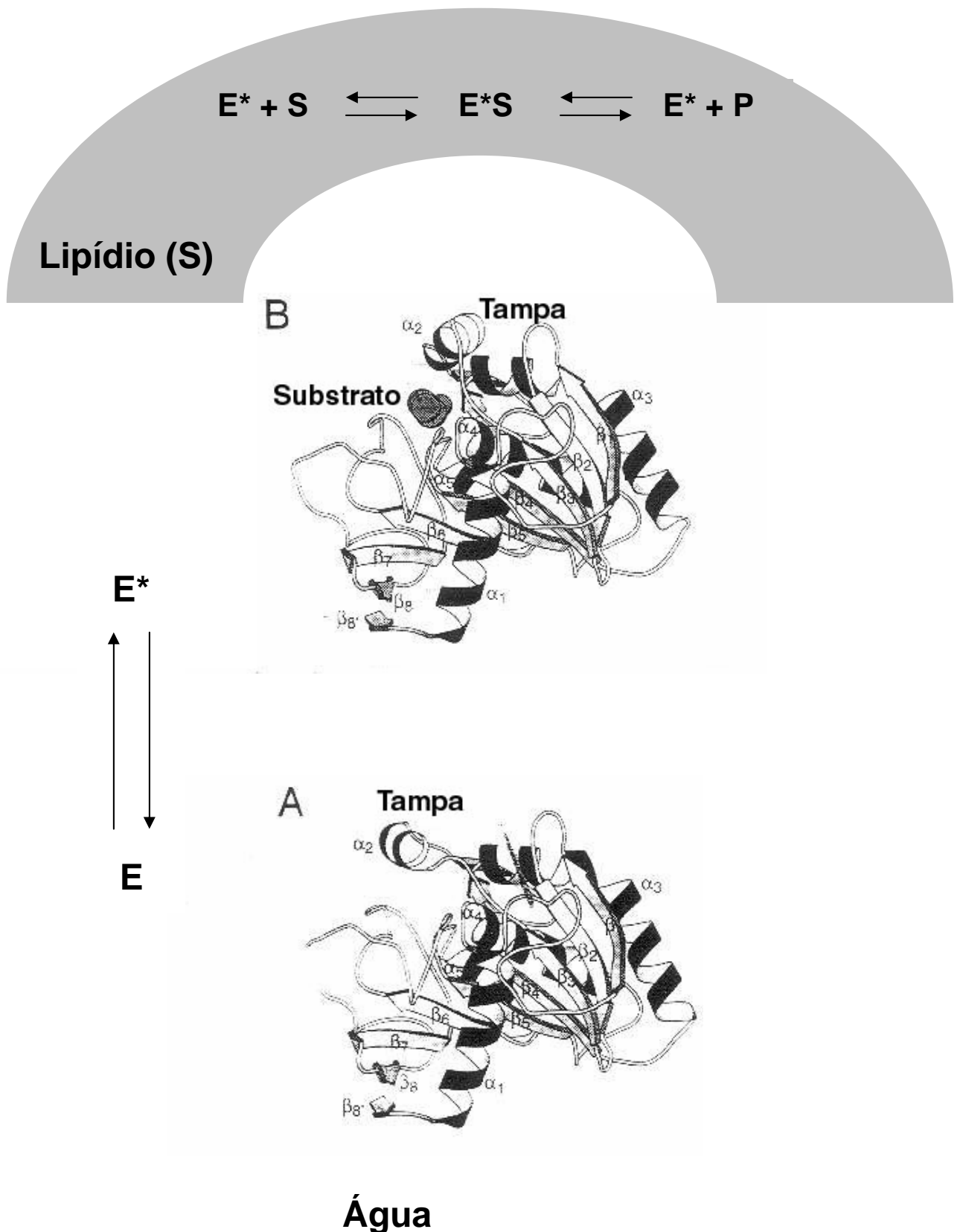


Figura 1 - Esquema das conformações fechada – E (A) e aberta – E*S (B), com a indicação da estrutura secundária, da lipase de *Rhizomucor miehei* (adaptado de JÄÄSKELÄINEN *et al.*, 1998).

3.3 - Fonte

As lipases são largamente encontradas na natureza em animais, plantas e microrganismos. Em eucariotas superiores estão envolvidas em várias etapas do metabolismo de lipídios, em processos de digestão, absorção, reconstituição e metabolismo lipoprotéico. Nas plantas são encontradas em tecidos de reserva [SHARMA, CHISTI & BANERJEE, 2001].

Os microrganismos são a principal fonte de obtenção das lipases de interesse comercial devido a diversos fatores, tais como: produzem enzimas extracelulares [SMITH & ALFORD, 1984], baixo custo relativo das enzimas produzidas [SCHMID & VERGER, 1998], possibilidade de produção em grandes quantidades, facilidade de controle das condições ambientais e de cultivo [RUÁ *et al.*, 1993], curto tempo de geração [KAMINI, MALA & PUVANAKRISHNAN, 1998] e, de modo geral, facilidade de manipulação genética [HONG & CHANG, 1998].

3.4 - Produção

A aplicação industrial das enzimas pode ser tanto “in situ”, pelo cultivo do microrganismo desejado em meio com substratos adequados, como “ex situ” através da utilização da lipase comercial purificada [PANDEY *et al.*, 1999].

As lipases microbianas são produzidas principalmente por fermentação submersa [ELIBOL & OZER, 2000], sendo que a fermentação em meio sólido também pode ser utilizada [PANDEY *et al.*, 1999].

A produção de lipases é geralmente um processo associado ao crescimento do microrganismo e ocorre em resposta às condições ambientais. Em função disto, na formulação de um meio de cultivo para microrganismos produtores de lipases, devem constar nutrientes necessários ao crescimento celular e à produção de metabólitos [SMITS *et al.*, 1996].

Basicamente, os meios de cultivo são compostos de fontes de carbono e nitrogênio, estando eventualmente presentes sais inorgânicos, fatores de crescimento e vitaminas [BECKER *et al.*, 1997]. Além disso, pode ser necessária a adição de certas substâncias (óleos vegetais e animais, ácidos graxos, detergentes, etc.) como indutoras para o aumento da produção da enzima, quando estas são passíveis de indução metabólica. No entanto, a produção de determinadas lipases pode ser inibida por algumas destas substâncias [MALISZEWSKA & MASTALERZ, 1992].

Além da composição do meio de cultura, outros parâmetros como a idade e a concentração do inóculo, o nível de aeração, agitação, pH e temperatura também são essenciais a serem investigados quando se deseja aumentar a produtividade e conhecer mais profundamente a fisiologia do microrganismo produtor [FREIRE, 1996; ELIBOL & OZER, 2000; ALONSO, 2001].

3.5 - Purificação

Lipases de várias origens têm sido purificadas e caracterizadas em função de sua atividade e estabilidade [LAWSON *et al.*, 1994]. Em muitos casos estas enzimas têm sido purificadas à homogeneidade e cristalizadas, permitindo a determinação da relação estrutura-função e um melhor entendimento do mecanismo cinético [LANG *et al.*, 1998].

As propriedades catalíticas das lipases podem ser afetadas pelas diferenças em suas estruturas tridimensionais. A elucidação destas estruturas possibilita uma melhor seleção do tipo de enzima para as aplicações industriais desejadas [SCHMID & VERGER, 1998].

A purificação das lipases torna-se essencial para a adequada caracterização de propriedades tais como especificidade, pH ótimo, temperatura ótima e resistência ao pH e temperatura, para que possam ser racionalmente utilizadas nos mais diversos processos industriais [HONG & CHANG, 1998]. A purificação pode levar a um aumento na

estereosseletividade de uma preparação por remover lipases contaminantes que não apresentam ou apresentam menor estereosseletividade [LALONDE, NAVIA & MARGOLIN, 1997].

A maioria dos trabalhos publicados é referente à purificação de pequenas quantidades de enzima. Pouca informação se tem para a utilização em processos em larga escala. Provavelmente isto se deve ao fato de a maioria das aplicações comerciais não exigirem a utilização de enzimas puras, além de encarecer o processo [CHISTI, 1998].

3.6 - Propriedades

3.6.1 - Propriedades Físico-químicas

Na revisão feita por Martins [2001] foi possível observar que as propriedades físico-químicas das lipases podem variar consideravelmente. As massas moleculares reportados para estas enzimas variam entre 19 kDa e 207 kDa. Na sua grande maioria, as lipases microbianas são glicoproteínas, com pontos isoelétricos variando entre 3,4 e 9,9. As atividades máximas foram encontradas entre pH 4,5 e 10,0 para a grande maioria das lipases microbianas. Quanto à resistência ao pH, as enzimas bacterianas são estáveis em diferentes faixas de pH entre 5,0 e 12,0, enquanto as de fungos filamentosos e de leveduras se mantêm estáveis entre pH 3,0 e 10,0. Lipases bacterianas e de fungos filamentosos são mais resistentes à temperatura do que as de leveduras.

Enzimas provenientes de microrganismos termófilos, em geral, além de apresentarem maior estabilidade, também apresentam maior atividade em temperaturas elevadas e podem ainda apresentar maior resistência frente a solventes orgânicos [SCHIMIDT-DANNERT *et al.*, 1996] e às condições alcalinas do meio [WANG *et al.*, 1995]. A estabilidade térmica está relacionada à estrutura da enzima e é influenciada por fatores ambientais tais como pH e presença de íons metálicos [ZHU *et al.*, 2001]. Tem-se buscado lipases que apresentem maior

estabilidade em diferentes valores de pH e condições de estocagem, com vistas às diferentes aplicações industriais [SCHMID & VERGER, 1998].

As diferenças nas propriedades físico-químicas (massa molecular, ponto isoelétrico, temperatura ótima, pH ótimo e estabilidade térmica) de lipases produzidas por um mesmo microrganismo podem ser atribuídas às diferentes condições de cultivo, como, por exemplo, tipo e concentração de determinado nutriente [SABUQUILLO *et al.*, 1998]. Portanto, a fisiologia de crescimento do microrganismo pode resultar na expressão de diferentes formas de lipases [BROCCA *et al.*, 1998].

3.6.2 - Especificidade

Durante muito tempo as lipases apresentaram como definição de especificidade a diferença na taxa de hidrólise entre dois substratos distintos. Levando isso em consideração, estas enzimas foram classificadas em dois grandes grupos: lipases específicas e não específicas [ADER *et al.*, 1997].

O conceito de seletividade e especificidade tem sido diferenciado em alguns trabalhos mais recentes. Pela nova classificação, nas reações de hidrólise são medidas as concentrações das espécies encontradas, onde ocorre um equilíbrio entre substrato e produtos. Sendo assim, estas enzimas podem ser consideradas como lipases 1,3 específicas, lipases 1,3 seletivas e lipases não específicas [ADER *et al.*, 1997].

A grande maioria das lipases atua preferencialmente nas posições 1 e 3 dos triacilgliceróis. A hidrólise seletiva da ligação na posição 2 fica extremamente dificultada em função do impedimento estérico ao qual está submetida. Pode ocorrer um rearranjo espontâneo ou transesterificação de alguns monoacilgliceróis ou diacilgliceróis, havendo assim a hidrólise completa do triacilglicerol. Contudo, Sugihara e colaboradores [1991]

reportaram o isolamento de uma cepa de *Geotrichum candidum* capaz de produzir uma lipase com alguma seletividade pela posição 2 do triacilglicerol.

As lipases específicas são aquelas que catalisam preferencialmente a hidrólise de substratos definidos quanto ao tamanho da cadeia carbônica ou quanto ao grau de insaturação [YADAV, 1998]. As lipases não específicas são aquelas capazes de hidrolisar diferentes triacilgliceróis, ou ainda, ligações éster em quaisquer posições do triacilglicerol [SZTAJER *et al.*, 1992].

Além da especificidade pelo substrato e da regioseletividade, as lipases podem apresentar especificidade ou seletividade frente a um substrato com distribuição estérica conhecida [LANG *et al.*, 1998]. Esta característica é de grande interesse industrial, pois sugere seu potencial uso na resolução de misturas racêmicas em que somente um dos enantiômeros é de interesse. Estas enzimas foram utilizadas em reações de hidrólise [ROGALSKA *et al.*, 1993] e esterificação [OKAHATA & MORI, 1997] estereosseletivas, além da obtenção de isômeros a partir de precursores pró-quirais [SCHMID & VERGER, 1998].

3.7 - Imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas são definidas como aquelas confinadas ou localizadas em uma certa região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usadas repetidamente e continuamente. Além de favorecer a reutilização da enzima, a imobilização pode melhorar sua estabilidade por restringir o desenovelamento, porém podendo resultar em perda da atividade [POWEL, 1996]. A reutilização da enzima provê grande vantagem no custo, sendo um pré-requisito essencial quando se deseja estabelecer um processo economicamente viável [TISCHER & KASCHE, 1999]. Em alguns casos, a imobilização pode aumentar a enantioseletividade destas enzimas [REETZ, 2002].

O uso de enzimas imobilizadas compete com a utilização de enzimas nativas e com os processos químicos convencionais. Entretanto, uma cuidadosa avaliação de diversos fatores deve ser feita para a escolha do método a ser utilizado. O custo do processo de imobilização, a perda da atividade da enzima e a necessidade de produtos mais puros devem ser levados em consideração [UHLIG, 1998].

Embora existam muitas técnicas de imobilização, ainda não existe uma que possa ser considerada como universal para todas as aplicações ou para todas as enzimas. Isto se deve às diferentes características químicas e composição das enzimas, às diferentes propriedades dos substratos e produtos, assim como às diversas aplicações. Para cada utilização torna-se necessário encontrar um procedimento que seja simples e barato, e que origine produtos com alta retenção de atividade e com alta estabilidade operacional [KENNEDY & ROIG, 1995].

É notável que qualquer alteração no equilíbrio entre as formas “aberta” e “fechada” ou mesmo na conformação da enzima, pode provocar mudanças drásticas em suas propriedades catalíticas. Este fato pode ser observado nas mais diversas técnicas de imobilização, envolvendo diferentes áreas da enzima, gerando diferença na rigidez de sua estrutura ou mesmo criando um microambiente específico ao seu redor. A combinação entre a técnica de imobilização e as condições de reação conseguem gerar resultados bastante diversos [PALOMO *et al.*, 2002].

As lipases são espontaneamente solúveis em soluções aquosas, porém seus substratos naturais não são. Embora o uso de solventes orgânicos adequados ou de emulsificantes, ajudem a solucionar o problema do contato entre enzima e substrato, a formação destes sistemas pseudo-homogêneos apresenta desvantagens. Estas podem ser de natureza tecnológica, como a contaminação dos produtos pela enzima residual, ou ainda econômica, como a não reutilização da enzima [BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996].

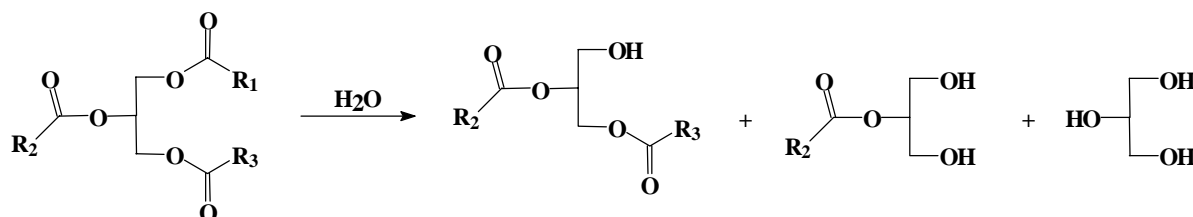
A princípio, todos os métodos existentes para imobilização podem ser empregados para lipases, dando-se preferência à utilização daqueles que apresentem uma alta retenção de atividade [UHLIG, 1998]. O método mais fácil de se preparar uma enzima imobilizada está baseado na adsorção física das moléculas desta sobre a superfície de matrizes sólidas. O método consiste em colocar em contato a solução aquosa da enzima e o suporte [KENNEDY & ROIG, 1995]. Entre todos os métodos, o de adsorção é o mais utilizado para lipases devido a facilidades no preparo, na recuperação do suporte e ao baixo custo relativo [PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000]. Este método tem sido muito útil em sistemas não aquosos, onde a dessorção consegue ser evitada devido à baixa solubilidade da enzima nos solventes hidrofóbicos [TISCHER & KASCHE, 1999].

Têm sido relatados na literatura outros métodos tais como: oclusão, ligação covalente, ligação cruzada, precipitação, ligação metálica, membranas, entre outros. Estes podem ser utilizados isoladamente ou combinados [BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996].

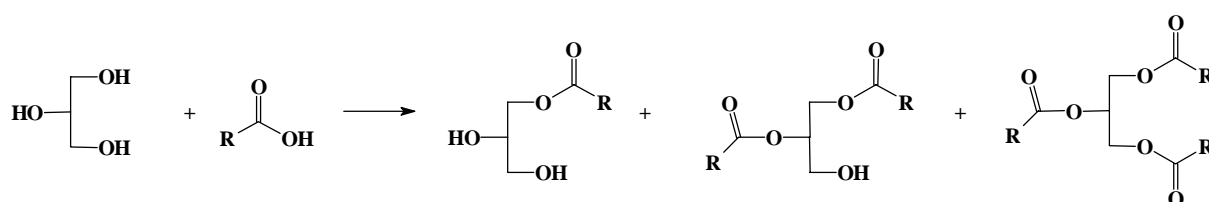
3.8 - Reações

As diversas reações catalisadas por lipases podem ser observadas na Figura 2.

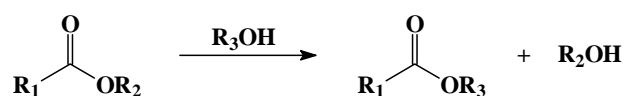
A – HIDRÓLISE



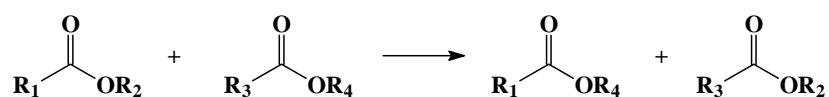
B – SÍNTESE – ESTERIFICAÇÃO



C- TRANSESTERIFICAÇÃO – ALCOÓLISE



D – INTERESTERIFICAÇÃO



E – ACIDÓLISE

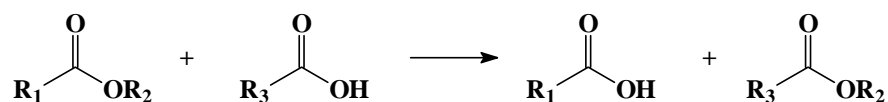


Figura 2 – Reações catalisadas por lipases.

3.9 - Aplicações

As lipases são consideradas excelentes biocatalisadores em numerosos processos industriais nas mais diversas áreas, tais como alimentos, processos farmacêuticos, formulação de detergentes, oleoquímica, agroquímica, cosméticos, manufatura de papéis, couro, entre outras [VULFSON, 1994]. Ainda podem ser ferramentas úteis na fabricação de biossensores para utilização em análises clínicas, análises de alimentos, análises químicas, de contaminação ou poluição de ambientes [PANDEY *et al.*, 1999]. Além disso, as lipases têm sido utilizadas em terapias enzimáticas e tratamento de dejetos, efluentes e esgoto [KURITA-WATER, 1994; JAEGER & REETZ, 1998].

As principais aplicações das lipases encontram-se resumidas na Tabela I.

De todas as aplicações possíveis, a indústria de detergentes tem sido o principal mercado para as lipases. Com o advento da engenharia genética, foram obtidas melhores estabilidade e atividade sob as condições alcalinas prevalentes nos processos de lavagem [BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996]. Estima-se que 1000 toneladas de lipases sejam adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos por ano. As “enzimas detergentes” detêm cerca de 32% do total da venda de lipases [JAEGER & REETZ, 1998].

O crescimento de seu uso em biotecnologia, especialmente no setor de química fina (incluindo o farmacêutico), em comparação com outras enzimas hidrolíticas, se deve à grande especificidade de algumas lipases e à possibilidade de sua utilização em solventes orgânicos. A síntese de compostos opticamente puros torna-se cada vez mais essencial na obtenção de produtos farmacêuticos, tendo em vista os inconvenientes da utilização de fármacos como mistura racêmica [PANDEY *et al.*, 1999].

O volume mundial de vendas de fármacos enantiomericamente puros já ultrapassa 100 bilhões de dólares, sendo que mais da metade dos novos fármacos que chegarão ao mercado nos próximos 5 anos estão projetados para conter componentes opticamente puros [VAN-BEILEN & LI, 2002].

