



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

FACULDADE DE FARMÁCIA

Érika Veríssimo da Costa Figueiredo

**Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados
de lipases e sua aplicação na resolução cinética de
mandelato de etila**

Rio de Janeiro

2013

Érika Veríssimo da Costa Figueiredo

Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de etila

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Gisela Maria Dellamora Ortiz
Co-orientador: Prof. Dr. Joaquim Fernando Mendes da Silva

Rio de Janeiro

2013

F475d Figueiredo, Érika Veríssimo da Costa.

Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de etila/ Érika Veríssimo da Costa Figueiredo; orientador Gisela Maria Dellamora Ortiz; co-orientador Joaquim Fernando Mendes da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2013.

122f. : il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Lipases. 2. Imobilização de enzimas. 3. Resolução cinética.
4. Mandelato de etila. 5. Ácido mandélico. I. Dellamora Ortiz, Gisela Maria.
II. Silva, Joaquim Fernando Mendes da. III. Título

CDD 615.19

Érika Veríssimo da Costa Figueiredo

Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de etila

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 16 de maio de 2013.

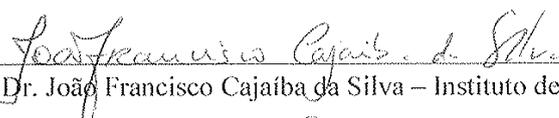
Orientadores:


Prof.^a. Dra. Gisela Maria Dellamora Ortiz – Faculdade de Farmácia – UFRJ


Prof. Dr. Joaquim Fernando Mendes da Silva – Instituto de Química – UFRJ

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Antônio Ferreira Pereira – Instituto de Microbiologia – UFRJ


Prof. Dr. João Francisco Cajaíba da Silva – Instituto de Química – UFRJ


Prof.^a. Dra. Lucia Maria Jaeger de Carvalho – Faculdade de Farmácia – UFRJ

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

“Não se conhece completamente uma ciência enquanto não se souber da sua história.”

Auguste Comte

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela dádiva da vida, por me abençoar e por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais e irmão, meu exemplo de vida, por entenderem o motivo das minhas ausências, pela paciência, por vibrarem comigo em todas as conquistas e pelo apoio recebido durante todo o mestrado. A todos os meus familiares pelo apoio, pela torcida e pelo carinho.

Aos meus orientadores Prof^a Dr^a Gisela Maria Dellamora Ortiz e Prof Dr. Joaquim Fernando Mendes da Silva pelos ensinamentos, sugestões e incentivos durante o mestrado.

As alunas de iniciação científica Paula Fernandes D'Elia e Karoline Aparecida Torquato S. da Silva pela amizade e ajuda nos experimentos.

A Tathiana Souza Martins Meyer e Bianca Waruar Paulo Lobo pela amizade, conselhos, incentivos e ajuda nas análises cromatográficas e estatísticas.

Aos professores Dr. Lúcio Mendes Cabral, Dr^a Valéria Pereira de Sousa, Dr^a Lúcia Maria Jaeger de Carvalho e Dr^a Mirian Ribeiro Leite Moura por permitirem o uso dos cromatógrafos. Assim, como a Ana Ferreira Ribeiro, Letícia, Pedro Henrique, Guilherme Cruz e Paula Bastos pela ajuda nas análises cromatográficas.

As professoras Dr^a Lúcia Maria Jaeger de Carvalho e Dr^a Mirian Ribeiro Leite Moura por fazerem parte da minha comissão de acompanhamento, dando contribuições e sugestões valiosas e indispensáveis para esta dissertação. Pelo uso dos aparelhos de seus laboratórios.

A todos os professores, funcionários e alunos do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

A CAPES pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

FIGUEIREDO, Érika Veríssimo da Costa. **Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de etila.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

O ácido (R)-mandélico é um precursor para produção de diversos fármacos, como penicilina e cefalosporina, além de um agente de resolução em processos quirais. A resolução de intermediários racêmicos é fundamental para a preparação do isômero ativo/mais ativo de compostos desta classe. Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo obter derivados de lipases com enantiosseletividade aprimorada, mediante diferentes métodos de imobilização, para aplicação na resolução cinética de mandelato de etila. Foram utilizadas lipases comerciais de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei*. Estas lipases foram imobilizadas por adsorção no suporte aminado DEAE-Sephacel, com 100% de rendimento e atividades recuperadas de 41% e 67% para os derivados das lipases de *C. rugosa* e de *R. miehei*, respectivamente. A lipase de *C. rugosa* adsorvida aos suportes de fenil- e octil-agarose teve rendimentos de imobilização de 25% e 56% e atividades recuperadas de 22% e 78%, respectivamente. A enzima de *R. miehei* adsorvida nestes suportes teve rendimentos de 48% e 36% e atividades recuperadas de 22% e 54%, respectivamente. As lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* foram imobilizadas covalentemente em suportes aminados ativados com monômeros e dímeros de glutaraldeído, com 100% de rendimento. A atividade recuperada dos derivados da lipase de *C. rugosa* foi de 48% e 33%, enquanto que os derivados da lipase de *R. miehei* apresentaram 40% e 39% de atividade recuperada, respectivamente. As lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* foram imobilizadas em suporte Eupergit C, com rendimentos de 83% e 71% e atividades recuperadas de 28% e 30%, respectivamente. Por terem apresentado maior estabilidade a estocagem a 4 °C, as lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* imobilizadas em octil-agarose e em suportes aminados ativados com monômeros de glutaraldeído foram testadas na resolução cinética de mandelato de etila. Dentre os quatro derivados selecionados para utilização em reações de hidrólise do mandelato de etila, o derivado da lipase de *R. miehei* em suporte aminado ativado com monômeros de glutaraldeído apresentou os melhores resultados de rendimento de imobilização (100%), atividade recuperada (67%), estabilidade à estocagem a 4 °C (35 dias), atividade de hidrólise de mandelato de etila (0,0007 µmol/min.mg suporte) e porcentagem de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico (22,1%). Por CLAE em coluna quiral foi possível identificar os picos correspondentes a mandelato de etila (tempo de retenção 6,7 min), ácido (S)-

mandélico (tempo de retenção 9,3 min) e ácido (R)-mandélico (tempo de retenção 10,7 min). A lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado ativado com monômeros de glutaraldeído que foi mais eficiente na hidrólise do mandelato de etila, produzindo 1,4 mM de ácido (S)-mandélico, o que corresponde a 63% do total de ácido mandélico formado em 30 h de reação (2,21 mM), apresentando assim enantiopreferência pelo (S)-mandelato de etila.

Palavras-chave: Lipases, Imobilização de enzimas, Resolução cinética, Mandelato de etila, Ácido mandélico.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Érika Veríssimo da Costa. **Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de etila.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

(R)-mandelic acid is a precursor of a series of drugs, including penicillin and cephalosporin, besides being a chiral resolution agent. Resolution of racemic intermediates is an essential step to obtain the active/most active isomer of this class of compounds. The purpose of this work was to obtain lipase derivatives with enhanced enantioselectivity, through different immobilization procedures, aiming their application in the kinetic resolution of ethyl mandelate. Commercial lipases from *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* were used. These enzymes were immobilized by adsorption on an amine support (DEAE-Sephacel) with 100% yield and 41% and 67% activity recoveries for derivatives from *C. rugosa* and *R. miehei* lipases, respectively. Adsorption of *C. rugosa* lipase phenyl- and octyl-agarose resulted in 25% and 56% immobilization yields and 22% and 78% activity recoveries, respectively, whereas derivatives from *R. miehei* lipase had 48% and 36% immobilization yields and 22% and 54% activity recoveries, respectively. Amine supports were treated with 0.5% and 15% (v/v) glutaraldehyde to obtain supports which were modified with glutaraldehyde monomers and dimers, respectively. Covalent immobilization of *C. rugosa* and *R. miehei* lipases on those supports resulted in 100% yields. Activity recoveries for *C. rugosa* lipase derivatives corresponded to 48% (monomers) and 33% (dimers), while both *R. miehei* lipase derivatives had activity recoveries around 40%. Immobilization of *C. rugosa* and *R. miehei* on Eupergit C, resulted in 83% and 71% yields and 28% and 30% activity recoveries, respectively. Due to their higher stability during storage at 4 °C, *C. rugosa* and *R. miehei* lipase derivatives, obtained by immobilization on octyl-agarose and glutaraldehyde monomer activated amine supports, were tested in ethyl mandelate hydrolysis reactions. Among the four selected derivatives, *R. miehei* lipase derivative obtained by immobilization on glutaraldehyde monomer activated amine support showed the highest immobilization yield (100%), activity recovery (67%), storage stability 4 °C (35 days), ethyl mandelate hydrolysis activity (0,0007 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ support) and conversion of ethyl mandelate into mandelic acid (22.1%). Analysis by HPLC using a chiral column allowed identification of ethyl mandelate (retention time 6.7 min), (S)-mandelic acid (retention time (9.3 min) and (R)-mandelic acid (retention 10.7 min). The most efficient enzyme for hydrolysis of ethyl mandelate was the *R. miehei* lipase derivative obtained by immobilization on a