Tabela I – Aplicações industriais de lipases.

Indústria	Ação	Produto ou aplicação
Detergente	Hidrólise de gorduras	Remoção de manchas
Laticínios	Hidrólise de leite gordo, queijo curado, modificação da gordura de manteiga	Desenvolvimento de agentes de sabor em leite, queijo e manteiga
Panificação	Melhora do sabor	Prolongamento do tempo de prateleira
Bebidas	Melhora aroma	Bebidas
Molhos para alimentos	Melhora qualidade	Maionese
Nutracêuticos	Transesterificação	Nutracêuticos
Carne e peixe	Desenvolvimento do sabor	Produtos cárnicos e pescados
Óleos e gorduras	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídios
Química	Enantiosseletividade, síntese	Produtos químicos
Cosmética	Síntese	Emulsificantes, umidificantes
Couro	Hidrólise	Produtos feitos de couro
Papel	Hidrólise	Melhora na qualidade
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gordura
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Cefalosporinas, penicilinas naproxeno, ibuprofeno hidantoínas, patuloide A rapamicina-42, lamivudina vitamina D

3.10 - Utilização em Síntese Orgânica e em Resolução de Misturas Racêmicas

A utilização de lipases em síntese orgânica está se tornando cada vez mais importante. Estas enzimas são utilizadas como catalisadores em uma ampla variedade de transformações regio e estereosseletivas, atuam em interfaces óleo-água e toleram solventes orgânicos do meio reacional [BERGLUND & HUTT, 2000]. De acordo com a condição, a quantidade de água no meio reacional irá determinar a direção da reação. Quando houver pouca ou nenhuma água, apenas a esterificação ou transesterificação será favorecida. Quando houver excesso de água a reação se dará na direção da hidrólise [KLIBANOV, 1997].

As lipases são utilizadas como poderosas ferramentas na síntese de lipídios estruturados, sendo estes triacilgliceróis contendo resíduos de ácidos graxos em posições específicas [JENNINGS & AKOH, 2001]. São realizadas modificações na composição dos ácidos graxos e/ou na distribuição na molécula do glicerol. Devido à estrutura molecular dos triacilgliceróis influenciar seus destinos metabólicos no organismo, assim como suas características físicas, a obtenção de lipídios estruturados torna possível a melhora de suas propriedades nutritivas e farmacêuticas. Lipases 1,3- específicas são utilizadas como catalisadores nestas reações onde existe a necessidade de modificações específicas na molécula do acilglicerol. Iwasaki e Yamane [2000] fizeram uma revisão de recentes avanços na síntese de lipídios estruturados catalisada por lipases. Estes pesquisadores classificaram estes triacilgliceróis em vários grupos baseado em suas estruturas, e a estratégia sintética para cada grupo foi descrita com vários exemplos.

Ésteres de isoamila de ácidos graxos de cadeia curta são importantes componentes de “flavour” e fragrância largamente utilizados em alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Hari-Krishna e colaboradores [2001] testaram a influência de diversos parâmetros no aumento da produção do acetato de isoamila obtido por esterificação do álcool isoamílico, utilizando a lipase Lipozyme IM-20 de *Rhizomucor miehei*. Estudos anteriores

demonstraram que altos rendimentos de ésteres de ácido acético eram difíceis de serem alcançados, a não ser em baixas concentrações de substrato, devido à inativação da lipase pelo ácido. Como a nível econômico é interessante se trabalhar com altas concentrações de substrato, os autores procuraram buscar estratégias para alcançar este objetivo. Com a variação de diversos parâmetros foram alcançados rendimentos acima de 80% em concentrações de substrato (ácido acético) de 1,5 M e em concentrações de enzima relativamente baixas (10 g/l, que correspondem a 250 U/L).

A questão relacionada à influência da estereoquímica sobre a atividade biológica é de particular interesse na síntese de moléculas bioativas. Lipases são poderosos catalisadores de transformações enantiosseletivas como esterificações em solventes orgânicos [HSU, WU & WANG, 1990], hidrólises em meios aquosos [MITSUDA *et al.*, 1988] e em sistemas bifásicos [KLIBANOV, 1990]. CHEONG *et al.* [1996] pesquisaram as condições ótimas de reação para a síntese do sistano, um fungicida sistêmico, pela resolução com lipases. Foi selecionado um álcool primário quiral contendo um carbono quaternário como precursor para a resolução. Entre várias condições de reação, a transesterificação apresentou alta seletividade. Ainda foi verificada uma melhora na seletividade quando a piridina foi utilizada como aditivo.

Diversos estudos demonstraram que a atividade farmacológica de fármacos racêmicos encontra-se principalmente em um dos enantiômeros (eutômero), enquanto o outro (distômero) pode interagir com diferentes receptores, promovendo efeitos colaterais [PANDEY *et al.*, 1999] ou tóxicos indesejáveis. Os profenos (ácidos 2-aril propiônicos) são um importante grupo de antiinflamatórios não esteroidais, que apresentam atividade farmacológica, principalmente na forma de (S) enantiômero. O naproxeno é um importante membro desta família, sendo que a forma (S) mostrou-se 28 vezes mais ativa do que o isômero (R). Recentemente, foi demonstrada a resolução enzimática do naproxeno racêmico utilizando lipases [SASAKI, GIORNO & DRIOLI, 2001]. A produção do (S)-naproxeno foi

realizada através da hidrólise seletiva da mistura racêmica do éster metílico do naproxeno. Para isto, foram utilizados dois tipos de lipases de *Candida rugosa* imobilizadas em um reator de membrana multifásico.

Em função da alta especificidade de muitas enzimas, suas aplicações tornam-se limitadas. Para expandir seus usos, muitas das vezes são utilizados compostos não convencionais como substratos. Os compostos organossilicados sintéticos têm propriedades químicas e físicas bem peculiares e apresentam um importante papel em sínteses orgânicas. Uejima e colaboradores [1993] avaliaram a esterificação estereosseletiva de três isômeros do trimetilsililpropanol com cinco tipos de hidrolases. Compostos com alto grau de pureza ótica foram formados e até mesmo um álcool primário (2-trimetilsilil-1-propanol) foi estereosseletivamente esterificado pela lipase. Os autores ainda verificaram que a introdução do átomo de silício no substrato aumentava a estereosseletividade em alguns casos, e que este efeito seria dependente da estrutura do substrato.

3.10.1 - Ácidos alfa-hidroxicarboxílicos aromáticos - Ácido mandélico

Os ácidos alfa-hidroxicarboxílicos aromáticos são uma classe importante de compostos que podem ser produzidos por vias enzimáticas. Sob o ponto de vista comercial, entre os mais importantes, encontra-se o ácido mandélico enantiomericamente puro e seus derivados substituídos. O ácido (R) mandélico é tanto um intermediário versátil para produtos farmacêuticos quanto um agente de resolução em processos quirais [GRÖGER, 2001].

Devido a grande importância da pureza enantiomérica dos ácidos alfa-hidroxi carboxílicos aromáticos, muitos esforços têm sido feitos para estabelecer suas rotas de produção, particularmente as do ácido mandélico. Métodos assimétricos altamente eficientes, utilizando compostos metálicos ou catalisadores orgânicos, foram desenvolvidos para estes compostos ou seus precursores quirais. Muitas estratégias envolvendo processos de resolução

quiral, assim como sínteses assimétricas a partir de compostos pró-quirais, têm sido estabelecidas [GRÖGER, 2001].

A resolução enzimática do ácido mandélico e seus derivados foi obtida inicialmente através da anidrase carbônica catalisando a hidrólise de seus ésteres, sendo a enantiosseletividade desta enzima apenas moderada. O interesse pelo ácido mandélico como substrato para reações catalisadas por lipases cresceu devido à presença de um grupo hidróxi e outro carboxi no centro quiral, sendo possível sua resolução tanto como álcool tanto como ácido carboxílico [MIYAZAWA *et al.*, 2000].

A resolução de misturas racêmicas, de álcoois ou ácidos, pode ser alcançada utilizando-se as propriedades enantiosseletivas destas enzimas hidrolíticas. Compostos oticamente puros são obtidos por hidrólise estereosseletiva em soluções aquosas ou através de transesterificação dos álcoois racêmicos correspondentes [EBERT *et al.*, 1992].

Miyazawa e colaboradores [1992] mostraram dois tipos de transesterificação em meio orgânico: desacilação do grupo hidróxi acilado com álcool e acilação do grupo hidróxi livre com enol ésteres. A desacilação de mandelatos metílicos O-acilados com álcoois primários em éter isopropílico, utilizando lipases de diversas fontes, resultou em reações lentas. Foi observada variação da enantiosseletividade de acordo com a enzima, sendo que algumas destas não só atuavam no grupo aciloxila, mas também no alcóxicarbonila tornando a reação complicada. No estudo de acilação de mandelatos foi utilizado acetato de vinila em éter isopropílico como substrato, onde 10 lipases foram testadas. A taxa de conversão e a preferência estereoquímica variaram de acordo com a enzima. O solvente utilizado e o grupamento éster do mandelato também tiveram influência na atividade e enantiosseletividade. Um outro fato importante observado foi a inversão da preferência estereoquímica variando o doador acila, utilizando a mesma enzima.

Em sistema semelhante, Queiroz e Nascimento [2002] testaram a acilação de (R) e (S)-mandelato de metila com acetato de vinila, em vários solventes orgânicos, utilizando lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada em óxido de polietileno e gel de agar. Os resultados demonstraram a dependência da atividade enzimática de acordo com o suporte empregado. Foi verificado que o solvente apresentava grande efeito na conversão do produto, mas nenhum efeito na enantioseletividade. Independente do sistema utilizado foi observada a mesma preferência estereoquímica (enantiômero S).

Processos de desracemização, os quais fornecem um único enantiômero com 100% de excesso enantiomérico, têm merecido atenção crescente devido ao balanço econômico favorável em comparação à resolução cinética, que fornece dois enantiômeros com rendimento de no máximo 50% [AZERAD & BUISSON, 2000]. Para se evitar a ocorrência do isômero indesejado, tem sido uma prática comum racemizá-lo e submetê-lo novamente à resolução cinética em ciclos subsequentes, até que todo o material racêmico tenha sido convertido em um único estereoisômero. Este procedimento trabalhoso não é justificável para escala laboratorial, mas uma opção viável para escala industrial, onde o material re-racemizado é simplesmente adicionado à etapa subsequente. Uma das maiores desvantagens do processo é o fato que o isômero que não reage deve ser separado após a resolução cinética do produto formado, pois o método de racemização usualmente empregado (químico) também destrói o produto enantiomericamente enriquecido [STRAUSS & FABER, 1999]. Visando a simplificação do processo, estes autores utilizaram a racemização biocatalítica através de uma racemase, transformando apenas o substrato que não reagiu, devido à seletividade química da enzima e às condições reacionais do meio. Com isso, a etapa de separação pode ser omitida, simplificando o processo significativamente.

Métodos alternativos capazes de converter diretamente uma mistura racêmica em um simples enantiômero têm sido exaustivamente estudados. Azerad e Buisson [2000], em sua

revisão, relataram processos de desracemização através de etapas de racemização (resolução dinâmica) ou utilização de intermediários pró-quirais (estereoinversão) de álcoois secundários. Estes métodos geralmente envolvem a combinação seqüencial ou simultânea de uma reação enzimática enanciosseletiva com uma reação de racemização química ou enzimática do substrato.

Chadha e Baskar [2002] demonstraram a desracemização biocatalítica de ésteres alfa-hidroxiácidos por células de *Candida parapsilosis*. Os ésteres metílicos e etílicos do ácido mandélico forneceram exclusivamente o enantiômero S ($ee > 99\%$) em uma reação de única etapa.

Palomo e colaboradores [2002] analisaram a resolução hidrolítica de ésteres do ácido mandélico, comparados a outros substratos, utilizando lipase de *Candida rugosa* imobilizada em vários suportes. As propriedades catalíticas foram bem diferentes nos diversos derivados. Esta variação deve-se tanto às diferentes condições de reação quanto às diversas técnicas de imobilização. Todos os derivados apresentaram maior estabilidade do que a enzima solúvel nas condições utilizadas, sendo que o melhor resultado foi obtido com a Octyl-Sepharose®. Utilizando-se o mandelato de metila racêmico como substrato a maior atividade e enanciosseletividade se deu com o suporte de polietilenoimina, enquanto que a preferência enantiomérica manteve-se constante (isômero S). No entanto, quando o pH da reação passou de 7 para 5 houve um aumento na enanciosseletividade para todos os derivados.

Em revisão realizada por Gröger [2001] torna-se possível observar de maneira resumida e esquemática as diversas rotas sintéticas de produção dos ácidos alfa-hidroxi carboxílicos aromáticos, exemplificadas pela produção do ácido (R)- mandélico (Figura 3).

Apesar dos avanços na modificação e melhora da atividade enzimática, ainda existem muitos problemas a serem resolvidos com relação à aplicação das lipases em processos industriais utilizando-se substratos sintéticos quirais [CARDENAS *et al.*, 2001].

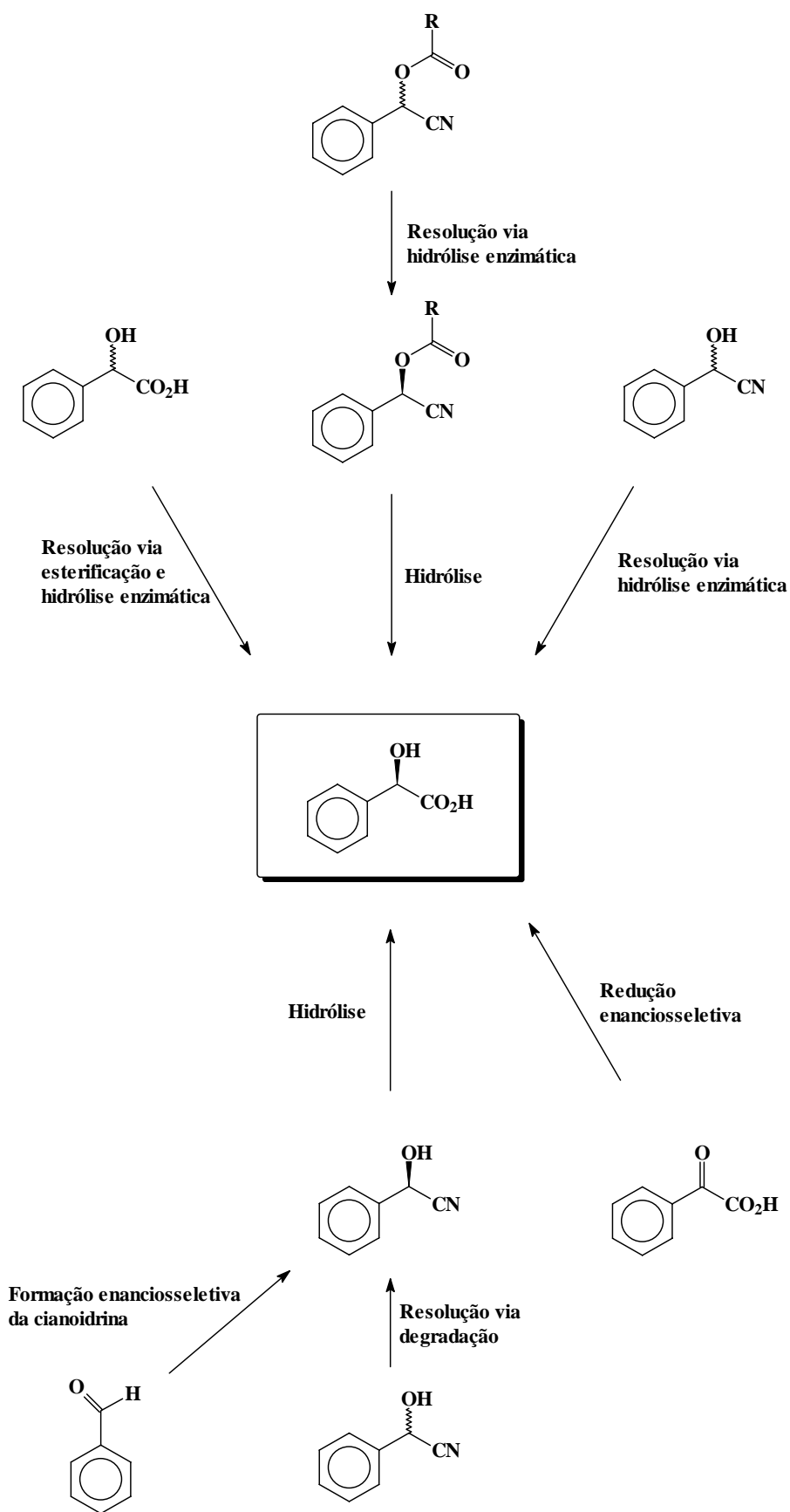


Figura 3: Rotas sintéticas de produção do (R)-ácido mandélico (adaptada de GRÖGER, 2001).

As lipases comerciais são baratas e podem ser utilizadas em solventes orgânicos, sendo que a escolha do sistema mais adequado requer a avaliação de diversos fatores [EBERT *et al.*, 1992]. De fato, muitos artifícios têm sido utilizados para melhorar a eficiência dos processos catalíticos. Estes podem influenciar positivamente ou negativamente a atividade, estabilidade e seletividade das lipases [CARREA, OTTOLINA & RIVA, 1995], e ainda também, o rendimento da reação. Dentre os parâmetros a serem avaliados inclui-se a utilização de enzimas imobilizadas, a presença de tensoativos, a estrutura química e propriedades físico-químicas do solvente orgânico [CARREA, OTTOLINA & RIVA, 1995] utilizado na reação, entre outros. No entanto, estes sistemas são complexos, sendo relativamente complicado e demorado o estabelecimento das condições de reação mais adequadas. Torna-se necessário, então, a busca por um método mais rápido e eficiente para esta finalidade.

4 - Planejamento fatorial

Quando se deseja estudar efeitos de dois ou mais fatores, os chamados experimentos ou planejamentos fatoriais podem ser utilizados [WERKEMA, 1996]. Fatores controláveis cujos efeitos não estão sendo analisados devem ser mantidos constantes, em níveis pré-fixados durante a execução do experimento. A aleatorização também deve ser realizada para balancear os possíveis efeitos dos fatores não controláveis sobre o item de controle de interesse, com o objetivo de tentar evitar má interpretação dos resultados.

Para estudar os experimentos fatoriais utiliza-se a técnica de análise de variância para dois ou mais fatores.

Uma interação significativa entre dois ou mais fatores poderá mascarar a importância dos efeitos principais dos fatores considerados. Mesmo na ausência de interação entre os fatores, os experimentos do tipo um “fator de cada vez” têm a desvantagem de necessitar de

um maior número de ensaios para a obtenção das estimativas dos efeitos dos fatores com a mesma precisão que um planejamento fatorial.

Hare-Krishna e colaboradores [2000] estudaram a otimização das condições reacionais para a produção de acetato de isoamila por esterificação do álcool isoamílico com ácido acético através de planejamento fatorial, empregando lipase de *Rhizomucor miehei*. Através do modelo experimental avaliado, o percentual de esterificação pode ser previsto em função da razão enzima/substrato, das concentrações do álcool e do ácido e do período de incubação. Foram alcançadas conversões acima de 95%, mesmo em concentrações de enzima muito baixas.

II - OBJETIVOS

1- Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar as reações de esterificação do ácido mandélico e de hidrólise de mandelato de etila catalisadas por preparações de lipase de *Rhizomucor miehei* livre e imobilizada em dois suportes com graus de hidrofobicidades diferentes, bem como por outras lipases comerciais.

2 – Objetivos Específicos

- Avaliar a esterificação do ácido mandélico por diferentes lipases comerciais.
- Acompanhar os perfis de conversão do mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação para cada preparação de lipase de *Rhizomucor miehei*, em diferentes concentrações.
- Comparar o grau de conversão obtido em cada caso para intervalos de tempo pré-estabelecidos.
- Verificar através de análise de variância dos resultados obtidos, o efeito do tempo de reação, da concentração de lipase, do grau de hidrofobicidade do suporte e da interação entre os efeitos sobre a conversão do mandelato de etila em ácido mandélico.
- Determinar por CLAE em coluna de fase quiral, o excesso enantiomérico obtido nas diferentes reações para intervalos de tempo pré-estabelecidos.