glutaraldehyde monomer activated amine support. This derivative produced 1.4 mM of (S)-mandelic acid, which corresponds to 63% of the total concentration of mandelic acid (2.21 mM) formed in 30 h of reaction. This result clearly shows the enantioselectivity of this lipase derivative for (S)-ethyl mandelate.

Keywords: Lipases, Enzyme immobilization, Kinetic resolution, Ethyl mandelate, Mandelic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| BSA | Albumina de soro bovino |
| <i>C. rugosa</i> | <i>Candida rugosa</i> |
| DEAE-Sephacel | Dietil-amino-etil-celulose |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FeCl ₂ | Cloreto ferroso |
| FeCl ₃ | Cloreto férrico |
| Fe ₃ O ₄ | Óxido de ferro III |
| KDa | Kilodalton |
| NaHSO ₃ | Bissulfito de sódio |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| pI | Ponto isoelétrico |
| <i>p</i> -NFL | Laurato de <i>p</i> -nitrofenila |
| <i>R. miehei</i> | <i>Rhizomucor miehei</i> |
| rpm | Rotações por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| p/v | Peso por volume |
| v/v | Volume por volume |
| U | Unidade de atividade enzimática |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Diferentes métodos para imobilização de enzimas | 28 |
| Figura 2: Imobilização de lipases por adsorção a suporte hidrofóbico | 31 |
| Figura 3: Estrutura do suporte Eupergit C e mecanismo de imobilização covalente de lipases | 33 |
| Figura 4: Efeito da imobilização na estabilidade da enzima | 34 |
| Figura 5: Principais reações catalisadas por lipases | 36 |
| Figura 6: Ativação interfacial de lipases | 38 |
| Figura 7: Estrutura da lipase de <i>Candida rugosa</i> | 40 |
| Figura 8: Estrutura da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | 41 |
| Figura 9: Exemplo de hidrólise estereosseletiva de mandelato de etila | 44 |
| Figura 10: Efeito da concentração de proteína sobre a atividade da lipase de <i>Candida rugosa</i> | 55 |
| Figura 11: Efeito da concentração de proteína sobre a atividade da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | 55 |
| Figura 12: Atividade da lipase de <i>Candida rugosa</i> determinada pelo método espectrofotométrico, na ausência e na presença de triton X-100 | 57 |
| Figura 13: Adsorção da lipase de <i>Candida rugosa</i> no suporte DEAE-Sephacel | 58 |
| Figura 14: Adsorção da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> no suporte DEAE-Sephacel | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 15: Dessorção da lipase de <i>Candida rugosa</i> do suporte DEAE-Sephacel com concentrações crescentes de NaCl | 60 |
| Figura 16: Dessorção da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> do suporte DEAE-Sephacel com concentrações crescentes de NaCl | 60 |
| Figura 17: Capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel na imobilização das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 61 |
| Figura 18: Análise da adsorção e dessorção da lipase de <i>Candida rugosa</i> em DEAE-Sephacel por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) | 63 |
| Figura 19: Análise da adsorção da lipase de <i>Candida rugosa</i> em DEAE-Sephacel por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) | 64 |
| Figura 20: Análise da adsorção e dessorção da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em DEAE-Sephacel por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) | 64 |
| Figura 21: Adsorção da lipase de <i>Candida rugosa</i> a suporte hidrofóbico fenil-agarose | 66 |
| Figura 22: Adsorção da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> a suporte hidrofóbico fenil-agarose | 66 |
| Figura 23: Adsorção da lipase de <i>Candida rugosa</i> a suporte hidrofóbico octil-agarose | 67 |
| Figura 24: Adsorção da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> a suporte hidrofóbico octil-agarose | 67 |
| Figura 25: Capacidade de carga dos suportes hidrofóbicos na adsorção da lipase de <i>Candida rugosa</i> | 68 |
| Figura 26: Capacidade de carga dos suportes hidrofóbicos na adsorção da lipase de <i>Rhizomucor</i> | 69 |

| | |
|--|----|
| Figura 27: Imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i> em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v) | 70 |
| Figura 28: Imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i> em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 15% (v/v) | 71 |
| Figura 29: Imobilização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v) | 71 |
| Figura 30: Imobilização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 15% (v/v) | 72 |
| Figura 31: Capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído na imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i> | 73 |
| Figura 32: Capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído na imobilização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | 73 |
| Figura 33: Imobilização covalente da lipase de <i>Candida rugosa</i> em suporte epóxido Eupergit C | 76 |
| Figura 34: Imobilização covalente da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em suporte epóxido Eupergit C | 76 |
| Figura 35: Capacidade de carga do suporte Eupergit C na imobilização covalente das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 77 |
| Figura 36: Estabilidade à estocagem a 4 °C dos derivados obtidos por imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i> | 79 |
| Figura 37: Estabilidade à estocagem a 4 °C dos derivados obtidos por imobilização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | 79 |
| Figura 38: Cromatograma do padrão de ácido mandélico 1,25 mM | 81 |
| Figura 39: Curva padrão de ácido mandélico | 81 |

| | |
|---|----|
| Figura 40: Cromatograma de amostra do tempo de 0 da reação de hidrólise | 82 |
| Figura 41: Cromatograma da reação de hidrólise no tempo de 3 h empregando o derivado obtido com a lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada em octil-agarose | 83 |
| Figura 42: Cromatograma da reação de hidrólise no tempo de 30 h empregando o derivado obtido com a lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada em octil-agarose | 83 |
| Figura 43: Ácido mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando o derivado obtido com a lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada a suporte octil-agarose | 84 |
| Figura 44: Cromatograma da reação de hidrólise no tempo de 3 h empregando o derivado obtido com a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em octil-agarose | 84 |
| Figura 45: Cromatograma da reação de hidrólise no tempo de 30 h empregando o derivado obtido com a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em octil-agarose | 85 |
| Figura 46: Ácido mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando o derivado obtido com a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada a suporte octil-agarose | 85 |
| Figura 47: Cromatograma da reação de hidrólise no tempo de 3 h empregando o derivado obtido com a lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada em monômeros de glutaraldeído | 86 |
| Figura 48: Cromatograma da reação de hidrólise no tempo de 30 h empregando o derivado obtido com a lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada em monômeros de glutaraldeído | 86 |
| Figura 49: Ácido mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando o derivado obtido com a lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada em suporte modificado com monômeros de glutaraldeído | 87 |
| Figura 50: Cromatograma da reação de hidrólise no tempo de 3 h empregando o derivado obtido com a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em monômeros de glutaraldeído | 88 |

| | |
|--|----|
| Figura 51: Cromatograma de amostra do tempo de 30 h da reação de hidrólise empregando a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído | 88 |
| Figura 52: Ácido mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído | 89 |
| Figura 53: Cromatograma do padrão de ácido (R)-mandélico 0,5 mM | 90 |
| Figura 54: Curva padrão de ácido (R)-mandélico | 91 |
| Figura 55: Cromatograma do padrão de ácido (R,S)-mandélico 0,5 mM | 92 |
| Figura 56: Curva padrão de ácido (R,S)-mandélico | 93 |
| Figura 57: Curva padrão de ácido (S)-mandélico | 93 |
| Figura 58: Cromatograma de amostra do tempo 0 da reação de hidrólise empregando a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído | 94 |
| Figura 59: Cromatograma de amostra do tempo de 30 h da reação de hidrólise empregando a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído | 95 |
| Figura 60: Ácido (S)-mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído. | 96 |
| Figura 61: Ácido (S)-mandélico formado nas reações de hidrólise utilizando os derivados das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>R. miehei</i> obtidos por imobilização em octil-agarose e em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído | 96 |
| Figura 62: Porcentagem de ácido (S)-mandélico formado nas reações de hidrólise utilizando o derivado obtido com a lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído | 97 |