III – MATERIAL E MÉTODOS

1 - Material

1.1 - Reagentes e produtos químicos

Foi utilizado óleo de oliva da marca Andorinha para as análises de atividade lipásica. Foram fornecidos pela Vetec: hidróxido de sódio, fosfato de potássio monobásico, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, hexano e éter diisopropílico. Ácido mandélico, goma arábica, acetona, clorofórmio, heptano, acetonitrila, álcool isoamílico e fosfato de potássio dibásico foram fornecidos pela Reagen. Phenyl-Sepharose® 6 Fast Flow e Octyl-Sepharose® 4 Fast Flow foram obtidas da Amersham Biosciences. O mandelato de etila foi sintetizado segundo metodologia descrita por Eliel, Fisk e Prosser [2002] e o acetato de vinila foi fornecido pela Merck.

1.2 - Enzimas: Foram utilizadas lipases comerciais de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®), gentilmente cedida pela Novo Bioindustrial do Brasil e lipases comerciais de *Candida rugosa*, *Pseudomonas sp.* e *Rhizomucor miehei*, obtidas da Sigma.

2 - Métodos

2.1 - Imobilização da enzima

2.1.1 - Tratamento das resinas Phenyl-Sepharose® e Octyl-Sepharose®

Uma alíquota da suspensão de resina, em etanol 20% (v/v), foi decantada e o sobrenadante desprezado. A resina foi ressuspensa em 4 vezes o seu volume de água deionizada e novamente decantada. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, para a remoção total do etanol. Após este tratamento, a resina foi ressuspensa em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 para utilização nos experimentos.

2.1.2 - Adsorção da enzima

A metodologia empregada baseou-se no trabalho de Bastida e colaboradores [1998]. Alíquotas de 2 mL de leite empacotado de cada resina foram adicionadas a 40 mL da Lipozyme® diluída 1/20 em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0. Cada mistura foi mantida em reator a 4°C, sob agitação constante, por 2 h. Em seguida a mistura foi filtrada a vácuo, em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm. O filtrado foi recolhido para medida de atividade lipásica e dosagem de proteína não adsorvida. A resina foi lavada exaustivamente e ressuspensa em tampão fosfato 25 mM pH 7,0.

2.2 - Reações de Esterificação

2.2.1 - Esterificação de ácido mandélico catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei*

Os ensaios foram conduzidos em “shaker” a 40°C, 200 rpm. Os meios reacionais continham 53,2 mg de ácido mandélico (35 mM), 102 µL de etanol (175 mM) e 10 mL de solvente (clorofórmio ou hexano). As reações foram iniciadas por adição de 50 µL da enzima de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®) diluída 1/40 (2U), 1/120 (0,7U) ou 1/200 (0,4U). Após os tempos de 24, 48 ou 72 horas, os ensaios foram paralisados adicionando-se 10 mL de acetona. Foram realizadas diferentes combinações entre os fatores variáveis (solvente, concentração de enzima e tempo de reação), e os respectivos ensaios controle. Para os controles foi adicionada acetona ao meio reacional antes da adição da enzima. As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.2 - Esterificação de ácido mandélico catalisada por lipase de *Candida rugosa*

Foram realizados ensaios semelhantes aos anteriores, empregando a lipase de *Candida rugosa* solução (2,9 mg/mL) diluída 1/50 (0,5U), 1/100 (0,3U) ou 1/150 (0,2U). Aos meios reacionais, foi adicionada acetonitrila 5% (v/v) como co-solvente. As demais condições de

reação foram as mesmas dos ensaios anteriores, sendo em alguns casos utilizado o álcool isoamílico em substituição ao etanol.

2.2.3 - Esterificação de ácido mandélico com álcool isoamílico

Os ensaios foram conduzidos em “shaker” a 25°C, 150 rpm. Os meios reacionais continham 210 mg de ácido mandélico (140 mM), 750 mg de álcool isoamílico (850 mM) e 10 mL de hexano. As reações foram iniciadas por adição de 50 µL de lipase de *Pseudomonas sp.* solução (2,9 mg/mL) diluída 1/10 (13,5 U). Após 24 horas, os ensaios foram paralisados com 10 mL de acetona. Os ensaios controle foram preparados adicionando-se acetona ao meio reacional, antes da adição de enzima. Ensaios semelhantes foram realizados, empregando-se a lipase de *Candida rugosa* solução (2,9 mg/mL) diluída 1/10 (2,5 U).

2.3 - Reações de Transesterificação

2.3.1 - Transesterificação de acetato de vinila com ácido mandélico

Os ensaios foram conduzidos em “shaker” a 25°C, 150 rpm. Os meios reacionais continham 300 mg de ácido mandélico (200 mM), 4,4 mL de acetato de vinila e 5,6 mL de heptano ou éter diisopropílico. As reações foram iniciadas por adição de 50 µL de lipase de *Pseudomonas sp.* solução (10 mg/mL) diluída 1/10 (13,5U). Após 24 horas, os ensaios foram paralisados com 10 mL de acetona. Os ensaios controle foram preparados adicionando-se acetona ao meio reacional, antes da adição de enzima. Ensaios semelhantes foram realizados empregando-se as lipase de *Candida rugosa* solução (10 mg/mL) (2,5U) e *Rhizomucor miehei* solução (10 mg/mL) (0,75U) diluídas 1/10.

2.3.2 - Transesterificação de acetato de vinila com mandelato de etila

Os ensaios foram conduzidos em “shaker” a 25°C, a 150 rpm. Os meios reacionais continham 3 µL de mandelato de etila (1,5 mM), 14 µL de acetato de vinila (15 mM) e 10 mL de éter diisopropílico. As reações foram iniciadas por adição de 50 µL da lipase de *Rhizomucor miehei* solução (10 mg/mL) (0,75U) diluída 1/10. Após 24 ou 96 horas, os ensaios foram paralisados com 10 mL de acetona. Os ensaios controle foram preparados adicionando-se acetona ao meio reacional, antes da adição de enzima.

2.3.3 - Transesterificação catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada

Os ensaios foram conduzidos em “shaker” a 37°C, 150 rpm. Os meios reacionais continham 50 µL de mandelato de etila (357 mM), 80 µL de acetato de vinila (1224 mM) e 700 µL de solvente (éter diisopropílico ou heptano). As reações foram iniciadas por adição de 200 µL de suspensão de lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®) imobilizada em Phenyl-Sepharose® (2,5U). Após os tempos de 96, 144 ou 168 horas, os ensaios foram paralisados com 1 mL de acetona. Os ensaios controle foram preparados adicionando-se acetona ao meio reacional, antes da adição da enzima.

2.4 - Reações de Hidrólise

Os ensaios foram conduzidos em titulador automático (Mettler DL) a 37°C, onde durante o curso da reação, o pH foi mantido constante em 7,0 e a formação do produto foi acompanhada pelo consumo de hidróxido de sódio (0,015 N). Os meios reacionais continham 10 mL de mandelato de etila 20 mM, em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0, contendo 0,8 mL de DMSO, sendo adicionado o mesmo tampão em quantidade suficiente para completar o volume final a 20 mL. As reações foram iniciadas por adição de 2,5 mL de suspensão de lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®) imobilizada em Phenyl-Sepharose® (61U). Os

ensaios foram paralisados após 10 horas, por filtração a vácuo para separação do meio reacional e do biocatalisador (suporte contendo a enzima).

2.5 - Hidrólise do mandelato de etila

Os ensaios foram conduzidos em titulador automático (Mettler DL) a 37°C, onde durante o curso da reação, o pH foi mantido constante em 7,0 e a formação do produto foi avaliada pelo consumo de hidróxido de sódio (0,015 N). O meio reacional continha 12,5 mL de mandelato de etila 20 mM, em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0, contendo 1 mL de DMSO, sendo adicionado o mesmo tampão em quantidade suficiente para completar o volume final a 25 mL. A reação foi iniciada por adição da lipase imobilizada, sendo em cada caso, utilizadas quatro concentrações diferentes (atividade total 1U, 9U, 22U e 54U). Como controle foram conduzidas reações utilizando a enzima não imobilizada nas mesmas concentrações. Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos tempos de 3, 4, 5 e 7 horas e paralisadas por filtração a vácuo, no caso das enzimas imobilizadas, ou imediatamente congeladas em banho de gelo seco e acetona, no caso da enzima livre.

2.6 - Análise Estatística

Uma série de experimentos foi realizada, onde foram fatores fixos a enzima utilizada, o éster utilizado, a concentração do mandelato de etila no meio, a temperatura e o pH do meio reacional. Foram fatores variáveis: a concentração da enzima no meio reacional, o tempo de reação e a hidrofobicidade do suporte. Os experimentos foram realizados combinando os três fatores variáveis.

Após a realização dos experimentos, os dados obtidos para hidrólise do mandelato de etila foram submetidas a análise de variância (ANOVA) para dois ou mais fatores, para um nível de significância de 95%. A partir dos valores do teste F foi avaliada a contribuição de

cada fator isolado, de seus conjuntos dois a dois e do conjunto de todos os fatores sobre os resultados.

2.7 - Métodos Analíticos

2.7.1 - Medida de atividade lipásica

A determinação da atividade lipásica foi realizada rotineiramente por método titulométrico [Dellamora-Ortiz *et al.*, 1997]. Os ensaios foram realizados em “shaker” a 37°C, 200 rpm. A cada 5 mL de emulsão 20% (v/v) de óleo de oliva em goma arábica 5% (p/v), foram adicionados 4,95 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de 50 µL da enzima livre ou da suspensão da enzima imobilizada. Os ensaios foram paralisados após os tempos 0, 20, 40 e 60 minutos de reação, com 10 mL de mistura etanol / acetona 1:1. Os ácidos graxos formados foram quantificados por titulação contra NaOH 0,025 N, utilizando a fenolftaleína como indicador. O branco foi preparado por adição de mistura etanol / acetona, ao meio reacional, antes da adição da enzima.

Uma unidade de atividade enzimática (1U) corresponde à quantidade de enzima que produz 1µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

2.7.2 - Quantificação de proteínas

O método de Lowry modificado com SDS [Lowry *et al.*, 1951, Peterson, 1983] foi utilizado para determinação da concentração de proteínas. Como padrão foi utilizada a albumina de soro bovino, sendo a concentração de proteína estimada a partir da utilização de curva padrão e de planilha de cálculos descrita por Peterson (1983). A sensibilidade do método está na faixa de 2 a 40 µg de proteína.

2.7.3 - Determinação do grau de esterificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises dos ensaios de esterificação foram realizadas por sistema CLAE Waters binário, com detector de UV a 254 nm, utilizando colunas ODS 35 x 150 mm, 5Å. Como fase móvel foi utilizada a mistura metanol/água destilada 70:30, sendo a taxa de fluxo 0,5 mL/min.

2.7.4 - Determinação do excesso enantiomérico (ee)

As análises do excesso enantiomérico do éster não reagido foram realizadas por sistema CLAE Waters binário, com detector de UV a 254 nm, utilizando coluna quiral Chrom Tech Ltd AGP - 150 x 4mm. A mistura metanol/água destilada (0,1% ácido acético) 45:55 foi utilizada como fase móvel, com a taxa de fluxo igual a 0,5 mL/min.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Esterificação do Ácido Mandélico

Inicialmente serão apresentados os resultados dos experimentos utilizados para o estabelecimento das condições de reação, onde foram variados: substrato, solvente e preparação enzimática, e ainda tempo de reação e temperatura do ensaio.

1.1 - Reações de Esterificação

De acordo com o plano de trabalho original, pretendia-se realizar a resolução de enantiômeros do ácido mandélico através de reações de esterificação. Desta forma, em uma primeira etapa, foram realizadas reações utilizando como substratos: ácido mandélico 35mM e etanol 175 mM, tendo como biocatalisador uma lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®). Os fatores variáveis foram a concentração de enzima, o tempo de reação e a hidrofobicidade do solvente. No entanto, nas análises realizadas por CLAE nenhum produto foi observado.

Algumas possíveis explicações para o insucesso destas reações podem ser obtidas a partir dos estudos realizados por Hari-Krishna e colaboradores [2000; 2001]. Estes pesquisadores avaliaram as condições para otimização da produção de acetato de isoamila catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®) imobilizada, utilizando como substratos o álcool isoamílico e ácido acético em concentrações equimolares. Eles também reportaram que outros autores haviam observado o efeito inibitório de ácidos e álcoois de cadeia pequena sobre a enzima. Portanto, o etanol, por ser um álcool de cadeia pequena, poderia ter provocado a inibição da enzima nas condições de reação por nós utilizadas. Apesar disto, Hari-Krishna e colaboradores [2000; 2001] consideram que substratos de cadeia curta podem ser utilizados com sucesso em reações de esterificação desde que a composição do meio reacional seja adequadamente escolhida. O efeito de diversos solventes também foi

testado por Hari-Krishna e colaboradores [2001], demonstrando que os de menor polaridade deveriam ser escolhidos. Sendo assim, podemos supor que quando utilizamos clorofórmio e hexano em nossos experimentos, em princípio, estes não causariam nenhuma dificuldade já que apresentam baixa polaridade. Estes autores também avaliaram o efeito da adição de água/tampão ao meio reacional e o efeito da saturação do solvente orgânico com tampão. A adição de água/tampão ao sistema provocou uma drástica queda na esterificação, assim como causou agregação da enzima. A partir dos resultados obtidos por estes autores, podemos supor que a água produzida pela reação de esterificação, em nossos ensaios, poderia dificultar o processo. Encontrar o teor de água ideal para cada sistema não é tarefa fácil, para tal, as condições de reação já deveriam estar estabelecidas, sendo apenas otimizadas. Por outro lado, o fato de o sistema ser praticamente anidro, possivelmente não seria prejudicial às reações catalisadas pela Lipozyme®, já que esta contém aproximadamente 10% (p/p) de água e é ativa nesta condição. Em contrapartida, foi verificado por Hari-Krishna e colaboradores [2001] que o tamponamento do solvente provocou melhora no rendimento. Uma alternativa seria testar o uso de solventes tamponados no meio reacional.

Desta forma, uma nova tentativa foi feita utilizando-se os mesmos substratos (ácido mandélico e etanol) e as mesmas condições de reação, com uma lipase de *Candida rugosa* em substituição à lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®). Para evitar possíveis problemas de solubilidade dos substratos, foi utilizado como co-solvente acetonitrila 5% (v/v). Os solventes empregados foram tamponados. Foram também realizados alguns ensaios, nas mesmas condições, onde o álcool isoamílico foi utilizado em substituição ao etanol. Apesar de todas as modificações realizadas, mais uma vez não foi detectada a presença de produto através de CLAE para nenhuma das condições testadas.

Horváth e colaboradores [1998] relataram um estudo onde foi realizada a esterificação do ácido mandélico (140 mM) com álcool isoamílico (850mM), catalisada por lipase de

Candida antarctica, onde a atividade da enzima foi avaliada em função de seu grau de hidratação (mg água/mg enzima liofilizada). Buscou-se então, reproduzir os resultados obtidos por esses autores. Para tanto, foram realizados outros ensaios, utilizando os mesmos substratos, nas mesmas concentrações, e condições de reação semelhantes às descritas por Horváth e colaboradores [1998]. Foi empregado hexano, em substituição ao metilciclohexano utilizado por estes pesquisadores, e as lipases de *Pseudomonas sp.* e *Candida rugosa*. Mais uma vez, as análises por CLAE não revelaram a presença de produto.

1.2 - Reações de Transesterificação

Strauss e Faber [1999] demonstraram a esterificação do ácido mandélico (200 mM) utilizando acetato de vinila como doador de acila. Empregando um sistema enzimático duplo, o ácido (S) O-acetil mandélico foi obtido com rendimento de 80% e um excesso enantiomérico de 98%. Com base neste trabalho, foi feita uma nova tentativa com um sistema semelhante, utilizando-se os mesmos substratos, mesmas concentrações de enzima e lipases de *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.* e *Candida rugosa*. Os solventes utilizados foram heptano e éter diisopropílico. Como nos ensaios anteriores, em nenhuma das amostras analisadas por CLAE foi verificada a presença de produto.

Ebert e colaboradores [1992] testaram a ação de quinze lipases de diversas fontes, na reação de acilação do ácido mandélico sem nenhum sucesso. O resultado foi atribuído à inibição da enzima pelo ácido, além do impedimento estérico causado pelo próprio substrato (ácido mandélico). Isto poderia explicar os resultados obtidos por nós, aonde o ácido mandélico poderia estar apresentando o mesmo efeito sobre as enzimas empregadas, nas condições de reação utilizadas.

Buscando contornar esta situação, novas estratégias foram adotadas, com base nos relatos de diversos autores [EBERT *et al.*, 1992; MIYAZAWA *et al.*, 1992; MIYAZAWA *et*

al., 2000; QUEIROZ & NASCIMENTO, 2002], os quais utilizaram reações de transesterificação, onde ocorria a acilação de mandelatos com enolésteres. Miyazawa e colaboradores [2000] reportaram que alguns autores não consideram as reações de acilação aplicáveis a mandelatos, por serem álcoois secundários impedidos estericamente. Apesar disto, estes pesquisadores sugeriram que esta estratégia seria efetiva, caso a lipase e as condições do meio fossem adequadamente escolhidas. Assim sendo, eles estudaram a acilação do mandelato de metila com acetato de vinila em éter diisopropílico, catalisada por lipases de diversas fontes. A taxa de conversão e a enantioseletividade da reação variaram consideravelmente em função do grupamento éster, da lipase e do solvente utilizados.

Desta forma, nesta etapa do trabalho foram realizados dois ensaios distintos, em um dos quais foi empregada a lipase de *Rhizomucor miehei* livre e, em outro, a mesma enzima imobilizada em Phenyl-Sepharose®, nas condições descritas em Material e Métodos. Foram avaliados tempos mais longos de reação, e a temperatura foi de 25°C para a enzima livre e de 37°C para a imobilizada. O mandelato de etila foi usado em substituição ao mandelato de metila, em ambas as situações. Além do éter diisopropílico, hexano também foi utilizado como solvente nas reações com a enzima imobilizada. Análises por cromatografia em camada fina foram realizadas e, uma vez mais, não houve aparecimento de produto em nenhuma das amostras avaliadas.

1.3 - Reações de Hidrólise

Inicialmente nosso trabalho teve como objetivo a resolução enzimática do ácido mandélico. Como já abordado anteriormente, esta resolução pode ser alcançada através de reações de esterificação em meios orgânicos, assim como por hidrólise em soluções aquosas. Em nosso estudo novas estratégias foram buscadas, em função da falta de êxito utilizando-se as reações de esterificação. Com isto, foram realizados ensaios de hidrólise baseados nos

experimentos de Palomo e colaboradores [2002], em substituição aos de esterificação. As reações foram conduzidas em titulador automático, com pH controlado em 7,0, a 37°C, e acompanhadas durante 10 horas. O meio reacional continha mandelato de etila 20 mM, em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0, sendo empregada a lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®) imobilizada (61U), e o produto formado quantificado através do consumo de hidróxido de sódio durante o curso da reação. A conversão do mandelato de etila em ácido mandélico alcançou 94,6% até 10 horas de reação. Estes ensaios serviram de base para os demais experimentos, passando-se a estudar então a hidrólise do mandelato de etila catalisada por lipases.

2 - Hidrólise de mandelato de etila

Existem vários trabalhos publicados onde foi reportada a utilização de lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos. A maioria destes refere-se a sistemas anidros, onde não são comparados à utilização da enzima livre e nem mesmo a outros derivados imobilizados [BASTIDA *et al.*, 1998].

Serão apresentados a seguir os resultados obtidos nas reações de hidrólise do mandelato de etila. Os percentuais de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico foram avaliados em função de diferentes concentrações de enzima (1U, 9U, 22U e 54U), nos tempos de 3, 4, 5 e 7 horas. Da mesma forma, foi observada a utilização de lipase imobilizada em suportes de diferentes hidrofobicidades (Octyl-Sepharose® e Phenyl-Sepharose®) e comparadas à enzima livre.

A Tabela II apresenta os percentuais de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico e etanol, em intervalos de tempo pré-estabelecidos.

Tabela II: Percentual de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico utilizando as diferentes preparações enzimáticas, em diferentes concentrações.

Tempo	Conversão (%)											
	Lipo-OS				Lipo-PS				Lipo Livre			
	1U	9U	22U	54U	1U	9U	22U	54U	1U	9U	22U	54U
3 h	8	11	41	61	7	10	14	15	0	0	0	15
4 h	9	26	67	78	8	13	18	30	1	1	4	36
5 h	14	41	71	78	9	15	21	47	2	3	19	66
7 h	51	52	75	78	17	19	26	53	8	17	43	71
9 h	-	-	-	-	-	-	-	-	60	43	-	-

Lipo-OS- Lipozyme® imobilizada em Octyl-Sepharose®

Lipo-PS- Lipozyme® imobilizada em Phenyl-Sepharose®

Lipo Livre- Lipozyme® não imobilizada

Os resultados obtidos permitem verificar claramente que as reações apresentaram comportamentos diferentes, em função do suporte utilizado para imobilização, da concentração do biocatalisador e do tempo de reação.