| | |
|--|-----|
| Figura 63: Estrutura dos sítios ativos das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 98 |
| Figura 64: Esquema da geometria dos sítios ativos das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 98 |
| Figura 65: Estrutura da lipase de <i>Candida rugosa</i> | 99 |
| Figura 66: Estrutura da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | 100 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por adsorção das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>R. miehei</i> a DEAE-Sephacel | 62 |
| Tabela 2: Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização a suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose | 69 |
| Tabela 3: Dessorção das lipases de <i>C. rugosa</i> e de <i>R. miehei</i> do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído (imobilização covalente) | 74 |
| Tabela 4: Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente da lipase de <i>C. rugosa</i> em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído | 75 |
| Tabela 5: Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente da lipase de <i>R. miehei</i> em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído | 75 |
| Tabela 6: Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>R. miehei</i> em suporte epóxido Eupergit C | 78 |
| Tabela 7: Conversão (%) de mandelato de etila em ácido mandélico | 89 |
| Tabela 8: Comparação entre os derivados lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>R. miehei</i> imobilizadas por ligação covalente a suporte aminado pré-ativado com monômero de glutaraldeído e por adsorção em octil-agarose | 89 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| Anexo 1: Curva padrão de <i>p</i> -nitrofenol | 121 |
| Anexo 2: Curva padrão de albumina de soro bovino | 121 |
| Anexo 3: Mobilidade eletroforética relativa dos padrões de massa molecular na eletroforese da lipase de <i>Candida rugosa</i> | 122 |
| Anexo 4: Mobilidade eletroforética relativa dos padrões de massa molecular na eletroforese da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | 122 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 24 |
| 1.1. Enzimas | 24 |
| 1.2. Catálise enzimática | 24 |
| 1.3. Catálise em meios não aquosos | 25 |
| 1.4. Uso de biocatalisadores para a obtenção de compostos enantiomericamente puros | 25 |
| 1.5. Enzimas imobilizadas | 27 |
| 1.6. Tipos de imobilização | 28 |
| 1.6.1. Encapsulamento | 29 |
| 1.6.2. Adsorção | 29 |
| 1.6.3. Ligação covalente | 32 |
| 1.6.4. Entrecruzamento | 34 |
| 1.7. Lipases | 35 |
| 1.8. Estrutura e mecanismo de ação das lipases | 37 |
| 1.9. Características das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 39 |
| 1.10. Utilização de lipases para a resolução estereosseletiva de aminoálcoois | 42 |

| | |
|---|----|
| 1.11. Aplicações do ácido mandélico como precursor de síntese de fármacos | 43 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 44 |
| 3. OBJETIVOS | 45 |
| 3.1. Objetivo Geral | 45 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 45 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 4.1. Materiais | 46 |
| 4.1.1. Reagentes e produtos químicos | 46 |
| 4.1.2. Lipases | 47 |
| 4.2. Métodos | 47 |
| 4.2.1. Ensaios de atividade enzimática | 47 |
| 4.2.1.1. Método titulométrico | 47 |
| 4.2.1.2. Método espectrofotométrico – Hidrólise de laurato de <i>p</i> -nitrofenila | 48 |
| 4.2.2. Determinação do teor de proteínas | 48 |
| 4.2.3. Determinação da concentração de glutaraldeído | 48 |
| 4.2.4. Obtenção dos biocatalisadores imobilizados | 49 |
| 4.2.4.1. Imobilização por adsorção a suporte aminado | 49 |
| 4.2.4.2. Dessorção da lipase adsorvida no suporte aminado | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.4.3. Capacidade de carga do suporte aminado na adsorção | 50 |
| 4.2.4.4. Imobilização por adsorção a suportes hidrofóbicos | 50 |
| 4.2.4.5. Imobilização covalente em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído | 50 |
| 4.2.4.6. Imobilização covalente em suportes epóxido (Eupergit C) | 51 |
| 4.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) | 52 |
| 4.2.6. Cálculo de rendimento de imobilização e atividade recuperada | 52 |
| 4.2.7. Caracterização dos biocatalisadores | 53 |
| 4.2.8. Hidrólise enzimática do mandelato de etila | 53 |
| 4.2.9. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos produtos das reações de hidrólise enzimática | 54 |
| 4.2.10. Determinação da concentração dos isômeros do ácido mandélico por CLAE em coluna quiral | 54 |
| 4.2.11. Análise estatística | 54 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 5.1. Efeito da variação da concentração de enzima sobre a atividade lipásica | 55 |
| 5.2. Efeito da variação da concentração de proteína sobre a atividade lipásica de <i>Candida rugosa</i> , na ausência e presença de diferentes concentrações de triton X-100 | 56 |
| 5.3. Adsorção das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> , pré-incubadas com triton X-100 a 0,005%, a suporte aminado | 58 |

| | |
|---|----|
| 5.4. Dessorção das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> do suporte aminado | 59 |
| 5.5. Capacidade de carga do suporte aminado DEAE-Sephacel na adsorção das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 61 |
| 5.6. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por adsorção a suporte aminado | 62 |
| 5.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) | 63 |
| 5.8. Adsorção das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> a suportes hidrofóbicos | 66 |
| 5.9. Capacidade de carga dos suportes hidrofóbicos na adsorção das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 68 |
| 5.10. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização a suportes hidrofóbicos | 69 |
| 5.11. Imobilização covalente das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído | 70 |
| 5.12. Capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído | 73 |
| 5.13. Dessorção das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído | 74 |
| 5.14. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído | 75 |
| 5.15. Imobilização covalente das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> em suporte epóxido Eupergit C | 76 |

| | |
|---|-----|
| 5.16. Capacidade de carga do suporte Eupergit C na imobilização covalente das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 77 |
| 5.17. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente em suporte epóxido Eupergit C | 78 |
| 5.18. Estabilidade à estocagem a 4 °C dos derivados obtidos por imobilização das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizomucor miehei</i> | 78 |
| 5.19. Hidrólise enzimática do mandelato de etila | 80 |
| 5.19.1 Curva padrão de ácido (R,S)-mandélico | 80 |
| 5.19.2 Análise por CLAE do grau de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico | 82 |
| 5.20 Determinação por CLAE em coluna quiral da concentração dos isômeros de ácido mandélico produzidos nas reações de hidrólise de mandelato de etila | 90 |
| 5.20.1 Curva padrão de ácido (R)-mandélico | 90 |
| 5.20.2 Curva padrão de ácido (S)-mandélico | 92 |
| 5.20.3 Análise por CLAE em coluna quiral dos isômeros produzidos nas reações de hidrólise de mandelato de etila | 94 |
| 6. CONCLUSÕES | 101 |
| 7. PERSPECTIVAS | 102 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 103 |
| 9. ANEXOS | 121 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas

Enzimas são proteínas capazes de promover e acelerar reações químicas, estando presentes em todos os seres vivos e regulando grande número de processos metabólicos (SILVA, 2010). A velocidade da reação enzimática é influenciada pelas concentrações de substrato e enzima, pH, temperatura e presença de ativadores ou inibidores enzimáticos (COSTA NETO, 2002; CASTRO *et al.*, 2004; SILVA, 2010).

As enzimas são encontradas em células animais e vegetais, e podem ser produzidas mediante bioprocessos usando diferentes espécies de microrganismos (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004). Do ponto de vista econômico e industrial, as enzimas de microrganismos são preferíveis porque além de apresentarem procedimentos mais simples de extração, isolamento e purificação, a partir do meio fermentativo, são, geralmente, mais estáveis e possuem propriedades mais diversificadas do que as enzimas de outras fontes (BORGSTON & BROCKMAN, 1984; PARK, PASTORE & ALMEIDA, 1988; CASTRO & ANDERSON, 1995; PASTORE, MACEDO & PARK, 1997). Além disso, os microrganismos geralmente apresentam maior facilidade de manipulação genética (HONG & CHANG, 1998).

1.2 Catálise enzimática

As enzimas são catalisadores altamente seletivos, capazes de promover reações em condições brandas, o que as torna potencialmente atraentes do ponto de vista industrial. Assim, é possível evitar condições drásticas que poderiam resultar em isomerização, racemização, epimerização e rearranjos dos produtos de interesse (PATEL, 2002). Entre as vantagens apresentadas pelos processos catalisados enzimaticamente está, portanto, a reduzida geração de resíduos, já que escolhendo a enzima adequada é possível controlar os produtos obtidos e minimizar a ocorrência de reações secundárias. Quando são utilizadas enzimas puras é possível obter produtos puros.

O uso de biocatalisadores permite evitar longos períodos de reação em temperaturas muito altas, o que representa uma vantagem econômica (OSPRIAN, FECHTER & GRIENGL, 2003). As instalações em que são realizadas reações enzimáticas podem ser construídas e operadas com menores custos de capital e energia. Devido a sua especificidade, os processos enzimáticos possuem menores custos de tratamento de

efluentes. Além disso, como as enzimas são biodegradáveis e utilizadas em proporções correspondentes a 0,1 a 1% do substrato, a contribuição de uma enzima para a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) dos efluentes é desprezível (ALCALDE *et al.*, 2006).

1.3 Catálise em meios não aquosos

As lipases são biocatalisadores muito versáteis para aplicações em síntese orgânica. A utilização destas enzimas em meios não aquosos é uma relevante alternativa para a obtenção de diversos compostos de interesse comercial (KLIBANOV, 2001; KLIBANOV, 2003; CLARK, 2004; GUPTA & KHARE, 2009). Além de hidrolisarem ligações ésteres de triacilgliceróis, estas enzimas podem catalisar a reação reversa em sistemas não aquosos, levando à formação de ésteres a partir de doadores de grupos acila e álcoois (CASTRO *et al.*, 2004; GHANEM & ABOUL-ENEIN, 2005). Algumas vantagens da catálise enzimática em meios não aquosos são: o aumento da solubilidade e estabilidade de substratos e produtos, a maior facilidade/simplicidade de recuperação dos produtos e da enzima, e a maior esterilidade do meio reacional (CARREA & RIVA, 2000; GHANEM & ABOUL-ENEIN, 2005; GHANEM, 2007; SERDAKOWSKI & DORDICK, 2008).

As enzimas, no entanto, são essencialmente insolúveis nos solventes orgânicos que não causam sua desnaturação (PERSSON, WEHTJE & ADLERCREUTZ, 2002; WURGES *et al.*, 2005; PFROMM *et al.*, 2007; CRUZ, PFROMM & REZAC, 2009). Entre as estratégias utilizadas para tentar suplantar esta limitação incluem-se: a incorporação de lioprotetores e crioprotetores às preparações enzimáticas (DABULIS & KLIBANOV, 1993; TRIANTAFYLLOU *et al.*, 1997), a encapsulação de enzimas em micelas reversas (CARVALHO & CABRAL, 2000; BIASUTTI *et al.*, 2008), a liofilização de enzimas na presença de sais (ativação por sal) (RU *et al.*, 2001; LINDSAY, CLARK & DORDICK, 2004), e a imobilização de enzimas em suportes orgânicos e inorgânicos, micro ou nanométricos (YAN, LI & YE, 2002; CHEN *et al.*, 2008; CRUZ, PFROMM & REZAC, 2009; KUMAR *et al.*, 2010).

1.4 Uso de biocatalisadores para a obtenção de compostos enantiomericamente puros

A atividade biológica e a estrutura química das moléculas apresentam uma estreita correlação, e a quiralidade das moléculas tem um importante papel em sua atividade biológica. Conseqüentemente, somente um dos enantiômeros contribui para a atividade biológica da maior parte das substâncias bioativas que contêm um ou mais centros quirais

(LIMA, 1997). Além disso, o outro enantiômero pode ser menos eficaz, totalmente ineficaz, ou pode produzir efeitos colaterais ou tóxicos, ao interagir com diferentes alvos ou inibir competitivamente a ação biológica do enantiômero de interesse (AVILA *et al.*, 2005). Em função disso, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos eficientes para a obtenção destes compostos em forma enantiomericamente pura e com atividade biológica aumentada.

O desenvolvimento de métodos eficientes de obtenção enantiosseletiva de compostos quirais constitui um dos grandes desafios da síntese de fármacos. Em princípio, a estratégia mais eficiente baseia-se em transformações assimétricas. Neste contexto, a catálise enzimática representa uma excelente alternativa para a obtenção de produtos farmacêuticos enantiomericamente puros, tanto do ponto de vista econômico (GUIEYSSE *et al.*, 2004), como em relação aos aspectos ambientais.

A enantiosseletividade constitui uma importante propriedade das lipases, acarretando em inúmeras aplicações destas enzimas em síntese orgânica, como na preparação de álcoois e ésteres opticamente puros, o que desperta o interesse de diversas indústrias, sobretudo a indústria farmacêutica, já que vários fármacos são produzidos como mistura racêmica, devido às dificuldades técnicas e econômicas em separar os enantiômeros (CÓRDOVA & JANDA, 2001; MONTERDE *et al.*, 2002; PÁMIES & BACKVALL, 2004; BAI *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2010). Estas enzimas reconhecem moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros da mistura racêmica (MARZO, 1993; ROMERO, 1998; FABER, 2000).

A busca por novos reagentes quirais é crescente no setor farmacêutico. No ano 2000, 35% dos intermediários eram quirais e a expectativa era de que este número chegasse a 70% até 2010 (ROUCHI, 2002). Compostos com um centro quiral são geralmente produzidos na forma enantiomericamente pura. Frequentemente, no entanto, as moléculas a serem sintetizadas são complexas e possuem múltiplos centros quirais. Há vários anos, nos Estados Unidos, a agência reguladora Food and Drug Administration (FDA) requer prova de que o isômero não terapêutico não é teratogênico (FDA, 1992). A meta em processos comerciais é a obtenção de excessos enantioméricos de, no mínimo, 98% (POLLARD & WOODLEY, 2006). Quando o enriquecimento necessário não é atingido em uma única etapa, podem ser utilizadas múltiplas etapas de enriquecimento.

O número de biocatalisadores adequados para aplicação industrial, no entanto, ainda é muito limitado. Existe, portanto, um grande interesse em identificar ou obter

biocatalisadores que possuam elevada enantiosseletividade e novas atividades catalíticas (BOMMARUS & POLIZZI, 2006). Diferentes abordagens podem ser adotadas para obter novos biocatalisadores, biocatalisadores com estereosseletividade aumentada ou revertida, com especificidade para substrato ampliada e com maior estabilidade operacional (SCHOEMAKER, MINK & WUBBOLTS, 2007), entre as quais se incluem: rastrear amostras do meio ambiente, no intuito de encontrar determinado organismo que possa catabolizar um determinado composto; modificar o biocatalisador conhecido mediante engenharia de proteínas; alterar a formulação do biocatalisador (p.ex. mediante imobilização); testar os biocatalisadores para novas funcionalidades ou maior amplitude de substratos; entre outras. Duas ou mais estratégias distintas podem ser combinadas para criar novas enzimas com as características desejadas.

A obtenção de enantiômeros via biocatálise pode ser feita mediante a síntese estereosseletiva e pela resolução de racematos, dependendo do material de partida utilizado (COLLINS, SHELDRAKE & CROSBY, 1997). Em que pese o imenso progresso observado em síntese assimétrica, o principal método industrial de obtenção de enantiômeros puros consiste na resolução de racematos (CARNELL, 2002; KIRIHARA *et al.*, 2003). A resolução de enantiômeros pode ser feita por cristalização preferencial direta, cristalização de sais diastereoméricos, cromatografia e resolução cinética.