Tem sido exhaustivamente descrito que as propriedades catalíticas das lipases podem ser facilmente moduladas pelas condições de reação. Esta dependência das propriedades da enzima em função do ambiente pode ser consequência de seu complexo mecanismo de ação, que envolve mudanças conformacionais significativas na sua estrutura. Isto sugere que as lipases podem ser muito suscetíveis a interações entre sua superfície e o meio, podendo modificar o equilíbrio entre as formas aberta e fechada (Figura 4), e talvez a configuração do centro ativo [SABUQUILLO *et al.*, 1998]. Portanto, quando acompanhamos o progresso de uma reação com diferentes concentrações de enzima ao longo do tempo, as condições de reação vão se modificando, e conseqüentemente, as propriedades catalíticas da enzima também. Por outro lado, as diferentes técnicas de imobilização também podem alterar o equilíbrio entre as formas aberta e fechada, ou mesmo a conformação da enzima, com conseqüente modificação de suas propriedades catalíticas. A imobilização envolvendo áreas diferentes da enzima pode favorecer a rigidez da estrutura ou mesmo gerar um microambiente especial ao seu redor. Estes fatos podem reduzir a mobilidade da “tampa”, alterando o

formato final da forma aberta da lipase e dificultando o acesso do substrato [PALOMO *et al.*, 2002]. Quando são utilizados suportes de graus de hidrofobicidade distintos, diferentes formas de lipase são adsorvidas de maneira menos ou mais intensa, gerando efeitos catalíticos distintos [SABUQUILLO *et al.*, 1998; BASTIDA *et al.*, 1998].

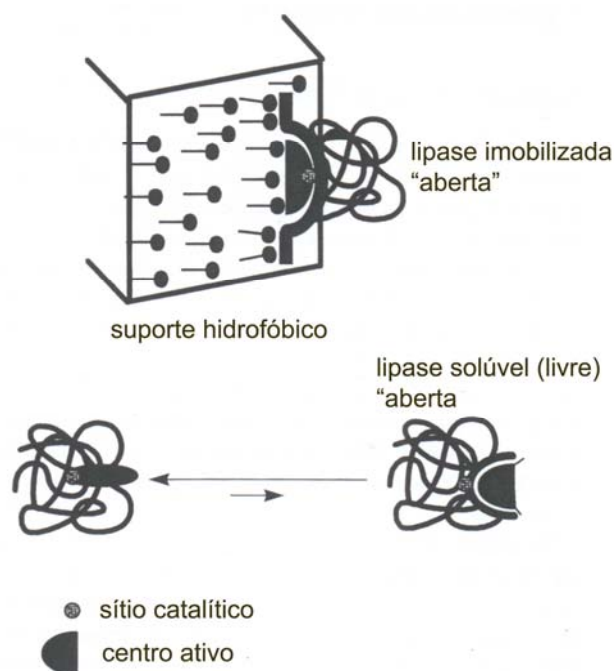


Figura 4 – Lipase na forma “aberta” immobilizada em suporte hidrofóbico. Equilíbrio entre formas “fechada” e “aberta” de lipase solúvel (livre) (adaptado de BASTIDA *et al.*, 1998).

Passaremos a analisar os resultados obtidos nas reações utilizando a enzima livre (Lipozyme® - **Lipo livre**). Observa-se, no Gráfico 1, que no início da reação houve uma adaptação da enzima ao meio reacional, possivelmente devido a uma menor interação com o substrato. Com o passar do tempo, uma alteração no meio reacional favoreceu uma maior

interação enzima-substrato, promovendo a ativação interfacial da enzima. Quanto maior a concentração da enzima utilizada, mais rapidamente se deu a ativação, devido a um maior número de centros ativos disponíveis.

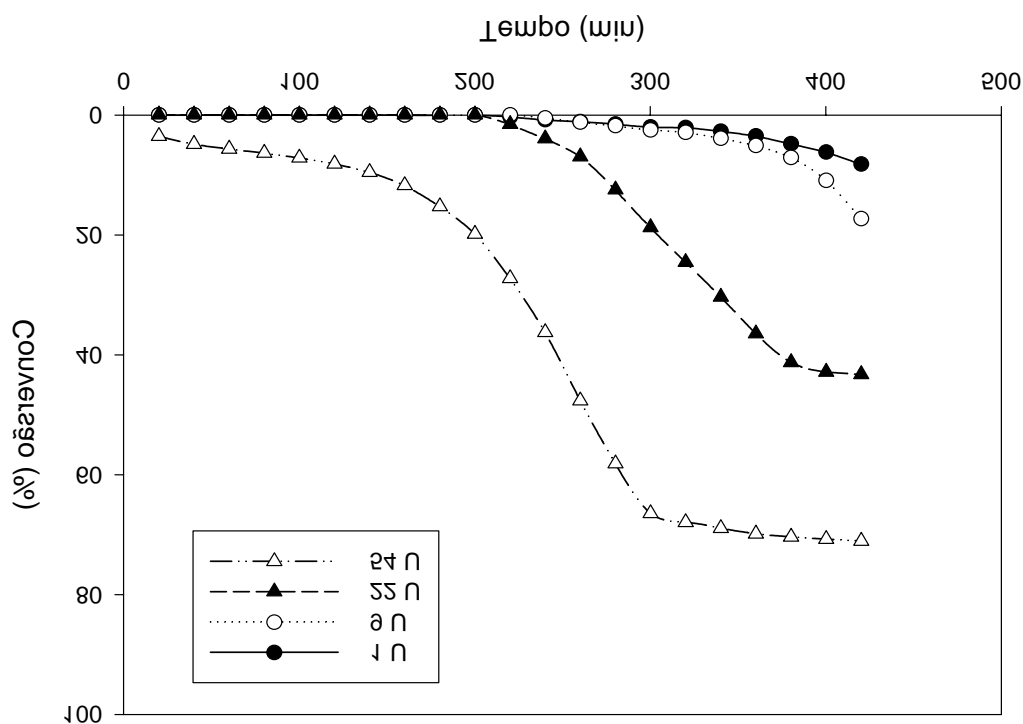


Gráfico 1 – Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme® livre (**Lipo livre**), em diferentes concentrações.

Pela análise do Gráfico 1, também pode ser verificado que quanto maior a concentração de enzima, maior foi a conversão de substrato em produto, até 7 horas de reação. Por outro lado, quando analisamos a Tabela II, percebemos que a produção do ácido mandélico obtida com 1U de **Lipo livre** foi bastante superior à obtida com 9U de **Lipo livre**,

quando se atingiu 9 horas de reação. Comparativamente, verificou-se ainda um comportamento distinto entre as reações em que foram utilizadas concentrações mais baixas (1U e 9U) e as realizadas com concentrações mais altas (22U e 54U) de enzima.

Algumas lipases microbianas (entre elas a de *R.miehei*) foram estudadas por Palomo e colaboradores [2003a], que verificaram que estas enzimas demonstram a tendência de formar agregados bimoleculares (dímeros). Estes autores reportaram que outros pesquisadores já haviam observado a presença de dímeros de lipases por estudos com raios X, tendo sido demonstrado que estas enzimas podiam se cristalizar como dímeros na conformação aberta, expondo a área hidrofóbica ao redor do sítio ativo em estreita relação com outra molécula de lipase; Palomo e colaboradores [2003a], por sua vez, demonstraram que este fenômeno também podia ocorrer em solução. Foi observado ainda que o aumento da força iônica no meio reacional elevava o percentual das formas bimoleculares, enquanto que a presença de detergentes o diminuía, sugerindo a existência de interação hidrofóbica na formação do dímero. Da mesma maneira, formas monomoleculares foram encontradas, sendo que apenas em concentrações baixas de enzima (Figura 5). Na realidade os autores observaram que, possivelmente, havia uma mistura destas estruturas, sendo que quanto maior a concentração da enzima, maior seria a proporção de dímeros. Foi relatado que esta tendência de agregação provocaria modificações na estrutura das lipases e, conseqüentemente, nas suas propriedades catalíticas. De fato, a forma dimérica poderia apresentar estabilidade, atividade ou enancioseletividade diferente da forma monomérica, em função de sua estrutura “aberta”, mas parcialmente bloqueada. Foi observado que a atividade da enzima diminuía quando sua concentração era aumentada e ainda, que a forma dimérica mostrou-se mais estável que a monomérica. Para demonstrarem o efeito da concentração de enzima na enancioseletividade, estes pesquisadores estudaram a resolução hidrolítica de alguns compostos quirais empregando lipases imobilizadas em suportes porosos. Foi verificado que quando a técnica

utilizada na imobilização permitia que houvesse variação na proporção dímero/monômero (suporte de troca iônica), notava-se variação na enancioseletividade. Já quando foram testadas lipases imobilizadas em Octyl-Sepharose® (via ativação interfacial) não houve variação na enancioseletividade para diferentes concentrações de enzima. Os autores ainda sugeriram que qualquer fenômeno que implicasse em ativação interfacial, como a ligação a suporte hidrofóbico, seria capaz de romper a forma bimolecular da lipase.

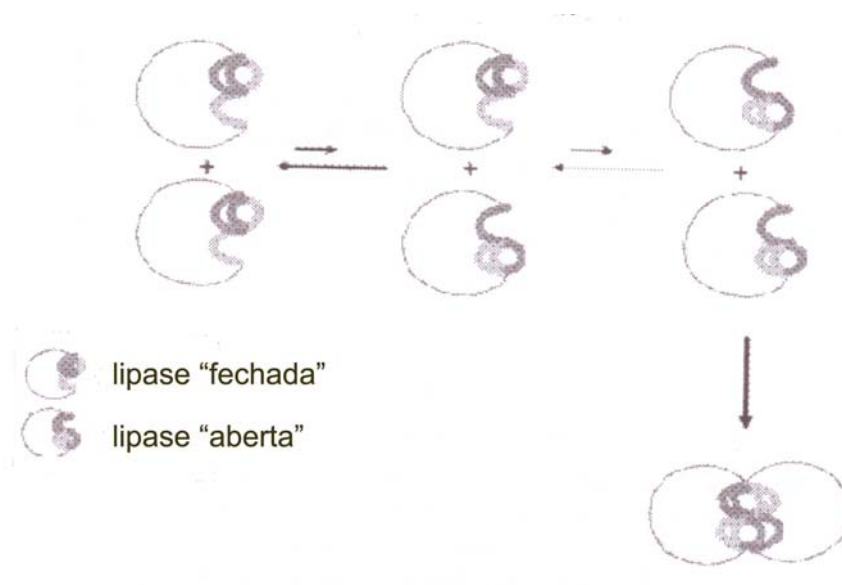


Figura 5 – Mecanismo provável de agregação das lipases (adaptado de PALOMO *et al.*, 2003).

A partir dos resultados obtidos por estes pesquisadores podemos propor que para as concentrações mais altas de lipase utilizadas (**Lipo livre 22U** e **Lipo livre 54U**) haveria quase exclusivamente a forma bimolecular. Nesta condição, a lipase mais concentrada (**Lipo livre 54U**) seria mais eficiente em função da maior formação do complexo enzima-substrato e,

conseqüentemente, da maior formação de produto. Por outro lado, para a concentração mais baixa de proteína utilizada (**Lipo livre** 1U) haveria uma mistura entre as formas monoméricas e diméricas, prevalecendo o monômero mais ativo, o que resultaria em maior formação de produto após 9 horas de reação. Já para 9U (maior concentração de proteína), a maior proporção do dímero em relação ao monômero levaria a menor quantidade de produto formado em 9 horas de reação.

A análise estatística dos resultados obtidos nos permite entender a relação entre as variáveis (tempo de reação – A e concentração da enzima - B) na hidrólise do mandelato de etila. Uma interação significativa entre dois ou mais fatores pode mascarar a importância dos efeitos principais dos fatores considerados. Por isso, foi utilizada a técnica de análise de variância (ANOVA) para dois ou mais fatores.

Foi adotado um modelo estatístico a partir dos dados do rendimento da reação em função das variáveis, em que se parte da hipótese que os valores teóricos (y') são idênticos aos valores reais (y), ou seja, $y' = y$. Para o cálculo dos coeficientes dos efeitos principais e dos coeficientes de interação entre os efeitos foi utilizado o software Design-Easy versão 5. Os coeficientes obtidos podem ser observados na Tabela III.

Em função do comportamento diferente das reações devido às diversas concentrações de enzima utilizadas, estipulou-se comparar os resultados obtidos para as duas menores (1U e 9U) e para as duas maiores (22U e 54U) concentrações, ou mesmo outras combinações, quando necessário, para os tempos de 3 e 7 horas. Da mesma forma, foi realizada uma análise dos resultados obtidos para a maior e a menor concentração (1U e 54U) de enzima utilizadas, nos mesmos tempos, para avaliar o sistema todo. De maneira geral, coeficientes com valores altos indicam uma grande influência da variável na resposta.

A análise da Tabela III corrobora algumas das conclusões provenientes da análise dos resultados da hidrólise (conversão) do mandelato de etila em diferentes concentrações de

enzima livre (Gráfico 1, Tabela II), demonstrando adicionalmente quando ocorreu interação entre os fatores. O fator F calculado deve ser maior do que o tabelado para que o efeito seja considerado significativo.

Tabela III: Coeficientes dos efeitos principais e de interação sobre a conversão de mandelato de etila em ácido mandélico, para diferentes intervalos de concentração de enzima entre 3 e 7 horas de reação.

Fator	Lipo-OS				Lipo-PS			Lipo livre			OS/PS
	1	2	3	4	1	2	4	1	2	4	
A	21,0	12,7	14,5	15,0	4,7	12,5	12,0	6,2	24,7	16,0	19,2
B	1,0	5,7	19,0	20,0	1,2	7,0	11,0	2,2	10,7	19,5	9,7
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5
AB	0,5	4,2	6,0	6,5	0,2	6,5	7,0	2,2	3,2	12,0	6,0
AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,2
BC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2
ABC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0
F	884	5,4	7,9	7,4	193	2,4	2,7	4,4	34,5	2,2	7,6

Lipo-OS- Lipozyme® immobilizada em Octyl-Sepharose®

Lipo-PS- Lipozyme® immobilizada em Phenyl-Sepharose®

Lipo Livre- Lipozyme® não immobilizada

A - tempo de reação; B - concentração de enzima; C - hidrofobicidade do suporte

1 - 1U/9U; 2 - 22U/54U; 3 - 9U/54U; 4 - 1U/54U

Ao analisarmos o comportamento das reações realizadas com a lipase livre (**Lipo livre**), para as maiores concentrações (22U/54U) notamos que o fator tempo de reação (A) apresenta maior influência sobre a resposta do que o fator B, o que ocorre também para as menores concentrações de lipase livre (1U/9U). É possível observar também uma modesta influência da interação entre os dois fatores (AB) nas concentrações mais altas, enquanto que

em 1U/ 9U, esta influência é da mesma magnitude daquela do fator B sozinho, reforçando assim o papel predominante do fator tempo de reação sobre a taxa de conversão.

Quando comparamos os resultados para a menor e a maior concentração de enzima (1U/54U), verificamos que o fator B também apresentou grande influência sobre a resposta, uma vez que esta faixa de concentração de enzima representa todo o conjunto analisado. Além disso, neste caso, observou-se a interação entre os dois fatores (AB). A constatação da interação reforça a importância da análise não ser realizada entre os fatores individualmente, ou seja, quando analisamos a influência do tempo de reação na formação de produto, verificamos que ela é diferente dependendo da concentração da enzima.

Os resultados obtidos nesta análise estatística também estão representados em forma de gráficos que permitem avaliar os efeitos dos fatores principais e os efeitos de interação entre os fatores para cada condição estudada.

O Gráfico 2 apresenta o percentual da probabilidade meio normal para as reações com **Lipo livre** 1U/9U e o Gráfico 3 para as reações com **Lipo livre** 22U/54U. Neste gráfico avalia-se o quanto o efeito dos fatores e de suas interações diferem da resposta média calculada. Os efeitos mais significativos encontram-se localizados na área mais à direita e mais acima do gráfico. Por outro lado, os efeitos dos fatores devem estar próximos à reta traçada para que a hipótese $y' = y$ seja considerada válida. Assim, tanto para 1U/9U, como para 22U/54U, o fator A (tempo de reação) é o que mais influencia a resposta (percentual de conversão).

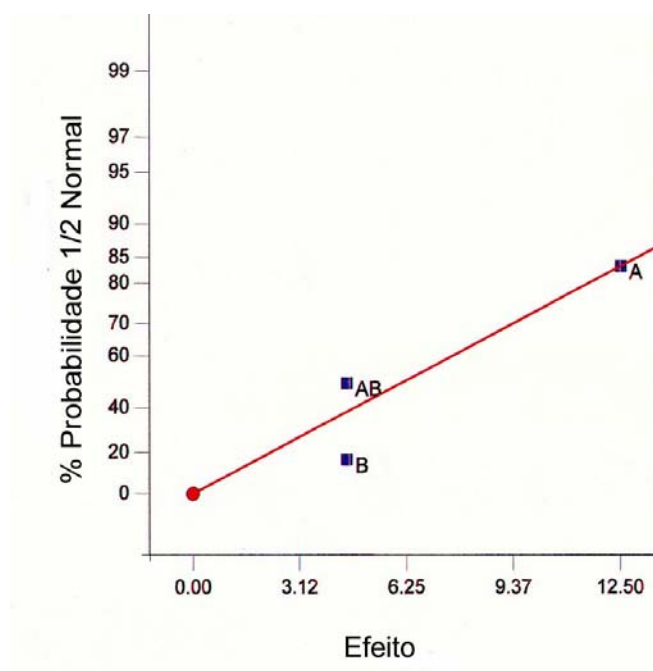


Gráfico 2- Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo livre** 1U/9U. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

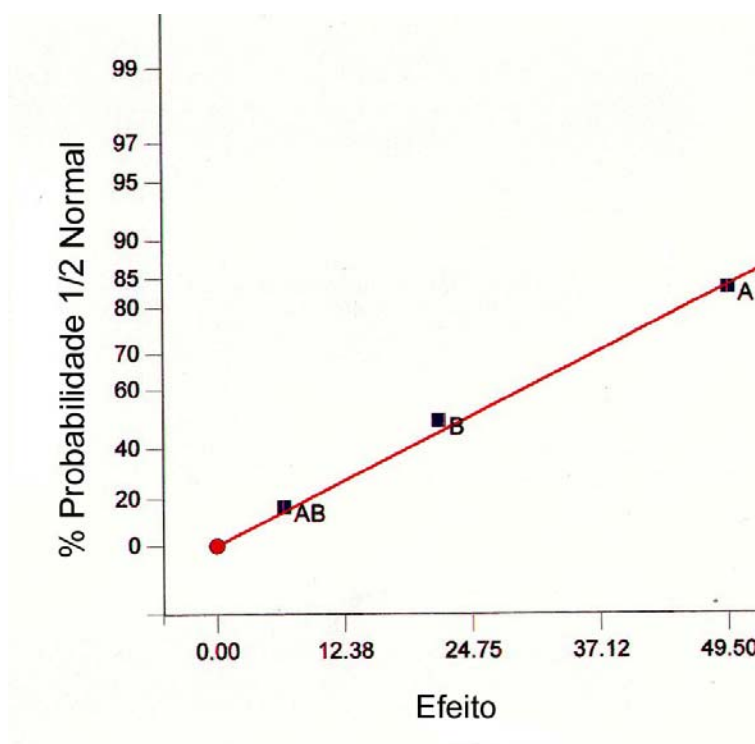


Gráfico 3 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo livre** 22U/54U. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

Os efeitos de interação entre os fatores podem ser avaliados por outro tipo de gráfico. A interação ocorre quando a mudança na resposta, causada pela alteração de um fator de um nível mais baixo para um nível mais alto, não é a mesma que a observada para os dois níveis de um segundo fator. Se o efeito do fator X depende do nível do fator Y, diz-se que houve uma interação XY. Podemos exemplificar com o gráfico referente as reações de **Lipo livre** 1U/9U (Gráfico 4). A mudança na resposta ao passarmos de um nível mais baixo de B para um nível mais alto de B, foi diferente dependendo do nível de A. Em altos níveis de A (maior tempo de reação), a alteração do nível mais baixo (menor concentração) para o mais alto (maior concentração de enzima) de B, causou um grande aumento na resposta. Em baixos níveis de A, a alteração do nível mais baixo para o mais alto de B, não apresentou grande efeito na resposta, ou seja, quando as linhas B+ e B- não estão paralelas, há interação entre A e B. Isto significa que, neste caso, quanto maior o tempo de reação, maior é a influência da concentração de enzima sobre a conversão de substrato em produto, para o intervalo considerado.