1.5 Enzimas imobilizadas

A aplicação de biocatalisadores vem aumentando consideravelmente, tanto em escala laboratorial como industrial (STRAATHOF *et al.*, 2002). O grande interesse no uso de enzimas imobilizadas, principalmente para aplicação industrial, é a possibilidade de sua reutilização, a facilidade de separação catalisador/produtos e o aumento da estabilidade operacional da enzima (KATCHALSKI-KATZIR, 1993). Outra vantagem desta técnica é a estabilidade que as enzimas imobilizadas apresentam à estocagem, tanto em solução como secas, a qual, geralmente, é superior a da enzima livre (ZANIN & MORAES, 2004).

A imobilização de enzimas pode resultar em aumentos significativos da atividade, estabilidade e seletividade dos biocatalisadores e pode, também, levar à diminuição da inibição por substratos, produtos de reação ou outros componentes do meio reacional (REETZ, 2002; MATEO *et al.*, 2007). O uso de biocatalisadores imobilizados é, portanto, uma alternativa para realizar processos industriais sustentáveis, com vantagens sobre os catalisadores convencionais em relação aos aspectos econômicos, ecológicos e de

toxicidade (KATCHALSKI-KATZIR & KRAMER, 2000; ALCALDE *et al.*, 2006; SHELDON, 2007; IDRIS *et al.*, 2008; MOHD ZAIN *et al.*, 2010).

1.6 Tipos de imobilização

A imobilização de diferentes lipases nos mais variados tipos de suportes, por adsorção física, interações iônicas ou ligação covalente, bem como por aprisionamento/encapsulamento tem sido relatada por diversos autores (MATEO *et al.*, 2003; GUIÓSÁN, 2006; YILMAZ *et al.*, 2009). Alguns dos distintos métodos de imobilização estão esquematizados na figura 1.

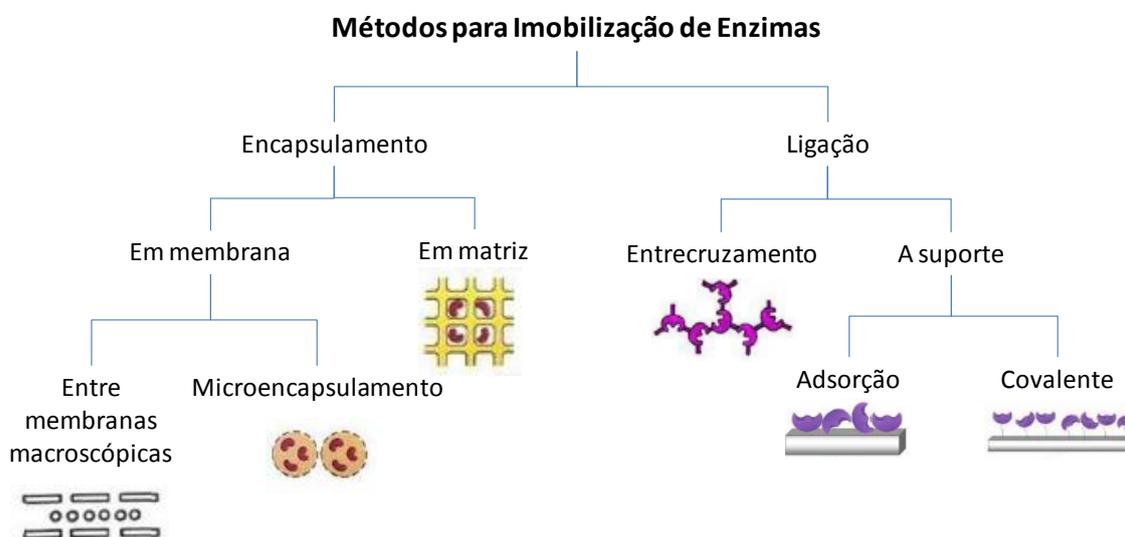


Figura 1: Diferentes métodos para imobilização de enzimas (adaptado de DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI (2004) e BRÍGIDA (2010)).

Os suportes, além de funcionarem como um apoio para as moléculas de enzima, também podem modificar fortemente as propriedades catalíticas e bioquímicas destas enzimas, conferindo aumentos na atividade, estabilidade e seletividade destes biocatalisadores (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; PALOMO *et al.*, 2002a; TORRES *et al.*, 2006; PALOMO *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010; IDRIS & BUKHARI, 2012). As propriedades catalíticas das lipases podem ser facilmente alteradas, sem inativação da enzima, devido à extrema flexibilidade de seus centros ativos. Alterações nas condições de reação e a aplicação de diferentes protocolos de imobilização

podem modular as propriedades das lipases (PALOMO *et al.*, 2005a; CHAUBEY *et al.*, 2006; PALOMO *et al.*, 2007; CABRERA *et al.*, 2009; CHAUBEY *et al.*, 2009; RODRIGUES & FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), enquanto que o grau de estabilização do derivado formado depende da estrutura da enzima, do método de imobilização e do tipo de suporte (MATEO *et al.*, 2007; OZMEN, SEZGIN & YILMAZ, 2009).

1.6.1 Encapsulamento

Nesta técnica de imobilização, também conhecida como aprisionamento ou oclusão, as enzimas são retidas dentro de uma matriz polimérica impermeável a sua passagem e permeável a substâncias de baixa massa molar. Assim, proteínas grandes não conseguem atravessar a matriz, enquanto que pequenos substratos e produtos conseguem passar livremente através da membrana (MURTY, BHAT & MUNISWARAN, 2002; BRÍGIDA, 2010).

Como neste tipo de imobilização ocorre uma retenção física da enzima dentro do polímero, não ocorrem alterações estruturais ou ligações com grupos reativos ou sítio ativo da enzima (BRÍGIDA, 2010). Entretanto, não é uma das técnicas mais utilizadas devido a baixa velocidade de difusão de substratos e produtos através da membrana e a restrição no peso molecular das moléculas que conseguem atravessar este material (KENNEDY, WHITE & MELO, 1988; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004).

A imobilização por encapsulamento pode ser subdividida em encapsulamento em matriz, encapsulamento entre membranas macroscópicas e microencapsulamento. Esta classificação se baseia nas características do material polimérico utilizado e no processo de aprisionamento (BRÍGIDA, 2010).

1.6.2 Adsorção

Na adsorção a enzima é imobilizada em um suporte sólido por interações fracas (ligações de baixa energia), tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações iônicas, entre outras (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004). Vários materiais podem ser utilizados como suporte na imobilização por adsorção e a sua escolha depende de propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorver a enzima e custo (VILLENEUVE *et al.*, 2000; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004; BRÍGIDA, 2010).

Diferentes tipos de materiais naturais ou sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, podem ser utilizados como suportes para imobilização de enzimas. Entre os suportes de dimensões nanométricas empregados para esta finalidade, se incluem as argilas expansíveis, as quais apresentam alta afinidade para adsorver proteínas (SEREFOGLOU *et al.*, 2008). As enzimas são adsorvidas tanto na superfície externa como na superfície interna das lamelas destes minerais (OZTURK *et al.*, 2008; SANJAY & SUGUNAN, 2008; SEREFOGLOU *et al.*, 2008). A capacidade de adsorção destas argilas depende do pH e da temperatura da reação de imobilização, da capacidade de troca catiônica e da área superficial das argilas, da natureza dos cátions nas lamelas, do ponto isoelétrico e do tamanho da enzima.

A imobilização em resinas de troca iônica é muito simples quando comparada com outros métodos de imobilização. Envolve, basicamente, interações iônicas e eletrostáticas entre os íons das proteínas com os íons de carga oposta da resina (GUIDINI *et al.*, 2010). Diferentes materiais, tais como MANAE-agarose ou DEAE-Sephacel podem ser utilizados como suportes para troca iônica (DA SILVA, 2009).

A principal desvantagem deste tipo de imobilização é que as ligações iônicas neste tipo de suporte podem ser rompidas com facilidade (dessorção), durante a reação, se houver variação do pH ou da força iônica (GUIDINI *et al.*, 2010). A fraca interação suporte/enzima é o fator responsável pela fragilidade apresentada por este tipo de sistema imobilizado. Entretanto, a estabilidade da enzima adsorvida neste suporte pode ser melhorada através da formação de ligações cruzadas adicionais ou modificação do suporte, usando-se um reagente bifuncional, como o glutaraldeído (FILHO *et al.*, 2008).