Ao avaliarmos os resultados obtidos para as reações com **Lipo livre** 22U/54U verificamos que, da mesma forma, houve interação entre os fatores, sendo que a influência de A sobre B na resposta foi menos acentuada (Gráfico 5).

Foi também realizada uma análise entre os resultados obtidos nas reações com a menor (1U) e a maior (54U) concentração de enzima, para os mesmos tempos de reação. O Gráfico 6 nos mostra que o fator B é o de maior influência, e também que o modelo não é adequado, indicando tratar-se de sistemas enzimáticos diferentes, o que corrobora nossa proposta da presença de monômeros e dímeros em diferentes proporções. Verificamos também que houve uma interação AB (Gráfico 7) e que quanto maior o tempo de reação, maior foi a influência da concentração de enzima sobre a resposta.

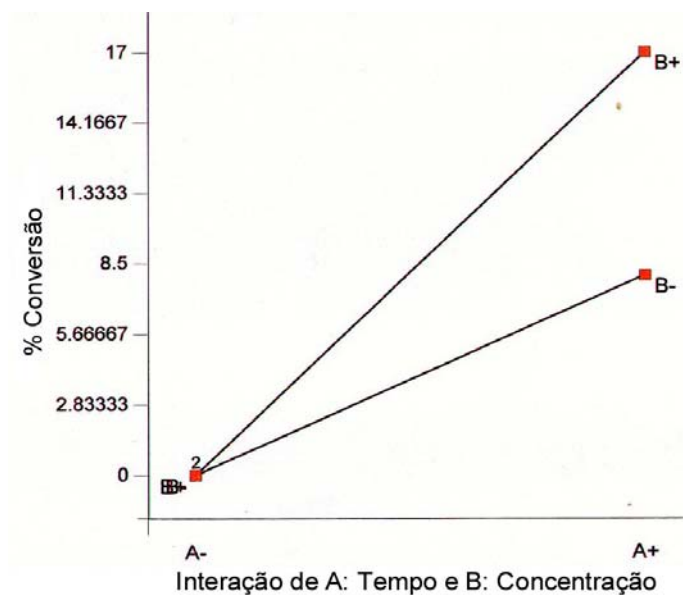


Gráfico 4 - Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da concentração de enzima (B) na conversão de substrato em produto utilizando **Lipo livre**, para reações de 3 e 7 horas, com 1 e 9U de lipase.

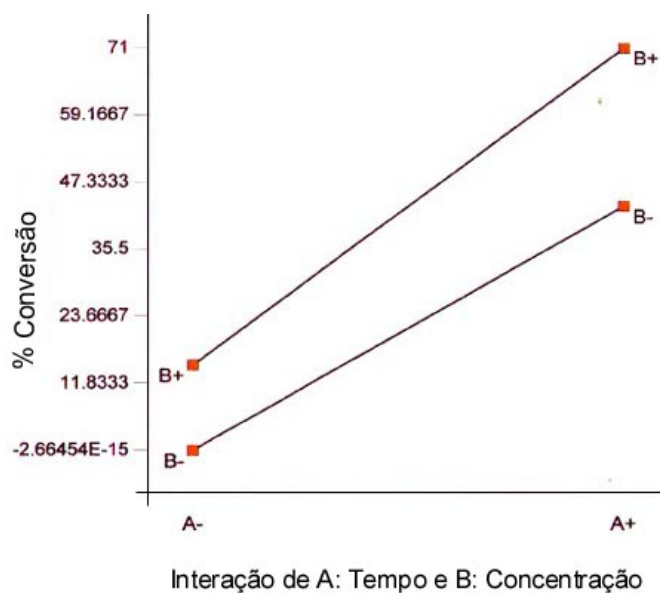


Gráfico 5 - Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da concentração de enzima (B) na conversão de substrato em produto utilizando **Lipo livre**, para reações de 3 e 7 horas, com 22 e 54U de lipase.

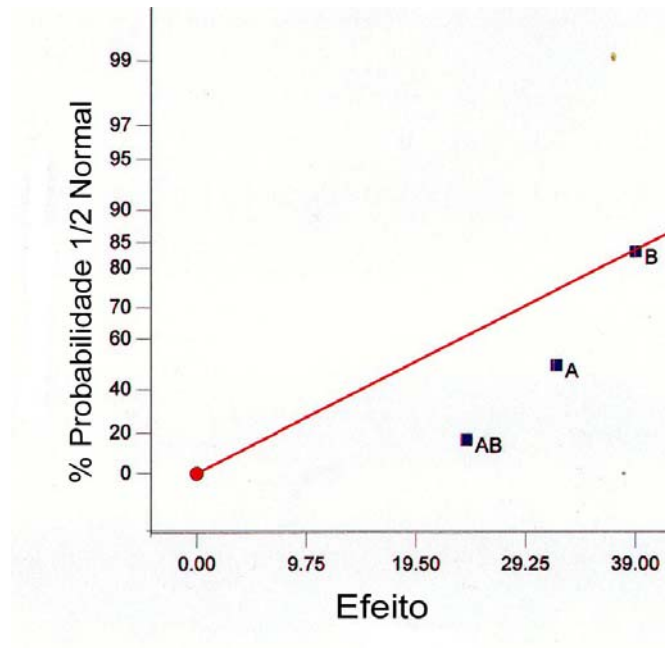


Gráfico 6 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo livre** 1U/54U. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

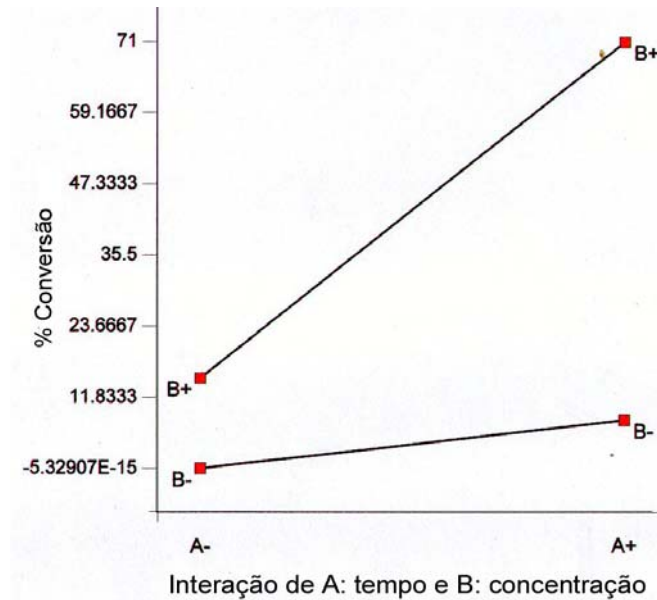


Gráfico 7 - Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da concentração de enzima (B) na conversão de substrato em produto utilizando **Lipo livre**, para reações de 3 e 7 horas, com 1 e 54U de lipase.

Os resultados obtidos para as reações com as preparações enzimáticas imobilizadas foram avaliados através das curvas de progresso de reação (conversão de mandelato de etila em ácido mandélico), da mesma forma que para a lipase livre.

Para as reações catalisadas pela lipase imobilizada em Octyl-Sepharose® (**Lipo-OS**) (Gráfico 8) foi observado um comportamento de certa forma semelhante aos das reações com **Lipo livre** (Gráfico 1). Verificou-se, do mesmo modo, que no início da reação houve uma menor interação enzima-substrato, sendo esta posteriormente favorecida por alguma alteração do meio reacional. Pode ser observado também que, quanto maior a concentração da enzima utilizada, mais rapidamente se deu a ativação e maior foi a conversão de substrato em produto, em 7 horas de reação.

Para as reações catalisadas pela enzima imobilizada em Phenyl-Sepharose® (**Lipo-PS**, Gráfico 9) foi observado também que quanto maior a concentração de enzima, maior foi a conversão de substrato em produto, em 7 horas de reação. No entanto, este aumento não foi muito expressivo para as menores concentrações de enzima (1U, 9U e 22U). O resultado sugere a necessidade da utilização de concentrações mais altas de enzima para que a ativação possa ser observada neste intervalo de tempo e, conseqüentemente, para a obtenção de conversões expressivas de mandelato de etila.

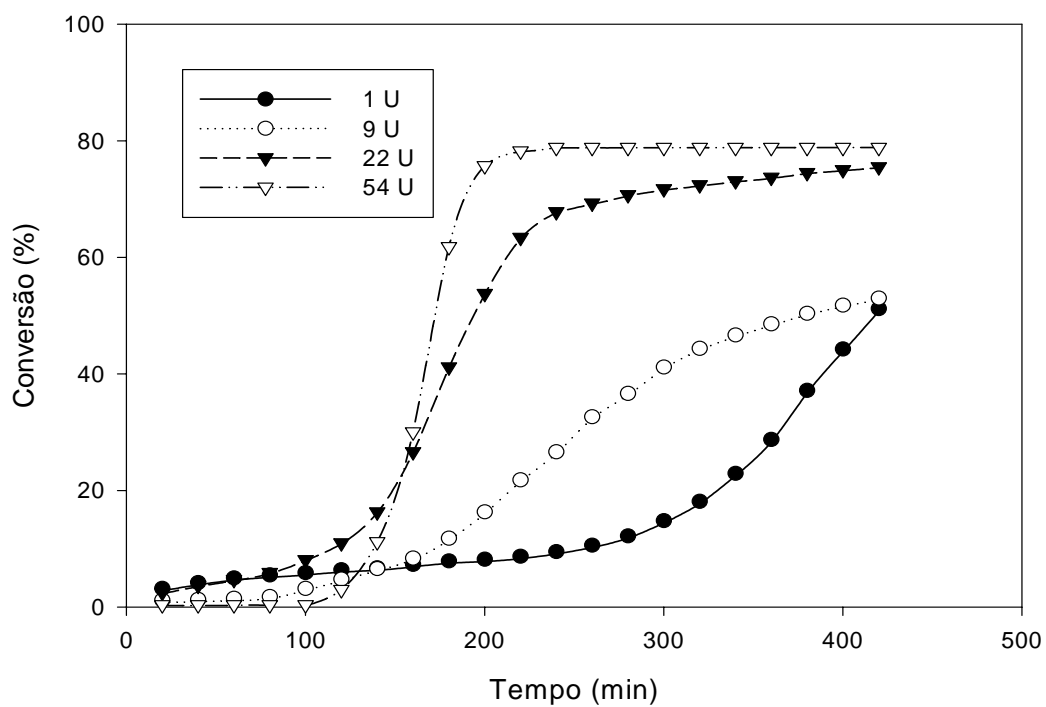


Gráfico 8 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* immobilizada em Octyl-Sepharose® (**Lipo-OS**), em diferentes concentrações.

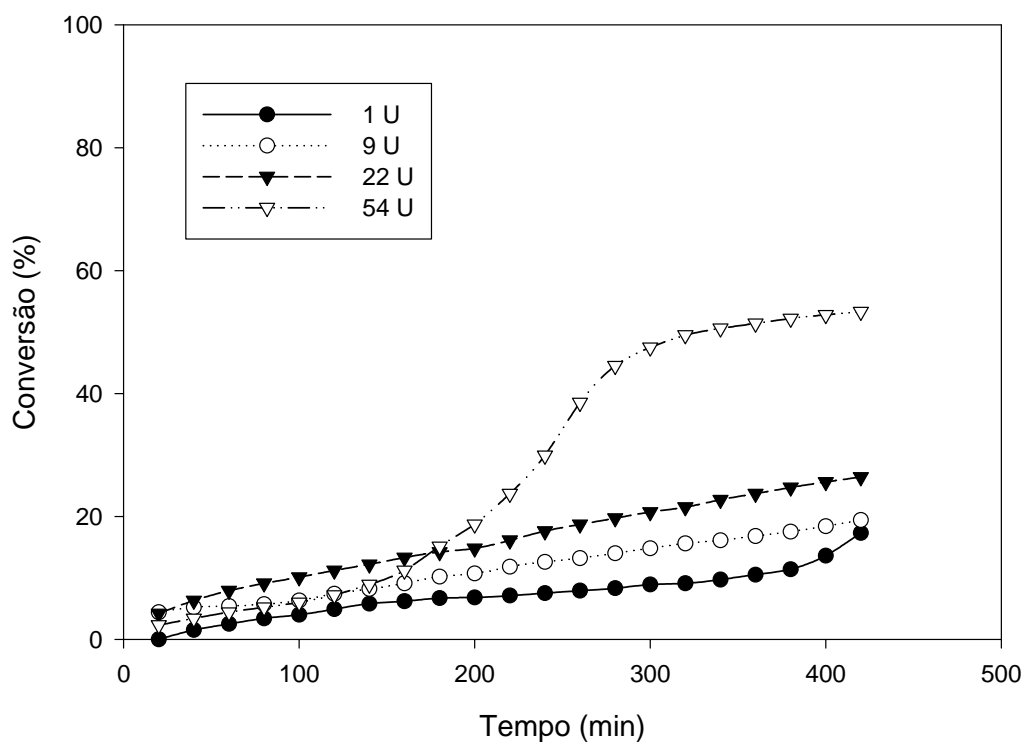


Gráfico 9 – Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* immobilizada em Phenyl-Sepharose® (**Lipo-PS**), em diferentes concentrações.

Segundo Palomo e colaboradores [2003a] apenas as formas monoméricas das lipases se ligariam aos suportes hidrofóbicos. Sendo assim, os resultados obtidos com a variação da concentração para a **Lipo-OS** e para a **Lipo-PS** não devem ser decorrentes de diferentes proporções de formas diméricas e monoméricas da enzima.

Os resultados da análise estatística resumidas na Tabela III, mais uma vez, corroboram algumas das conclusões obtidas anteriormente. Ao analisarmos os dados obtidos para as reações realizadas com **Lipo-OS** e **Lipo-PS**, tanto para as concentrações de 1U/9U quanto para as de 22U/54U de enzima, notamos que o fator tempo de reação (A) apresentou maior influência sobre a resposta do que o fator concentração de enzima (B).

Para auxiliar a compreensão dos resultados, os dados obtidos nesta análise estatística também estão representados em forma de gráfico. Ao avaliarmos os resultados obtidos nas reações com **Lipo-OS** 1U/9U, podemos perceber que o modelo proposto não é adequado, uma vez que o efeito do fator A se encontra afastado da reta (Gráfico 10). Esta inadequação do modelo se deve, provavelmente, à diferença de comportamento da enzima em cada uma destas concentrações. Se observarmos o Gráfico 8, constatamos que o perfil da reação com 9U de **Lipo-OS** é semelhante ao das reações com 22U e 54U de **Lipo-OS**, diferindo daquele observado com 1U de **Lipo-OS**. Sendo assim, procedemos a análise estatística com as reações com 9U e 54U, e o resultado obtido está representado no Gráfico 11. Através do gráfico das interações entre os fatores (Gráfico 12), podemos notar que houve interação entre o tempo de reação e a concentração de enzima, o que significa dizer que, neste caso, quanto maior o tempo de reação, menor é a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto.

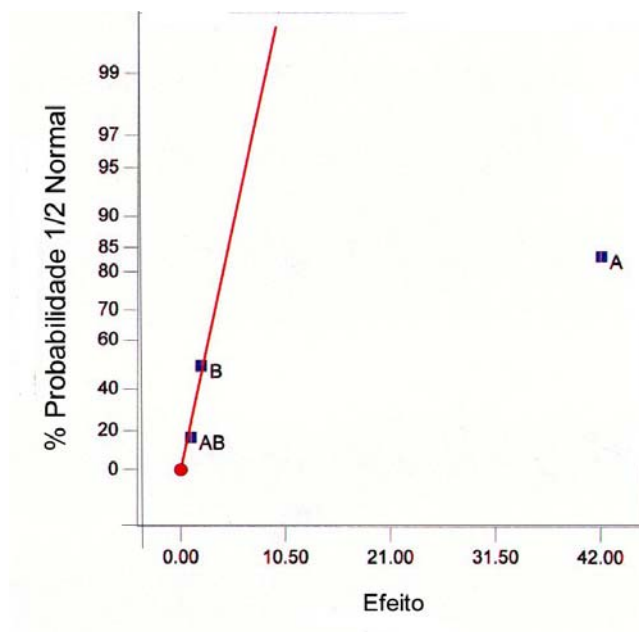


Gráfico 10 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo-OS 1U/9U**. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

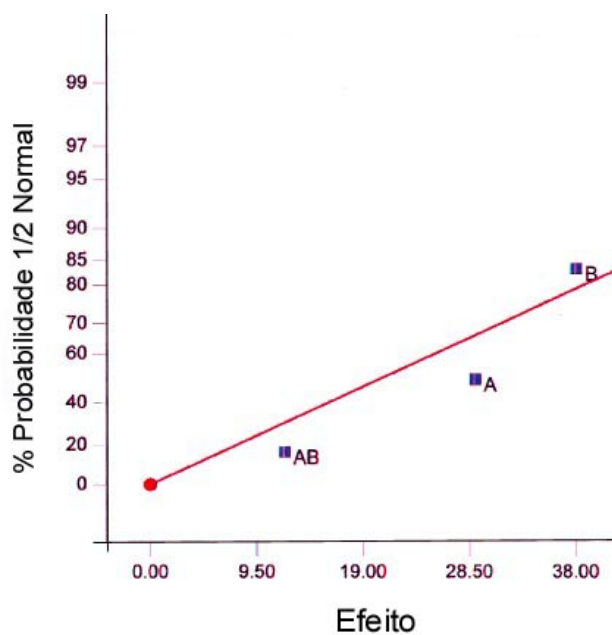


Gráfico 11 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo-OS 9U/54U**. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

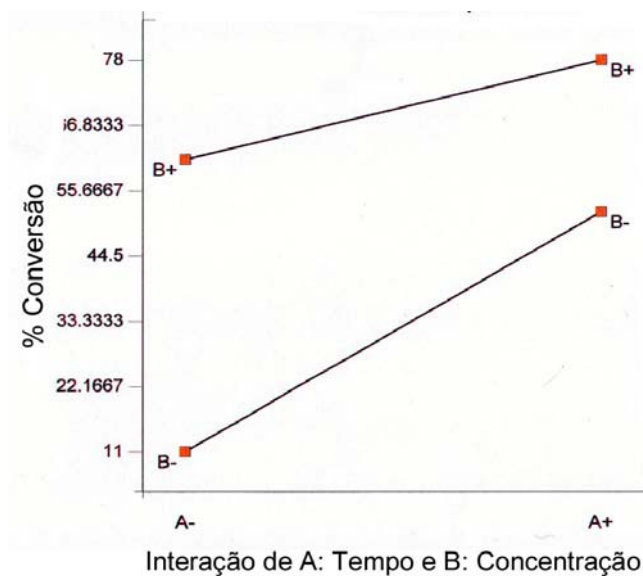


Gráfico 12 - Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da concentração de enzima (B) na conversão de substrato em produto utilizando **Lipo-OS**, para reações de 3 e 7 horas, com 9 e 54U de lipase.

Foi também realizada uma análise entre os resultados obtidos para a menor (1U) e maior (54U) concentração de enzima. Observando o Gráfico 13, é possível notar a adequação do modelo proposto, e no Gráfico 14 verifica-se que houve interação entre os fatores, e novamente quanto maior o tempo de reação, menor é a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto.

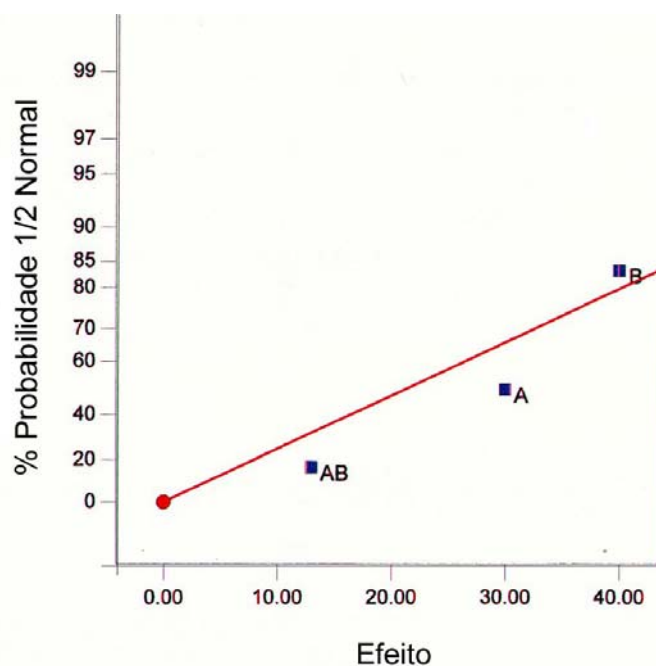


Gráfico 13 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo-OS** 1U/54U. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

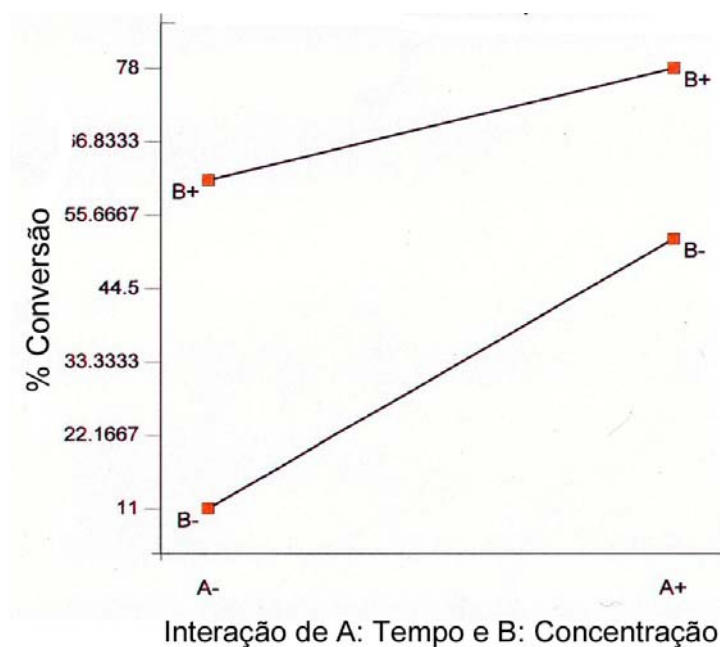


Gráfico 14 - Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da concentração de enzima (B) na conversão de substrato em produto utilizando **Lipo-OS**, para reações de 3 e 7 horas, com 1 e 54U de lipase.

Ao avaliar-se os resultados obtidos com **Lipo-PS** 1U/9U (Gráfico 15), observa-se a adequação do modelo proposto, enquanto que para **Lipo-PS** 22U/54U isto não ocorre (Gráfico 16). Uma vez que o comportamento da enzima nas concentrações 1U, 9U e 22U foi semelhante (Gráfico 9), foram analisados os dados obtidos para as reações com 1U e 22U de **Lipo-OS**. Neste caso, o modelo proposto encontra-se validado (Gráfico 17).

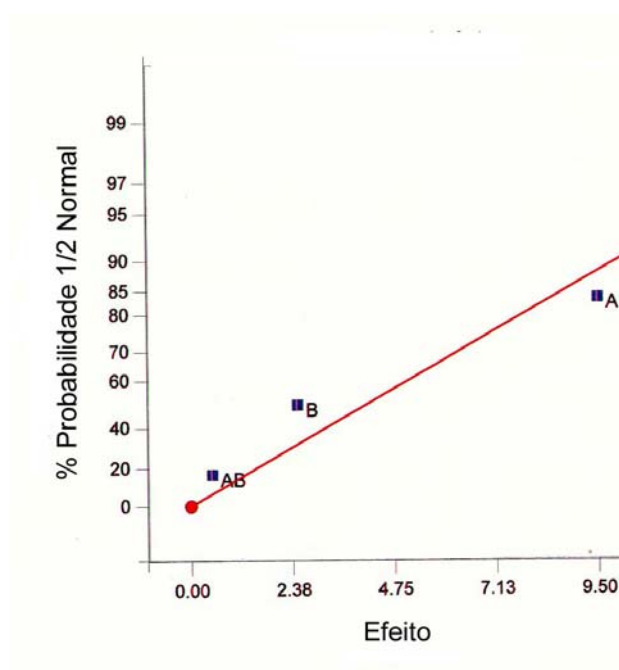


Gráfico 15 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo-PS** 1U/9U. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

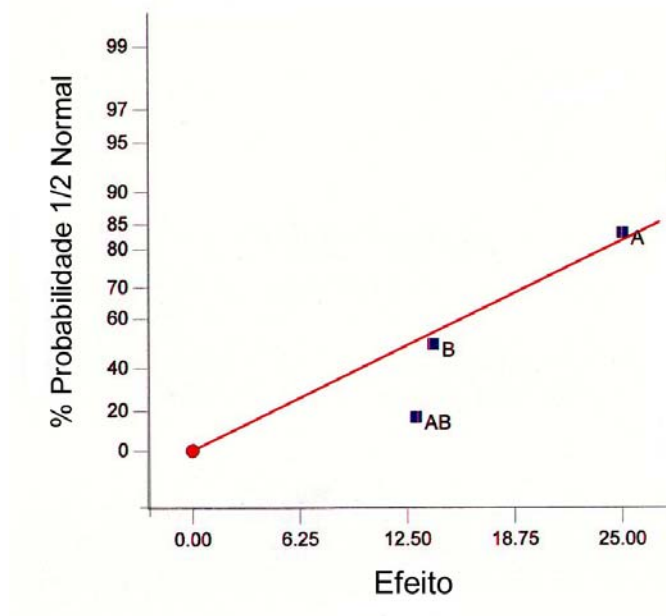


Gráfico 16 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo-PS 22U/54U**.

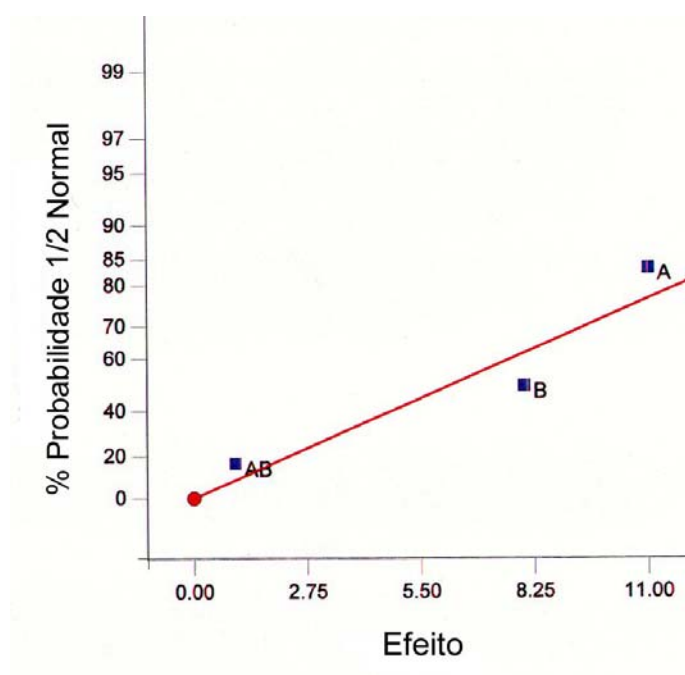


Gráfico 17 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo-PS 1U/22U**. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

O gráfico das interações para **Lipo-PS** 1U/22U nos mostra que praticamente não houve interação entre os fatores, uma vez que as retas estão quase paralelas (Gráfico 18). Isto significa dizer que, neste caso, a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto é praticamente a mesma, independentemente do tempo de reação. Quando comparamos este resultado com o obtido para **Lipo-PS** 1U/54U (Gráfico 20), percebemos um comportamento bastante diferente. Este fato se deve, provavelmente, aos resultados obtidos com a **Lipo-PS** 54U, já que o Gráfico 19 mostra uma inadequação do modelo proposto. O gráfico das interações indica que, neste caso, que quanto maior o tempo de reação, maior é a influência da concentração de enzima na conversão de substrato em produto (Gráfico 20).

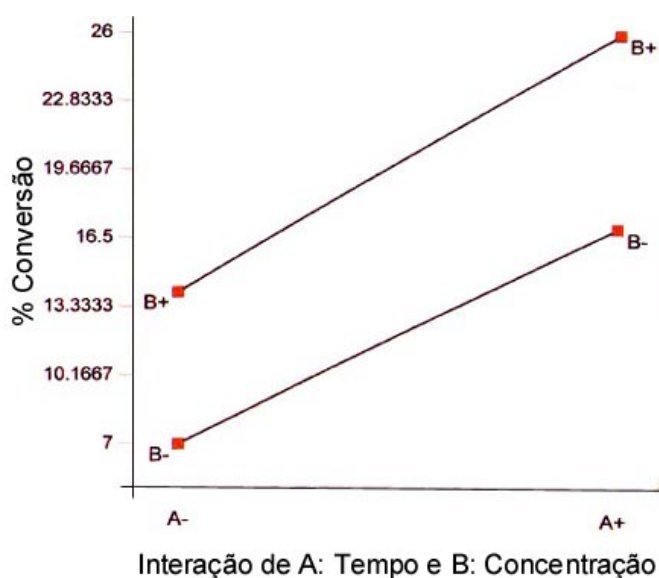


Gráfico 18 - Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da concentração de enzima (B) na conversão de substrato em produto utilizando **Lipo-PS**, para reações de 3 e 7 horas, com 1 e 22U de lipase.

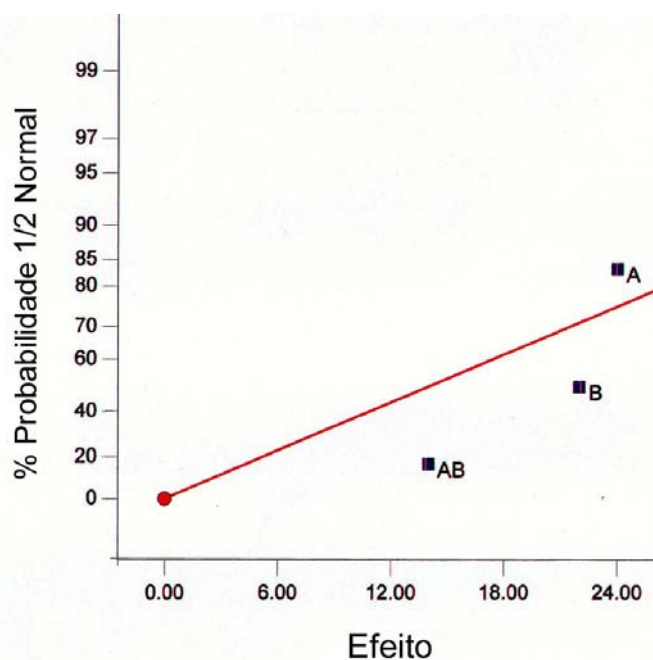


Gráfico 19 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo-PS** 1U/54U. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

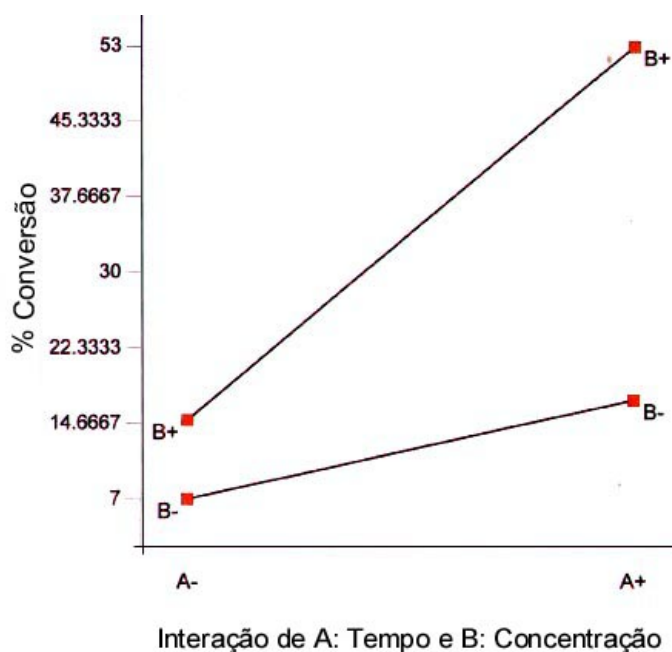


Gráfico 20 - Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da concentração de enzima (B) na conversão de substrato em produto utilizando **Lipo-PS**, para reações de 3 e 7 horas, com 1 e 54U de lipase.

Uma nova análise foi realizada comparando agora as preparações imobilizadas em função de A, B e C (tempo de reação, concentração de enzima e hidrofobicidade do suporte). Foram analisados: o menor e o maior tempo de reação (3 e 7 h), a menor e a maior concentração de enzima (1U e 54U) e os suportes menos e mais hidrofóbicos (**Lipo-PS** e **Lipo-OS**). Observa-se uma adequação do modelo proposto (Gráfico 21) e também que praticamente não houve interação entre B e C (Gráfico 22), ou seja, a influência da hidrofobicidade do suporte na conversão de substrato em produto é praticamente independente da concentração de enzima. Por outro lado, observou-se a existência das interações AC e AB. Pode-se perceber, portanto, que quanto maior o tempo de reação, maior é a influência da hidrofobicidade do suporte (Gráfico 23) e da concentração de enzima (Gráfico 24) na conversão de substrato em produto.

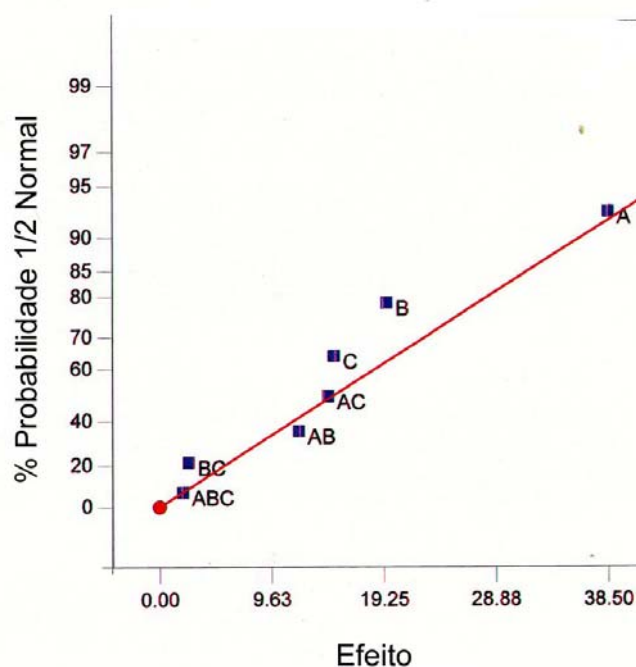


Gráfico 21 - Medida do efeito dos fatores principais e de interação em relação à resposta média calculada para as reações com a **Lipo-OS** e **Lipo-PS** 1U/54U. **A**- tempo de reação; **B**- concentração da enzima; **AB**- interação entre A e B.

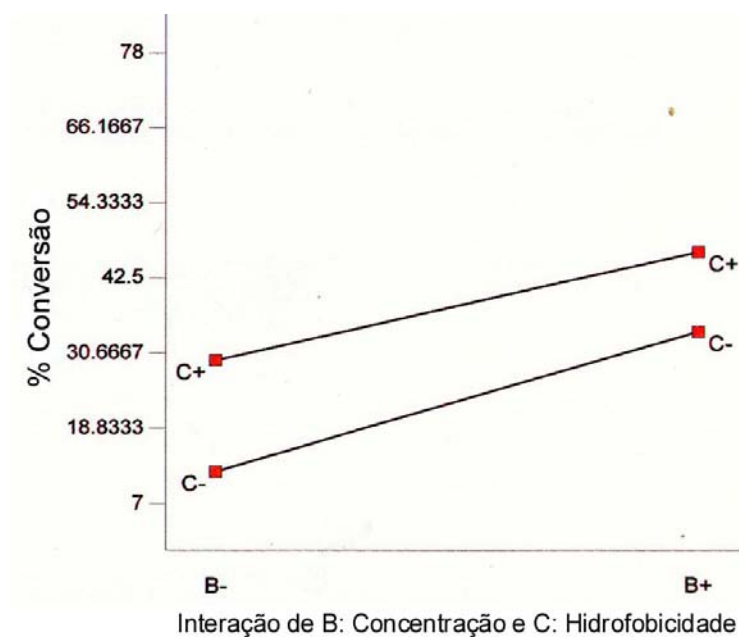


Gráfico 22 - Efeito da concentração de enzima (B) sobre a influência da hidrofobicidade do suporte (C) na conversão de substrato em produto, para reações de 3 e 7 horas, com 1 e 54U de lipase.

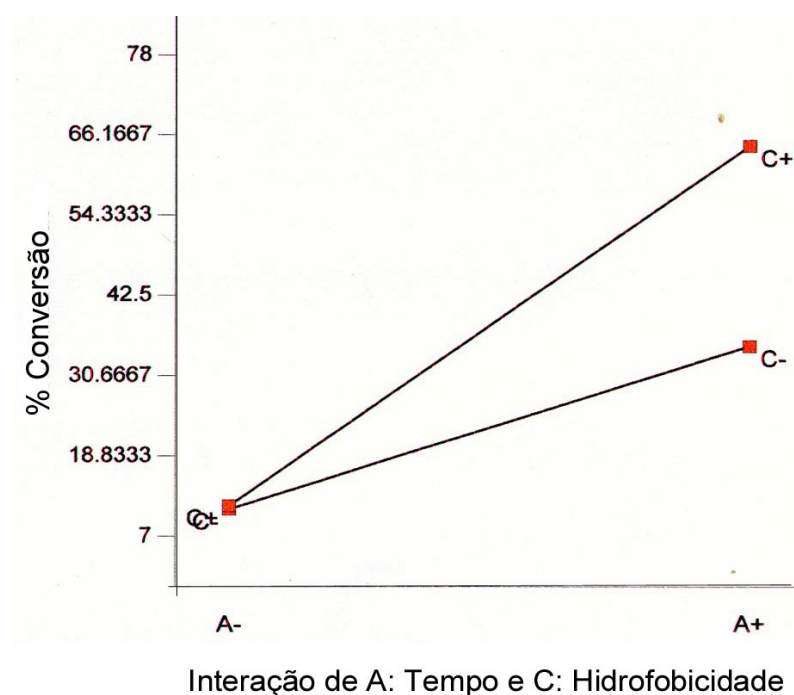


Gráfico 23 - Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da hidrofobicidade do suporte (C) na conversão de substrato em produto, para reações de 3 e 7 horas, com 1 e 54U de lipase.

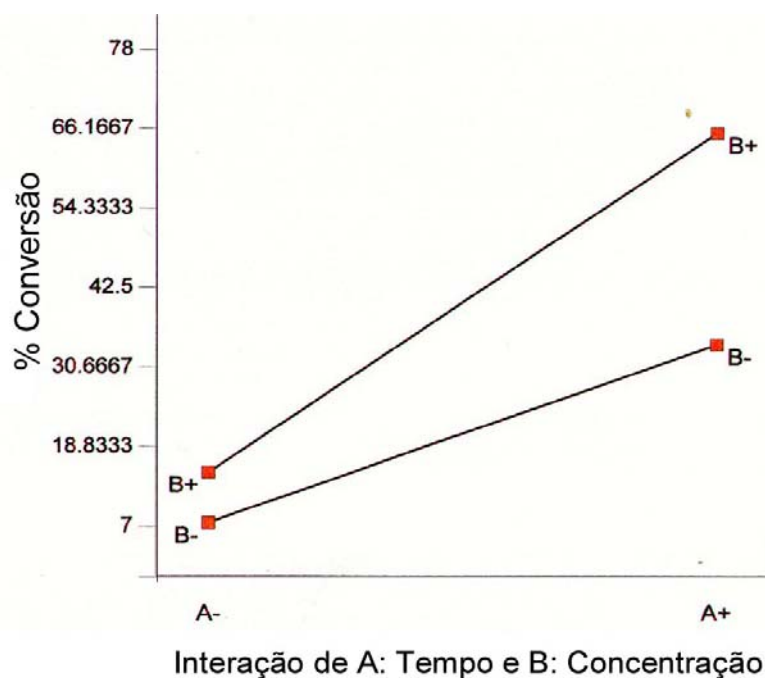


Gráfico 24 – Efeito do tempo de reação (A) sobre a influência da concentração de enzima (B) na conversão de substrato em produto, para reações de 3 e 7 horas, com 1 e 54U de lipase.