Devido a afinidade que as lipases possuem por interfaces óleo/água, a imobilização por adsorção a suportes hidrofóbicos é uma das técnicas mais rápidas, simples e baratas (MURTY, BHAT & MUNISWARAN, 2002). Materiais como fenil-agarose e octil-agarose, que contêm grupos hidrofóbicos, são exemplos de suportes que vêm se destacando para este tipo de imobilização (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Os suportes hidrofóbicos se assemelham a superfície hidrofóbica dos substratos, conseqüentemente, as lipases sofrem a ativação interfacial nestes suportes, ocorrendo a estabilização da conformação aberta. Assim, sob condições adequadas, é possível adsorver as lipases, através da interação hidrofóbica da face interna da sua tampa com o suporte hidrofóbico, fixando a conformação aberta, que é a conformação ativa da enzima (BRADY *et al.*, 1990;

BASTIDA *et al.*, 1998 FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007). Este tipo de imobilização está esquematizado na figura 2.

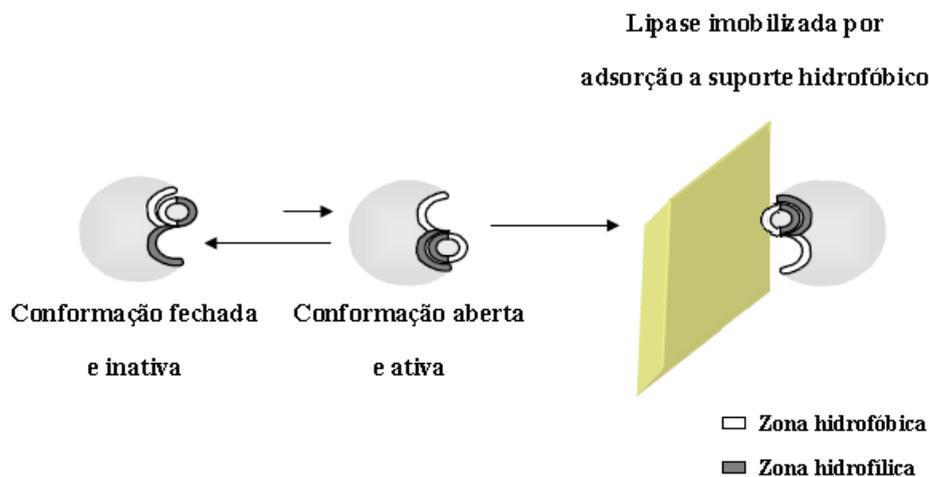


Figura 2: Imobilização de lipases por adsorção a suporte hidrofóbico (adaptado de PALOMO *et al.* (2004)

Como a ligação da enzima ao suporte ocorre através de interações hidrofóbicas da face interna da sua tampa (PALOMO *et al.*, 2002b), estes biocatalisadores devem ser mais ativos para substratos de baixo peso molecular.

A adsorção de lipases via ativação interfacial a suportes hidrofóbicos em baixa força iônica é um método eficiente tanto para a imobilização, como para a purificação e a estabilização de lipases (BASTIDA *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007). Esta interação reversível, em geral, também promove a hiperativação da lipase após a imobilização e produz derivados muito estáveis sob condições experimentais diversas (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; PALOMO *et al.*, 2002c; NIETO *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; RODRIGUES & FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010; PALLA *et al.*, 2011).

Outro tipo de suporte que vem sendo muito utilizado para a imobilização de enzimas e de biomoléculas, em geral, são as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4) (KUROIWA *et al.*, 2008). O uso das nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de enzimas apresenta muitas vantagens como a alta área superficial, a baixa resistência à transferência de massa, e a facilidade de recuperação destes nanomateriais pela aplicação de um campo magnético. Diversos trabalhos reportam a utilização de nanopartículas magnéticas para a imobilização de enzimas tais como proteases, lipases,

penicilina G acilase, glicose oxidase, entre outras (BETANCOR *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2009). As nanopartículas magnéticas podem ter sua superfície modificada mediante o recobrimento com polímeros biocompatíveis, contendo grupos reativos (LEI *et al.*, 2009).

1.6.3 Ligação covalente

Outro método muito comum de imobilização de enzimas é por formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais do suporte e da enzima. Essas ligações covalentes são geralmente formadas pela interação dos resíduos de aminoácidos da enzima, como os grupos amino de lisina ou arginina, grupos hidroxila da serina e treonina, grupos carboxila de ácido aspártico e ácido glutâmico, e grupos sulfidril de cisteína, com os grupos reativos do suporte. Este tipo de imobilização geralmente requer a ativação do suporte e confere uma significativa melhoria na estabilidade da enzima quando comparada a imobilização por adsorção (KARIM & HASHINAGA, 2002; IDRIS & BUKHARI, 2012). Na imobilização por ligação covalente, a ocorrência de dessorção da enzima durante as reações catalíticas é reduzida devido à forte ligação entre a enzima e o suporte (PERSSON *et al.*, 1990).

Vários reagentes têm sido utilizados para promover a ativação de diversos suportes, permitindo situações muito diferentes. Destes reagentes, o glutaraldeído é um dos mais conhecidos na ativação de suportes aminados e imobilização de enzimas, devido a simplicidade da técnica e a elevada estabilidade da ligação amino-glutaraldeído (BURTEAU *et al.*, 1989; VAN AKEN *et al.*, 2000; DOS REIS-COSTA *et al.*, 2003; MAGNAN *et al.*, 2004; SEYHAN & ALPTEKIN, 2004; BETANCOR *et al.*, 2006b). Em alguns casos, esta técnica permite melhorar a estabilidade da enzima por ligação multiponto ou imobilização de multisubunidades (LAMAS ESTELA *et al.*, 2001; BARROS *et al.*, 2003).

A atividade e estabilidade das enzimas imobilizadas em suportes ativados com glutaraldeído dependem do protocolo de imobilização empregado. Diferentes concentrações de glutaraldeído e tempos de reação podem modificar os grupos amino dos suportes aminados com uma ou duas moléculas de glutaraldeído (monômeros ou dímeros), formando suportes heterofuncionais. Assim, o espaçador mais curto (monômero) pode dar uma maior rigidez, enquanto o mais longo (dímero) pode permitir a reação com mais grupos e, finalmente, a obtenção de melhores resultados (BETANCOR *et al.*, 2006b).

Em relação ao mecanismo de imobilização, a reação de proteínas nestes suportes pré-ativados ocorreria, primeiramente, através da interação iônica de grupos com carga negativa da superfície da proteína com os grupos amino com carga positiva do suporte, seguida pela ligação covalente possibilitada pelos monômeros ou dímeros de glutaraldeído da superfície do suporte com grupos amino da superfície da proteína (BETANCOR *et al.*, 2006b).

Em relação aos suportes para imobilização covalente, disponíveis comercialmente, destaca-se o Eupergit C®, um polímero acrílico epóxido ativado, desenvolvido através da copolimerização de *N,N'*-metileno-bis-metacrilamida, glicidil-metacrilato, alil-glicidil-éter e metacrilamida (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; KNEZEVIC *et al.*, 2006). A estrutura deste suporte e o mecanismo de imobilização covalente de lipases podem ser visualizados na figura 3.