A análise comparativa dos gráficos correspondentes a cada concentração de enzima utilizada (Gráficos 25, 26, 27 e 28) indica que o catalisador imobilizado no suporte mais hidrofóbico (**Lipo-OS**), apresentou maior eficiência de conversão de substrato em produto, para todas as concentrações empregadas. Por outro lado, a enzima imobilizada no suporte menos hidrofóbico (**Lipo-PS**), apresentou menor eficiência que a anterior, em todas as condições.

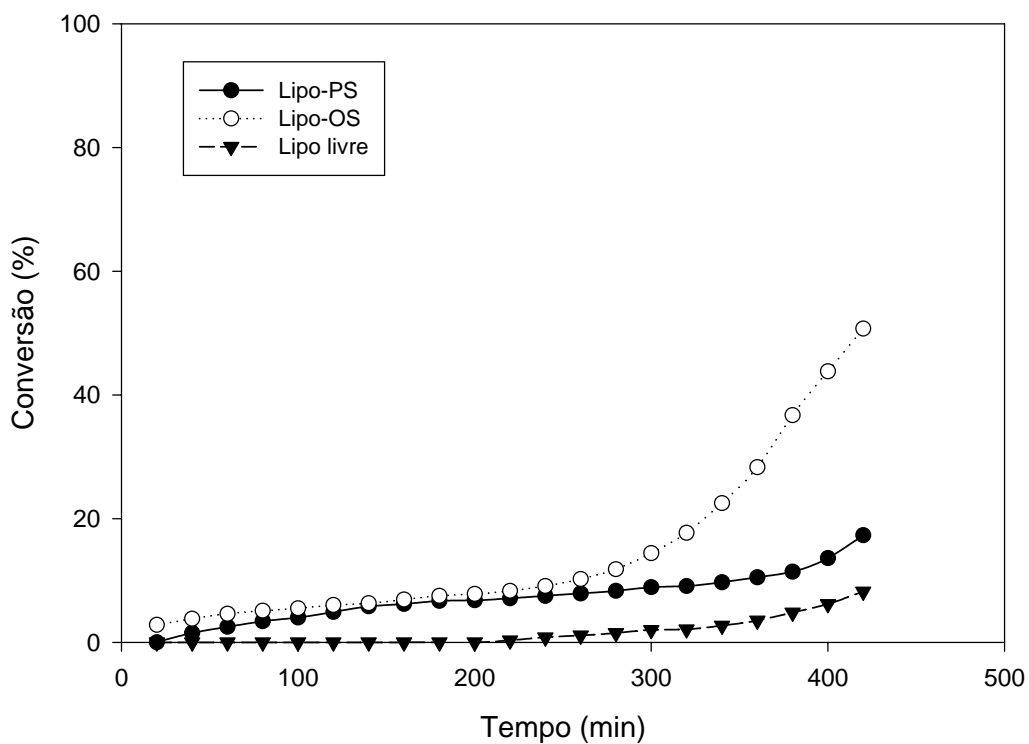


Gráfico 25 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com diferentes preparações de lipase de *Rhizomucor miehei* (**Lipo livre**, **Lipo-OS** e **Lipo-PS**). Foi utilizada 1U de atividade enzimática no meio reacional em cada caso.

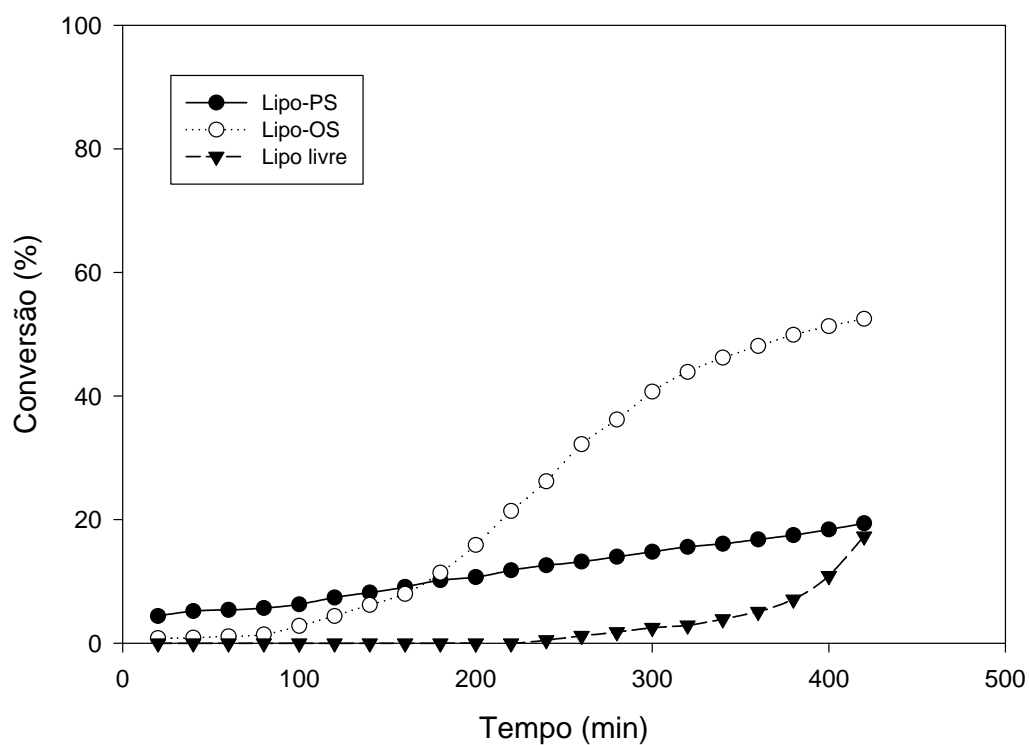


Gráfico 26 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com diferentes preparações de lipase de *Rhizomucor miehei* (**Lipo livre**, **Lipo-OS** e **Lipo-PS**). Foi utilizada 9U de atividade enzimática no meio reacional em cada caso.

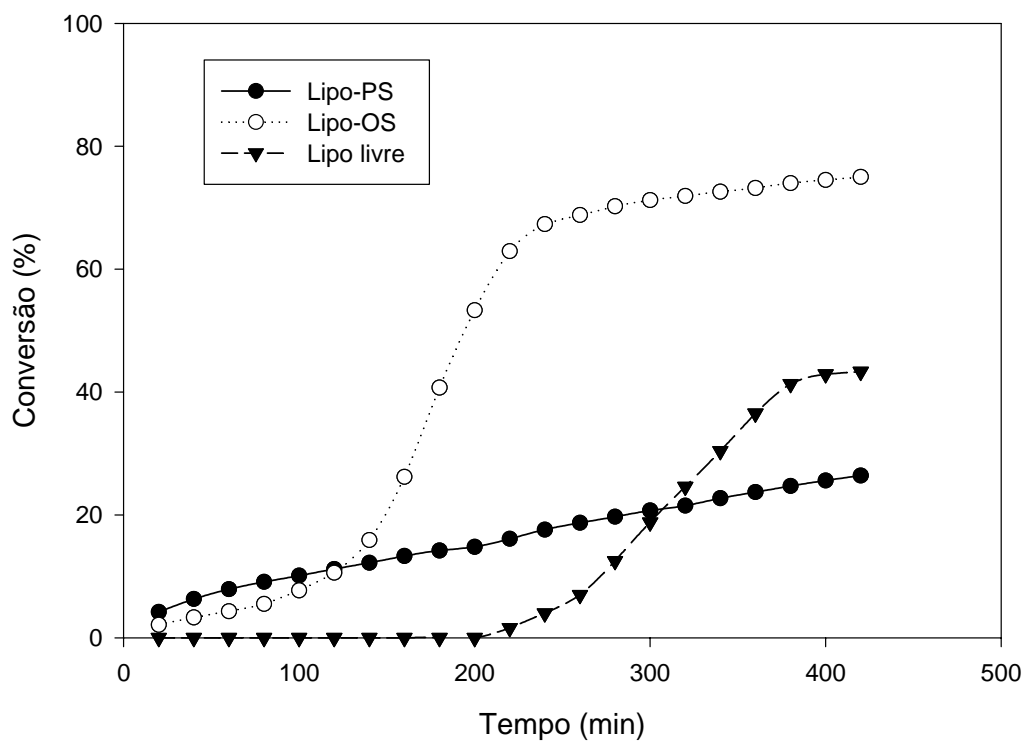


Gráfico 27 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com diferentes preparações de lipase de *Rhizomucor miehei* (**Lipo livre**, **Lipo-OS** e **Lipo-PS**). Foi utilizada 22U de atividade enzimática no meio reacional em cada caso.

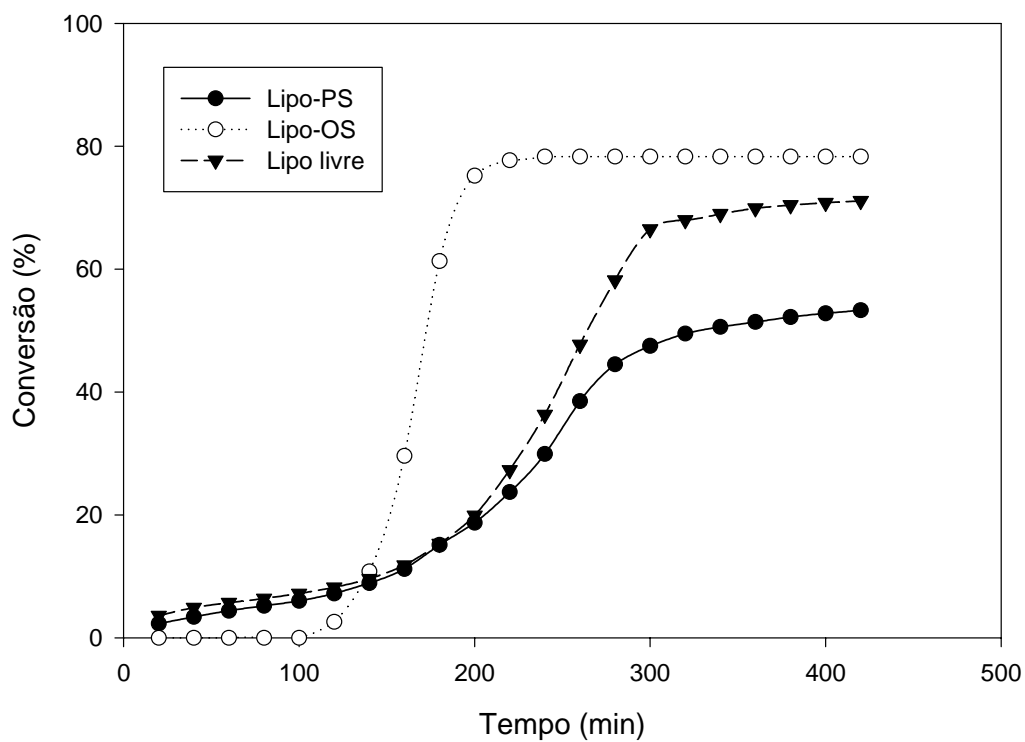


Gráfico 28 - Conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em função do tempo de reação, com diferentes preparações de lipase de *Rhizomucor miehei* (**Lipo livre**, **Lipo-OS** e **Lipo-PS**). Foi utilizada 54U de atividade enzimática no meio reacional em cada caso.

Sabuquillo e colaboradores [1998] estudaram a adsorção seletiva de preparações comerciais de lipases de *Rhizopus niveus* e *Candida rugosa* em suportes hidrofóbicos em baixa força iônica. Estas preparações enzimáticas, consideradas homogêneas por eletroforese em gel de poliacrilamida, puderam ser separadas em várias frações ativas em função da intensidade de adsorção em suportes com diferentes hidrofobicidades. Foi sugerido por estes autores que, em cada uma destas preparações, existiriam pelo menos 3 formas de lipase, com ligeiras variações estruturais, tendo sido observado que cada fração possuía propriedades bem diferentes. Dessa forma, verificou-se que pequenas variações na estrutura da enzima podem promover uma adsorção interfacial bem distinta em suportes hidrofóbicos, assim como resultar em comportamento catalítico bem diferente.

Comparativamente podemos sugerir que, em nosso trabalho, quando utilizamos suportes com hidrofobicidades diferentes, estaríamos imobilizando diferentes formas de lipase, que apresentariam comportamentos catalíticos distintos. Segundo estes autores, o suporte mais hidrofóbico (OS) adsorve mais formas de lipase do que o suporte menos hidrofóbico (PS). Podemos então sugerir em função disto que **Lipo-OS** teria uma maior eficiência catalítica do que **Lipo-PS**.

Além disso, as reações com a enzima livre (**Lipo livre**) mostraram-se mais lentas do que as reações com a enzima imobilizada, independente do suporte, para as concentrações mais baixas (1U e 9U). No entanto, nas concentrações mais altas (22U e 54U), a conversão obtida ultrapassou a verificada para a lipase **Lipo-PS**. Foi possível observar que o comportamento da lipase na forma livre foi diferente das formas imobilizadas da enzima. Ao observarmos os Gráficos 25, 26 e 27, podemos perceber que a partir de determinado tempo onde as enzimas imobilizadas estão chegando próximo ao máximo de conversão, ainda se verifica um aumento de conversão nas reações com a enzima livre. Este fato não foi verificado para a menor concentração utilizada (1U) (Gráfico 24), pois o tempo de reação não

foi suficiente para que o aumento na formação do produto fosse observado. Sendo assim, nos parece que houve uma alteração no meio reacional que favoreceu a atuação da enzima livre e não da imobilizada. Mesmo assim, esta alteração não foi suficiente para que a **Lipo livre** alcançasse níveis de conversão mais altos do que a **Lipo-OS**.

Bastida e colaboradores [1998] estudaram a hidrólise de concentrações crescentes de butirato de metila por lipase de *Rhizopus niveus* livre e imobilizada em dois suportes diferentes. A partir do limite de solubilidade do substrato, o comportamento destas preparações enzimáticas se apresentou bastante diferente. Até este limite, a enzima imobilizada em Octyl-Sepharose® apresentou a atividade máxima oito vezes maior do que a forma livre, demonstrando hiperativação, enquanto que, a enzima imobilizada covalentemente mostrou um comportamento similar ao da forma livre, apresentando atividade catalítica ligeiramente menor. Acima do limite de solubilidade do substrato, a enzima livre mostrou uma intensa ativação interfacial, enquanto que os derivados imobilizados permaneceram com a mesma atividade. Curiosamente, a maior atividade da lipase imobilizada em Octyl-Sepharose® foi bem maior (cerca de 2,5 vezes) do que a da forma livre mesmo depois da ativação interfacial promovida pelo substrato insolúvel. Analisando estes resultados, podemos supor que a possível alteração no meio reacional em nossos ensaios, que favorece a ativação da enzima livre, poderia também estar relacionada à solubilidade do substrato.

Em revisão realizada por Verger [1997], foi descrito que ésteres em solução aquosa se apresentariam sob diferentes estados de agregação, em equilíbrio entre eles. Estas se apresentariam como soluções isotrópicas em forma de monômeros (S1), micelas (S2) e monocamadas adsorvidas (S4), ou ainda como emulsão (S3) (Figura 6). Como a atividade das lipases é aumentada em presença de substratos insolúveis, este autor atribui este fato ao aumento da atividade interfacial provocada pela adsorção a este tipo de substrato. Em seu estudo verificou que em presença de cloreto de sódio (altas forças iônicas) haveria diminuição

da concentração micelar crítica (CMC), com conseqüente aumento do tamanho das micelas. Foi verificado que qualquer condição que favorecesse a formação de agregados insolúveis promoveria um aumento na catálise.

Ar

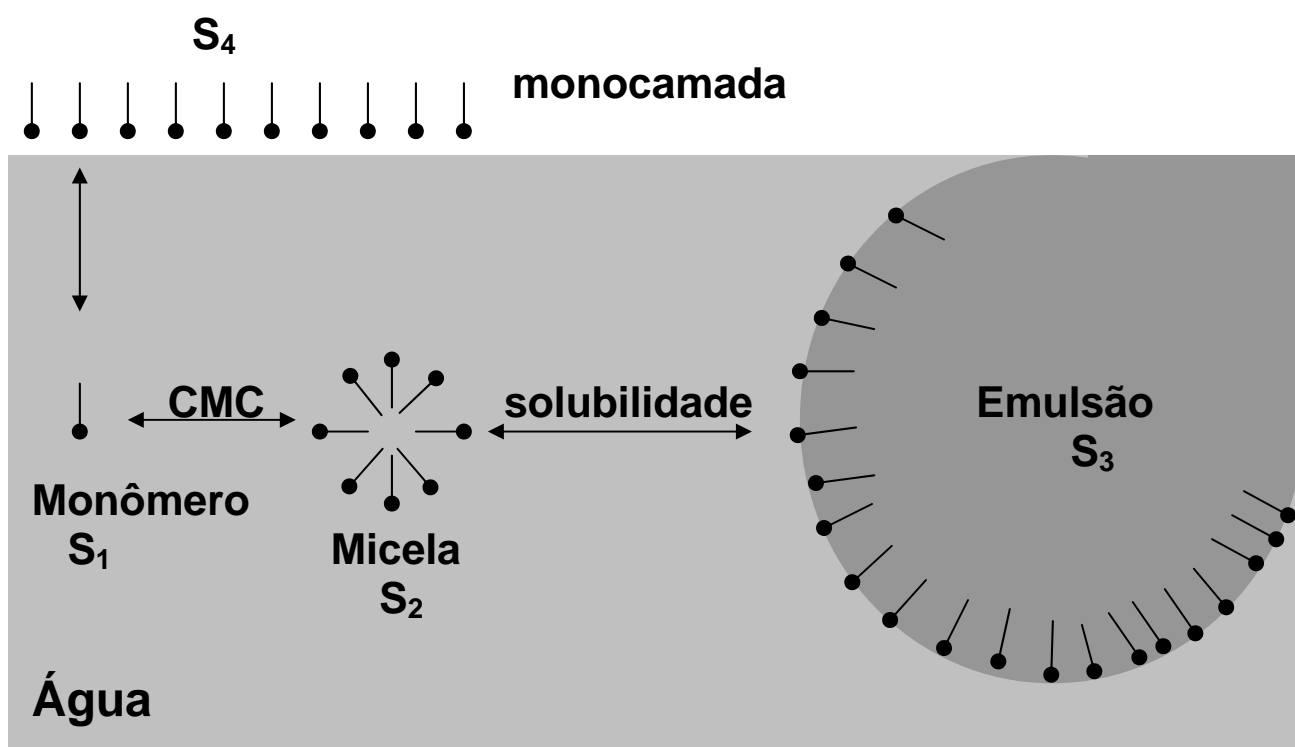


Figura 6 – Esquema dos diferentes estados físico-químicos de moléculas de éster em meio aquoso (adaptado de VERGER, 1997). Monômero (S₁), micela (S₂), emulsão (S₃) e monocamada adsorvida (S₄) coexistem em equilíbrio e representam potenciais “substratos monoméricos” (S₁) ou “super-substratos” (S₂, S₃ e S₄) de lipases. A área em cinza claro representa a solução isotrópica e a área em cinza escuro representa a emulsão turva.

Podemos sugerir que em nossos ensaios uma alteração no meio reacional pode ter provocado a diminuição da CMC, com conseqüente aumento na formação de agregados insolúveis de substrato, favorecendo a atuação da enzima livre. Por outro lado, a atuação das lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos poderia ser prejudicada nesta condição, porque

estas preparações irão atuar preferencialmente sobre substratos solúveis. Como neste caso a concentração do substrato foi mantida fixa e a concentração do produto foi a única condição variável no meio reacional, podemos propor que a formação de ácido mandélico (em forma de mandelato de sódio) possa ter provocado o surgimento de agregados insolúveis. Sendo assim, a diferença entre o comportamento das enzimas livre e imobilizadas seria explicada. Segundo Verger [1997], a “qualidade interfacial” água-lipídio torna-se um parâmetro decisivo quando enzimas lipolíticas são empregadas.

3 - Determinação do excesso enantiomérico

Foi realizada uma análise do excesso enantiomérico do éster não reagido por CLAE utilizando coluna de fase quiral. Os resultados demonstraram que a Lipozyme® não apresentou enantiosseletividade significativa em qualquer das condições de reação empregadas (Tabela IV).

Diversos autores relatam a variação ou mesmo a ausência de estereosseletividade de algumas lipases em diversos sistemas. Miyazawa e colaboradores [2000] estudaram a hidrólise do mandelato de metila utilizando diferentes lipases e verificaram que nenhuma delas apresentou enantiosseletividade alta. A temperatura do ensaio é um dos fatores que pode influenciar a enantiosseletividade das reações enzimáticas e, em geral, as enzimas exibem maior seletividade em baixas temperaturas [MIYAZAWA *et al.*, 1998]. Palomo e colaboradores [2003b] estudaram a resolução hidrolítica do ácido 2-butirol-2-fenilacético, utilizando lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*, em diferentes suportes e em diferentes condições de temperatura e pH. Os resultados demonstraram que a enantiosseletividade dependia diretamente do tipo de suporte e das condições de reação utilizados. Em revisão realizada por Reetz [2002] ainda foi destacada a influência na estereosseletividade do doador acila (reações de esterificação), de solventes orgânicos e da presença de aditivos, além da

temperatura do ensaio e da técnica utilizada na imobilização da lipase. Em nosso estudo, provavelmente a escolha destes fatores não foi a mais adequada no que se refere a enancioseletividade da enzima. Possivelmente, a temperatura utilizada no ensaio (37°C) pode ter sido a condição mais desfavorável, levando-se em consideração que na maioria dos estudos de enancioseletividade são empregadas temperaturas iguais ou inferiores a 25°C [SABUQUILO *et al.*, 1998; MIYAZAWA *et al.*, 1999; MIYAZAWA *et al.*, 2001; QUEIROZ & NASCIMENTO, 2002]. No entanto, não se pode descartar a influência dos outros fatores mencionados anteriormente.

Tabela IV: Excesso enantiomérico (ee) do mandelato de etila não reagido

Tempo	LIPO-OS				LIPO-PS				LIVRE			
	1U	9U	22U	54U	1U	9U	22U	54U	1U	9U	22U	54U
3 h	0	2	4	4	6	6	8	6	6	8	6	4
4 h	-	2	4	4	-	-	6	2	-	-	2	4
5 h	4	4	2	2	6	6	8	6	6	8	4	4
7 h	4	4	2	-	6	6	4	2	6	6	2	2

$$ee = (R-S) / (R+S) \times 100$$

Nem sempre as condições de reação ideais para se alcançar um alto grau de conversão são as mesmas para se obter produtos com elevado excesso enantiomérico [MIYAZAWA *et al.*, 1998]. Em nossos experimentos, apesar de não ter sido observada estereosseletividade na reação de hidrólise nas condições reacionais empregadas, verificamos que a taxa de conversão variou significativamente em função do suporte, da concentração de enzima e do tempo de

reação utilizados. Essa diferença no comportamento das reações pode ser avaliada através da tabela e curvas de conversão, assim como pela análise estatística que demonstrou adicionalmente a interação entre estas variáveis.

Este trabalho serve como base para a definição de alguns parâmetros relevantes a serem utilizados em futuros estudos empregando planejamento fatorial, de forma a estabelecer as melhores condições para reações de hidrólise por lipases.

V - CONCLUSÕES

No presente trabalho, algumas conclusões puderam ser obtidas através da avaliação das reações de hidrólise do mandelato de etila e da análise estatística dos resultados obtidos.

- A enzima imobilizada no suporte mais hidrofóbico (**Lipo-OS**) mostrou-se mais eficiente que as demais preparações enzimáticas na conversão do mandelato de etila em ácido mandélico.
- Quanto maior a concentração da enzima utilizada, maior foi a produção de ácido mandélico até 7 horas de reação, para todas as preparações enzimáticas.
- Nas reações com 1U de lipase livre foi alcançada maior formação de produto do que nas reações com 9U, em 9 horas de reação, sugerindo a presença de formas diméricas e monoméricas da enzima nestas preparações, predominando a forma monomérica quando se utiliza 1U de lipase.
- Quanto maior a concentração da enzima utilizada, mais rapidamente se deu a ativação.
- O tempo de reação foi o fator mais importante para todas as preparações enzimáticas.
- Houve interação entre os fatores concentração de enzima e tempo de reação, para todas as preparações enzimáticas, e, todas as concentrações utilizadas, reforçando a importância da análise não ser realizada entre os fatores individualmente.
- A atuação da enzima livre foi favorecida por uma alteração no meio reacional (provavelmente o aumento da força iônica do meio), não sendo suficiente, porém, para que fossem alcançados níveis de conversão mais altos que os obtidos com a **Lipo-OS**.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, U., ANDERSCH, P., BERGER, M., GOERGENS, U., HAASE, B., HERMANN, J., LAUMEN, K., SEEMAYER, R., WALDINGER, C. & SCHNEIDER, M. P. "Screening techniques for lipase catalyst selection". *Meth. Enzymol.* **286**: 351-386, 1997.

ALONSO, F. O. M. "Efeitos da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*". Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 139p, 2001.

AZERAD, R., BUISSON, D. "Dynamic resolution and stereoinversion of secondary alcohols by chemo-enzymatic processes". *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 565-571, 2000.

BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L & MALCATA, F. X. "Bioreactors with immobilized lipases: State of the art". *J. Enzyme Microb. Technol.* **18**: 392-416, 1996.

BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISEN, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., HUGUET, J. & GUISÁN, J. M. "A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports". *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 486-493, 1998.

BECKER, P., ABU-REESH, I., MARKOSSIAN, S., ANTRANIKIAN, G. & MARKL, H. "Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp* [HI-9] on olive oil". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 184-190, 1997.

BERGLUND P. & HUTT K. "Biocatalyst synthesis of enantiopure compounds using lipases". In: Stereoselective biocatalysis. Patel R.N. New York: Marcel Dekker, 2000.

BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J. P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L. & MENGE, U. "A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase". *Nature* **343**: 767-770, 1990.

BROCCA, S. "Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa lipI* gene coding for a major industrial lipase". *Protein Sci.* **7**: 1415-1422, 1998.

CARDENAS, F., ALVAREZ, E., CASTRO-ALVAREZ, M. S., SANCHEZ-MONTERO, J. M., VALMASEDA, M., ELSON, S. W. & SINISTERRA, J. V. "Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases". *J. Mol. Catal.* **14**: 111-126, 2001.

CARREA, G., OTTOLINA, G. & RIVA, S. "Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media" *Trends Biotechnol.* **13(2)**: 63-70, 1995.

CHADHA, A. & BASKAR, B. "Biocatalytic deracemization of α -hydroxy esters: high yield preparation of (S)-ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutanoate from the racemate". *Tetrahedron:Asymmetry* **13**: 1461-1464, 2002.

CHEN, S. J., CHENG, C. Y. & CHEN, T. L. "Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*". *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 308-312, 1998

CHEONG, C. S., IM, D. S., KIM, J. & KIM, I. O. "Lipase-catalysed resolution of primary alcohol containing quaternary chiral carbon". *Biotechnol. Lett.* **18**: 1419-1422, 1996.

CHISTI, Y. "Strategies in downstream processing". In: *Bioseparation and bioprocessing: a handbook*, vol.2. Subramanian G., 3-30. New York: Wiley-VCH, 1998.

DELLAMORA-ORTIZ, G. M., MARTINS, R. C., ROCHA W. L & DIAS, A. P. "Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media". *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**: 31-37, 1997.

EBERT, C., FERLUGA, G., GARDOSSI, L., GIANFERRARA, T. & LINDA, P. "Improved lipase-mediated resolution of mandelic acid esters by multivariate investigation of experimental factors". *Tetrahedron:Asymmetry* **3**: 903-912, 1992.

EGGERT, T., VAN POUDEROYEN, PENCREAC'H, G., DOUCHET, I., VERGER, R., DIJKSTRA B. W. & JAEGER, K. E. "Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*". *Coloids and surfaces* **26**: 37-46, 2001.

ELIBOL, M. & OZER, D. "Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*". *Process Biochem.* **36**: 325-329, 2000.

ELIEL, E. L., FISK, M. T. & PROSSER, T. "α-chlorophenylacetic acid" www.orgsyn.org 2002.

FERRATO, F., CARRIERE, F., SARDA, L. & VERGER, R. "A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation". *Meth. Enzymol.* **286**: 327-347, 1997.

FREIRE, D. M. G. "Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*". Tese de doutorado, Instituto de Química – UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. 174 pp, 1996.

GRÖGER, H. "Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α-hydroxy carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis". *Adv. Synth. Catal.* **343**: 547-588, 2001.

HARI-KRISHNA, S., DIVAKAR, S., PRAPULLA, S. G. & KARANTH, N. G. "Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*". *J. Biotechnol.* **87**: 193-201, 2001.

HARI-KRISHNA, S., MANOHAR, B., DIVAKAR, S., PRAPULLA, S. G. & KARANTH, N. G. "Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor Miehei* by response surface methodology". *Enzyme Microb. Technol.* **26**: 131-136, 2000.

- HONG, M. C. & CHANG, M. C. "Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1". *Biotechnol. Lett.* **20**: 1027-1029, 1998.
- HORVÁTH, E., GAJÁRI, J., KRISTÓF, J., RÉDEY, A. & KÓCSIS, L. "Monitoring of enzyme catalysed reactions by Fourier transform raman spectrometry". *Anal. Chim. Acta* **370**: 191-197, 1998.
- HSU, S., WU, S. & WANG, Y. "Lipase-catalysed irreversible transesterification using enol esters: xad-8 immobilized lipoprotein lipase-catalysed resolution of secondary alcohols". *Tetrahedron Lett.* **31**: 6403-6406, 1990.
- IAWASAKI, Y. & YAMANE, T. "Enzymatic synthesis of structured lipids". *J. Mol. Catal.* **10**: 129-140, 2000.
- JÄÄSKELÄINEN, S., VERMA, C. S., HUBBARD, R.E., LINKO, P. & CAVES, L. S. D. "Conformational change in the activation of lipase: An analysis in terms of low-frequency normal modes". *Protein Sci.* **7**: 1359-1367, 1998.
- JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W & REETZ, M. T. "Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological application of lipases". *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 315-351, 1999.
- JAEGER, K. E. & REETZ, M. T. "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology". *Trends Biotechnol.* **16**: 396-403, 1998.
- JENNINGS, B. H. & AKOH, C. C. "Lipase catalysed modification of fish oil to incorporate capric acid". *Food Chemistry* **72**: 273-278, 2001.
- KAMINI, N. R., MALA, J. G. S. & PUVANAKRISHNAN, R. "Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake". *Proc. Biochem.* **33**: 505-511, 1998.

KENNEDY, J. F. & ROIG, M. G. "Principles of immobilization of enzymes". In: Handbook of enzyme biotechnology. 2nd ed. Alan Wiseman, 235-310, 1995.

KIRK, O., BORCHET, T V. & FUGLSANG, C. C. "Industrial enzyme applications" *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 345-351, 2002.

KLIBANOV, A. M. "Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents". *Acc. Chem. Res.* **23**: 114-20, 1990.

KLIBANOV, A. M. "Why are enzymes less active in organic solvents than in water?" *Trends Biotechnol.* **15**: 97-101, 1997.

KURITA-WATER. Patente japonesa n°. 06246295, 1994.

LALONDE, J. J., NAVIA, M. A. & MARGOLIN, A. L. "Cross-linked enzyme crystals of lipases as catalyst for kinetic resolution of acids and alcohols". *Meth. Enzymol.* **286**: 443-464, 1997.

LANG, D. A., MANNESSE, M. L. M., DE HAAS, G. H., VERHEIJ, H. M. & DIJKSTRA, B. W. "Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase". *Eur. J. Biochem.* **254**: 333-340, 1998.

LAWSON, D. M., BRZOZOWSKI, A. M., DODSON, G. G., HUBBARD, R. E., HUGENJENSEN, B., BOEL, E. & DEREWENDA, Z. S. "The three-dimensional structures of two lipases from filamentous fungi". In: *Lipases: Their structure, biochemistry and application*. Wolley, P. e Peterson, S. B., 77-93. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the phenol reagent". *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275, 1951.

MALISZEWSKA, I. & MASTALERZ, P. "Production and some properties of lipase of *Penicillium citrinum*". *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 190-193, 1992.

MARTINELLE, M., HOLMQUIST, M. & HULT, K. "On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase". *Biochim. Biophys. Acta* **1258**: 272-276, 1995.

MARTINS, T. S. "Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica*". Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 148p, 2001.

MITSUDA, S., UMEMURA, T. & HIROHARA, H. "Preparation of a optically pure secondary alcohol of synthetic pyrethroids using microbial lipases". *Appl. Microb. Biotechnol.* **29**: 310-315, 1988.

MIYAZAWA, T., YUKAWA, T., KOSHIBA, T., SAKAMOTO, K., UEJI, S., YANAGIHARA, R. & YAMADA, T. "Resolution of 2-aryloxy-1-propanols via lipase-catalyzed enantioselective acylation in organic media" *Tetrahedron: Asymmetry* **12**: 1595-1602, 2001.

MIYAZAWA, T., KURITA, S., UEJI, S. & YAMADA, T. "Resolution of mandelic acids by lipase-catalyzed transesterifications in organic media". *Biocat. Biotrans.* **17**: 459-473, 2000.

MIYAZAWA, T., KURITA, S., UEJI, S. & YAMADA, T. "*Chromobacterium viscosum* lipase catalyzes the transesterifications at the carboxyl site as well as the hydroxy site during the enzymatic enantioselective alcoholysis of O-acylated mandelates". *Biotechnol. Lett.* **21**: 1023-1027, 1999.

MIYAZAWA, T., YUKAWA, T., UEJI, S., YANAGIHARA, R. & YAMADA, T. "Resolution of 2-phenoxy-1-propanols by *Pseudomonas sp.* Lipase-catalyzed highly enantioselective transesterification: influence of reaction conditions on the enantioselectivity toward primary alcohols" *Biotechnol. Lett.* **20**: 235-238, 1998.

MIYAZAWA, T., KURITA, S., UEJI, S., YAMADA, T. & KUWATA, S. "Resolution of mandelic acids by lipase-catalyzed transesterifications in organic media: Inversion of

enantioselectivity mediated by the acyl donor". *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **18**: 2253-2255, 1992.

OKAHATA, Y. & MORI, T. "Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media". *Trends Biotechnol.*, **15**: 50-54, 1997.

PAIVA, A. L., BALCÃO, V. M. & MALCATA F. X. "Kinetics and mechanisms of reactions catalised by immobilized lipases". *J. Enzyme Microb. Technol.* **27**: 187-204, 2000.

PALOMO, J. M., FUENTES, M., FERNANDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., GUIBAN, J. M. & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality" *Biomacromolecules* **4**: 1-6, 2003a.

PALOMO, J. M., MUÑOZ, G., FERNANDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FUENTES, M., GUIBAN, J. M. & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins. Hydrolytic resolution of (R,S) - 2-butyroyl-2-phenylacetic acid". *J. Mol. Catal.* **21**: 201-210, 2003b.

PALOMO, J. M., LORENTE, G. F., MATEO, C., ORTIZ, C., LAFUENTE, R. F. & GUIBAN, J. M. "Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters". *Enzyme Microb. Technol.* **31**: 775-783, 2002.

PANDEY, A., BENJAMIM, S., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., KRIEGER, N. & SOCCOL, V. T. "The realm of microbial lipases in biotechnology". *Biotechnol Appl. Biochem.* **29**: 119-131, 1999.

PATEL, R. N. "Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals". *Enzyme Microb. Technol.* **31**: 804-826, 2002.

- PETERSON, G. L. "Determination of total protein". *Meth. Enzymol.* **91**: 95-111, 1983.
- POWEL, L. W. "Immobilized enzymes". In: *Industrial enzymology*. 2nd ed. Tony Godfrey & Stuart West, 267-272, 1996.
- QUEIROZ, N. & NASCIMENTO, M. G. "*Pseudomonas sp.* lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate". *Tetrahedron Lett.* **43**: 5225-5227, 2002.
- REETZ, M. T. "Lipases as practical biocatalysts". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 145-150, 2002.
- ROGALSKA, E., CUDREY, C., FERRATO, F. & VERGER, R. "Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases". *Chirality* **5**: 24-30, 1993.
- RUÁ, M. L., DIAZ-MAURINO, T., FERNANDEZ, V. M., OTERO, C. & BALLESTEROS, A. "Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*". *Biochim. Biophys. Acta* **1156**: 181-189, 1993.
- SASAKI, K., GIORNO, L. & DRIOLI, E. "Lipase-catalyzed resolution of racemic naproxen in biphasic enzyme membrane reactors". *J. Memb. Sci.* **184**: 27-38, 2001.
- SABUQUILLO, P., REINA, J., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISAN, J.M. & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups". *Biochim. Biophys. Acta* **1388**: 337-348, 1998.
- SCHMIDT-DANNERT, C., RÚA, M. L., ATOMI, H. & SCHMID, R. D. "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties". *Biochim. Biophys. Acta.* **1301**: 105-114, 1996.

- SCHMID, R. D. & VERGER, R. "Lipases: interfacial enzymes with attractive applications". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**: 1608-1633, 1998.
- SCHRAG, J. D. & CYGLER, M. "Lipases and α/β hidrolase fold". *Meth. Enzymol.* **284**: 85-107, 1997.
- SHARMA, R., CHISTI, Y. & BANERJEE, U. C. "Production, purification, characterization, and applications of lipases". *Biotechnol. Adv.* **12**: 627-662, 2001.
- SMITH, J. S. & ALFORD, J. A. "Lipolytic microorganisms". In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2nd ed. Speck M. E., 148-154, 1984.
- SMITS, J. P., RINZEMA, A., TRAMPER, J., SCHLOSSER, E. E. & KNOL, W. "Accurate determination of process variables in a solid-state fermentation system". *Process Biochem.* **31 (7)**: 669-678, 1996.
- STRAUSS, U. T. & FABER, K. "Deracemization of (\pm)-mandelic acid using a lipase-mandelate racemase two-enzyme system". *Tetrahedron:Asymmetry* **10**: 4079-4081 1999.
- SUGIHARA, A., SHIMADA, Y. & TOMINAGA, Y. "A novel *Geotrichum candidum* lipase with some preference for the second position of a triglyceride molecule (short contribution)". *Appl. Microbiol, Biotechnol.* **35**: 738-740, 1991.
- SZTAJER, H., LUNSDORF, H. ERDMANN, H., MENGE, U. & SCHMID, R. "Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*". *Biochim. Biophys Acta* **1124**: 253-261, 1992.
- TAIPA, M. A., AIRES-BARROS, M. R. & CABRAL, J. M. S. "Purification of lipases". *J. Biotechnol.* **26**: 111-142, 1992.
- TISCHER, W. & KASCHE, V "Immobilized enzymes: crystals or carriers ?" *Trends Biotechnol.* **17**: 326-335, 1999.

TOIDA,, J., KONDOH, K., FUKUZAWA, M., OHNISHI, K. & SEKIGUCHI, J. “Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59(7)**: 1199-1203, 1995.

UEJIMA, U., FUKUI, T., FUKUSAKI, E., OMATA, T., KAWAMOTO, T., SONOMOTO, K. & TANAKA, A. “Efficient kinetic resolution of organosilicon compounds by stereoselective esterification with hydrolases in organic solvent”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 482-486, 1993.

UHLIG, H. “Carrier-bound enzymes: methods of immobilization”. In: Industrial enzymes and their applications. John Wiley & Sons, 202-223, 1998.

UPPENBERG, J., ÖHRNER, N., NORIN, M., HULT, K., KLEYWEGT, G. J., PATKAR, S., WAAGEN, V. ANTHONSEN, T. & JONES, T. A. “Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a estereospecificity pocket for secondary alcohols”. *Biochem.* **34**: 16838 – 16851, 1995.

VAN BEILEN, J. B. & LI, Z. “Enzyme technology: an overview”. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 338-344, 2002.

VERGER, R. “Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts”. *Trends Biotechnol.* **15**: 32-38, 1997.

VULFSON, E. N. “Industrial applications of lipases”. In: Lipases: Their structure, biochemistry and application. Wolley, P. e Pettersen, S. B., 271-287. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

WANG, Y., SRIVASTAVA, K. C., SHEN, G. J. & WANG, H. Y. “Thermostable alkaline lipase from a newly isolated termophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841)”. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 433-8, 1995.

WERKEMA, M. C. C. “Experimentos fatoriais com dois ou mais fatores”. In: Planejamento e análise de experimentos: como identificar e avaliar as principais variáveis

influentes em um processo. Fundação Christiano Ottoni - UFMG, Belo Horizonte, 294 p, 1996.

YADAV, R. P., SAXENA, R. K., GUPTA, R. & DAVIDSON, W. S “Purification and characterization of a regioespecific lipase from *Aspergillus terreus*”. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**: 243-249, 1998.

ZHU, K., JUTILA, A., TUOMINEN, E. K. J, PATKAR, S. A., SVENDSEN, A. & KINNUNEN, P. K. J. “Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability”. *Biochim. Biophys. Acta* **1547**: 329-338, 2001.