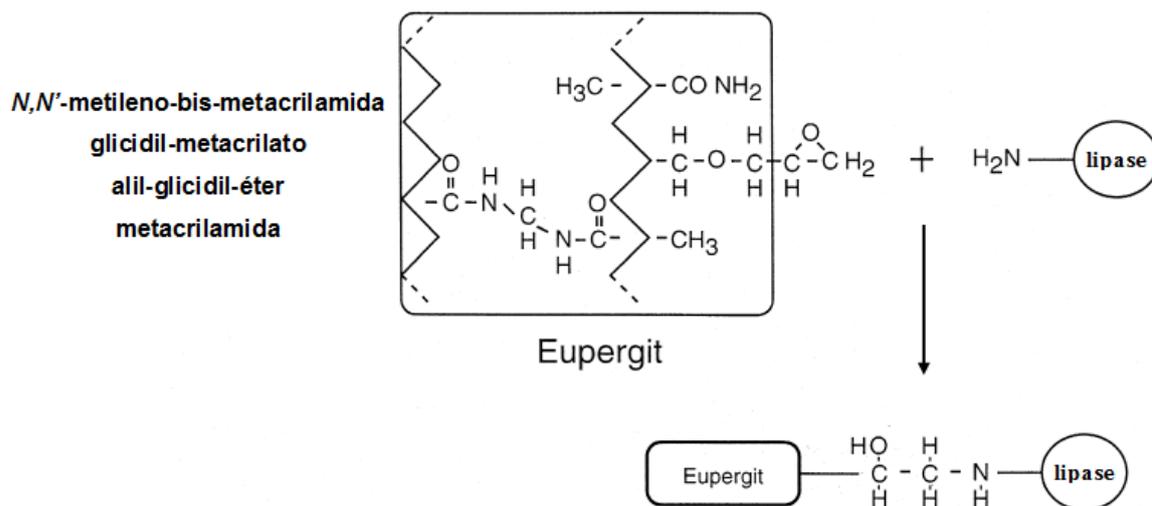


Figura 3: Estrutura do suporte Eupergit C e mecanismo de imobilização covalente de lipases (adaptado de KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER (2000)).

O Eupergit C é um suporte neutro, constituído por microesferas (diâmetro de aproximadamente 150 μm) macroporosas. Devido à sua estrutura, é estável, quimicamente e mecanicamente, ao longo da faixa de pH de 0 a 14. Assim, este suporte pode ligar uma determinada enzima na faixa de pH onde esta é estável e ativa, sem perder sua estabilidade (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000).

Este suporte pode ser empregado na imobilização de enzimas de interesse industrial para aplicação, por exemplo, na produção de insumos finos e fármacos devido à

capacidade de formar ligações covalentes multipontuais muito estáveis, sob condições experimentais muito suaves, como pH neutro (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; MATEO *et al.*, 2000). Um esquema de ligação multipontual pode ser observado na figura 4.

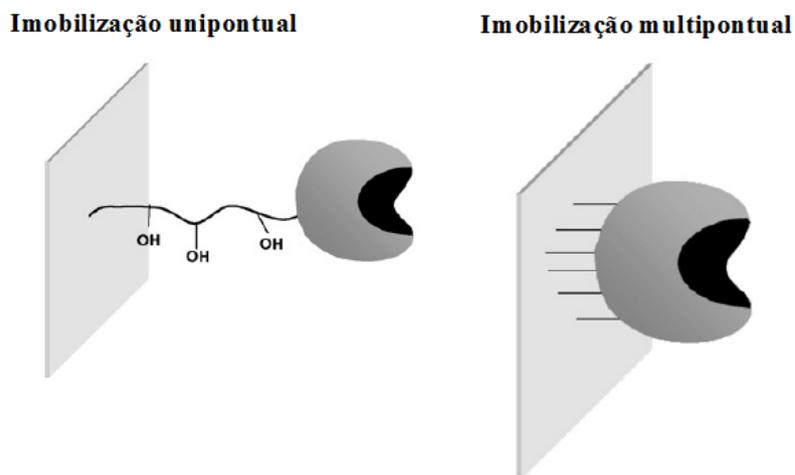


Figura 4: Efeito da imobilização na estabilidade da enzima (adaptado de MATEO *et al.* (2007))

A imobilização de lipases dentro destes suportes porosos pode resultar em aumento da sua estabilidade, devido ao impedimento de processos intermoleculares, como a proteólise e a agregação, e de interações da enzima com as interfaces externas, como solventes orgânicos imiscíveis (GUPTA, 1991; BES *et al.*, 1995; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, RODRIGUEZ & GUISÁN, 1998).

Este tipo de suporte se liga diretamente à enzima através de ligações covalentes formadas através de seus grupos oxirano, que reagem com os grupamentos amino da enzima em condições neutras ou alcalinas, ou com os grupamentos sulfidril e carboxila, na faixa de pH ácido, neutro e alcalino (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; MATEO *et al.*, 2000; KNEZEVIC *et al.*, 2006).

1.6.4 Entrecruzamento

Reagentes bifuncionais, como o glutaraldeído, têm sido utilizados de diversas formas na imobilização de enzimas permitindo situações muito diferentes, como na pré-ativação do suporte e no entrecruzamento da enzima previamente imobilizada em suporte aminado (BURTEAU *et al.*, 1989; VAN AKEN *et al.*, 2000; LAMAS ESTELA *et al.*, 2001; ZHOU & CHEN, 2001; D'SOUZA & KUBAL, 2002; BARROS RUI *et al.*, 2003;

DOS REIS-COSTA *et al.*, 2003; HWANG *et al.*, 2004; MAGNAN *et al.*, 2004; SEYHAN & ALPTEKIN, 2004; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; BETANCOR *et al.*, 2006a; BETANCOR *et al.*, 2006b; YILMAZ *et al.*, 2011). Em termos de estabilização, o entrecruzamento da enzima imobilizada em suporte aminado oferece, em geral, ótimos resultados, porque o glutaraldeído pode promover a modificação de toda a superfície da enzima, ocorrendo a ligação transversal entre as moléculas de enzima, o glutaraldeído e o suporte (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). Este tratamento com glutaraldeído usualmente confere uma maior estabilidade das enzimas em resistir a condições adversas, como temperaturas elevadas (ST CLAIR & NAVIA, 1992; LALONDE, 1997; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

1.7 Lipases

Entre as enzimas de interesse industrial, incluem-se as lipases, que são produzidas, em grande parte, a partir de matérias primas biológicas, mediante bioprocessos (LOUWRIER, 1998). Além de serem encontradas em células animais e vegetais, estas enzimas são produzidas por diferentes microrganismos (SHARMA, CHISTI & BANERJEE, 2001; HASAN, SHAH & HAMEED, 2006).

Pertencem ao grupo das serina hidrolases e, no que se refere a sua atuação, assemelham-se às esterases, diferindo, porém, quanto às interações físico-químicas com seus substratos. Em contraste com as esterases, que agem em substratos solúveis em água, as lipases atuam sobre substratos insolúveis (ALVAREZ-MACARIE *et al.*, 1999).

As lipases são, possivelmente, os biocatalisadores mais utilizados em síntese orgânica. Estas enzimas catalisam *in vivo* a hidrólise de triacilgliceróis, gerando ácidos graxos de cadeia longa e glicerol. As lipases são também capazes de hidrolisar uma ampla variedade de ésteres (KAZLAUSKAS, 2005) e, em condições adequadas (ex. meios não-aquosos), catalisam reações de esterificação e transesterificação, levando à síntese de diferentes ésteres carboxílicos e amidas (KAZLAUSKAS, 2005; XI & XU, 2005; YADAV *et al.*, 2007). As principais reações catalisadas por lipases estão esquematizadas na figura 5.

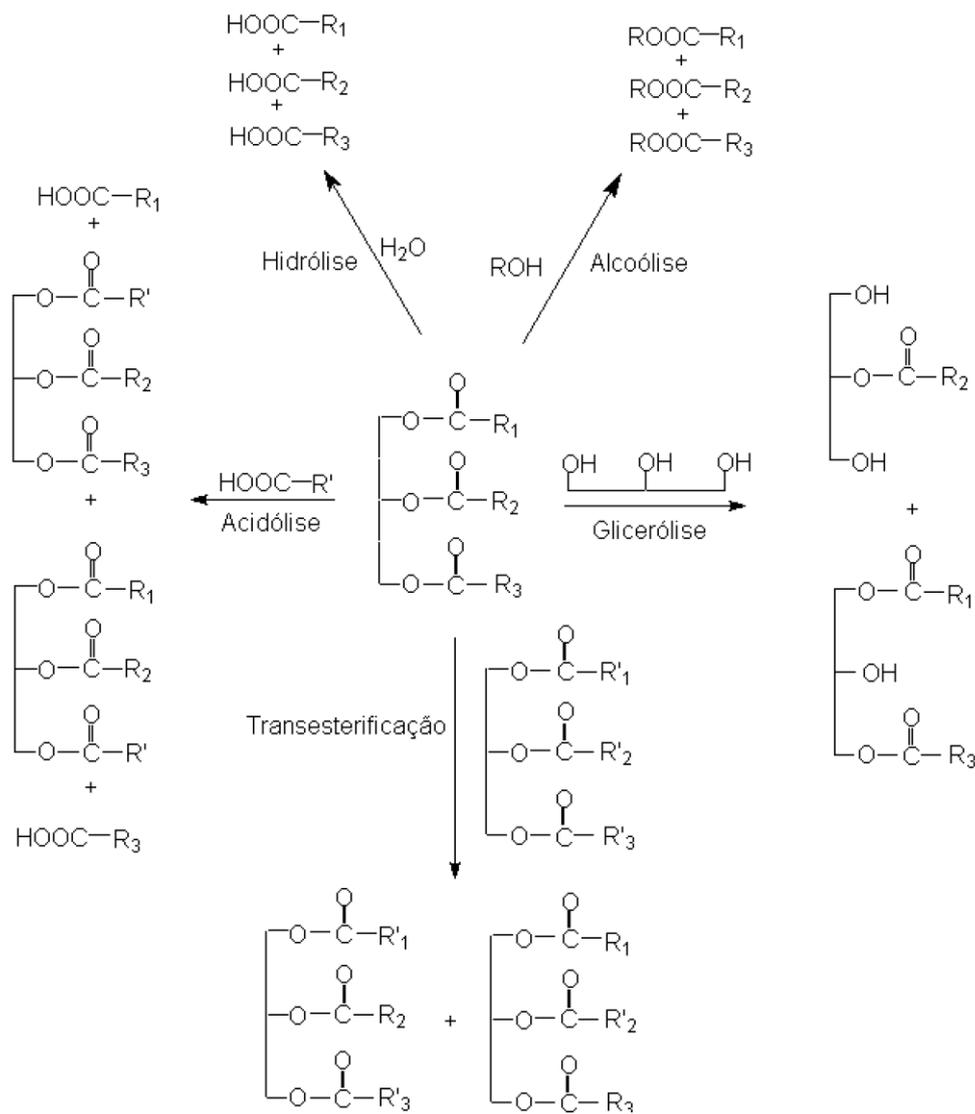


Figura 5: Principais reações catalisadas por lipases (CASTRO *et al.*, 2004).

Dentre as inúmeras aplicações das lipases, tanto na forma nativa (livre), como imobilizada, pode-se destacar: na obtenção de produtos farmacêuticos; na produção de polímeros biodegradáveis; na indústria têxtil, no processo de tingimento; na indústria de detergentes; na indústria de alimentos, no desenvolvimento e na melhoria da qualidade de flavorizantes; em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiomericamente enriquecidos; no setor médico, como ferramenta diagnóstica; na indústria de cosméticos; como biosensores; como desengordurante de couro; no tratamento de resíduos, pela decomposição de lipídios de efluentes; na biodegradação de óleo; na indústria de papel; e na produção de biodiesel (HOSHINO *et al.*, 1990; SANTANIELLO *et al.*, 1992; THEIL, 1995; PANDEY, 1999; SHARMA, CHISTI & BANERJEE, 2001; HASAN *et al.*, 2006).

O interesse pela aplicação industrial das lipases tem origem na pouca especificidade destas enzimas por substratos, que contrasta muitas vezes com elevadas enantio e regioseletividades (KOELLER & WONG, 2001; REETZ, 2002). Estas enzimas têm sido empregadas para produzir intermediários para sínteses orgânicas, incluindo-se entre estas a resolução de misturas racêmicas (GOTOR-FERNANDEZ, BRIEVA & GOTOR, 2006; LI, ZONG & MA, 2009).

1.8 Estrutura e mecanismo de ação das lipases

A estrutura e o mecanismo de ação das lipases vêm sendo esclarecidos mediante o uso de técnicas clássicas de raios-X e técnicas avançadas de ressonância magnética nuclear (RMN) (PAULA *et al.*, 2008), entre outras. Na maioria destas enzimas o sítio ativo é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004). O sítio ativo das lipases é cercado por áreas hidrofóbicas.

Por meio de técnicas cristalográficas foi verificada a ocorrência de diferentes conformações de lipases (GROCHULSKI *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1997; BRZOZOWSKI *et al.*, 2000; NARDINI *et al.*, 2000; MANCHEÑO *et al.*, 2003), o que levou à compreensão de certas peculiaridades do mecanismo de ação destas enzimas. Em meios aquosos homogêneos, a lipase apresenta uma estrutura em que o sítio ativo está totalmente isolado do meio reacional por uma cadeia polipeptídica, a “tampa”, a qual impede o acesso do substrato ao sítio ativo. A tampa possui resíduos hidrofóbicos em sua face interna, os quais interagem com as regiões hidrofóbicas em torno do sítio ativo quando a enzima está na conformação fechada, inativa. Por outro lado, quando a enzima está na presença de interfaces hidrofóbicas predomina uma conformação totalmente distinta. A tampa se desloca, interagindo por meio de ligações salinas, ligações de hidrogênio, entre outras, com outra região da superfície da lipase, deixando o sítio ativo da enzima livre e acessível a seus substratos, originando a conformação aberta (ativa) da enzima. Desta forma, ocorre a “ativação interfacial” (SARDA & DESNUELLE, 1958; MILED *et al.*, 2001; PALOMO *et al.*, 2004) da lipase, que está representada na figura 6.

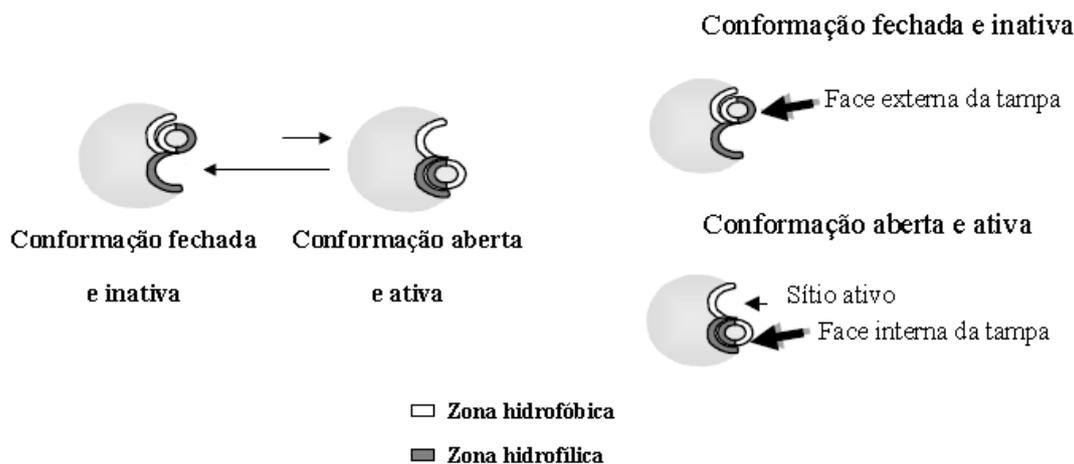


Figura 6: Ativação interfacial de lipases (adaptado de PALOMO *et al.* (2004)).

Na presença de uma interface hidrofóbica, as lipases sofrem a ativação interfacial, ocorrendo a fixação da conformação aberta sobre esta interface, possibilitada pelo deslocamento da tampa. As lipases podem, portanto, atuar em interfaces ou em superfícies hidrofóbicas. Como os substratos naturais das lipases são os óleos e gorduras, a atividade em interface é um requerimento importante para a função biológica destas enzimas (SARDA & DESNUELLE, 1958; MILED *et al.*, 2001; PALOMO *et al.*, 2004).

A conformação aberta das lipases apresenta um grande bolso hidrofóbico, constituído pela face interna da tampa e por uma região hidrofóbica que circunda o sítio ativo. A existência deste bolso hidrofóbico faz com que as lipases possuam grande afinidade pela superfície hidrofóbica de seus substratos naturais e, também, com que a conformação aberta das lipases tenha grande afinidade por qualquer superfície hidrofóbica. De fato, as lipases podem se adsorver a diferentes estruturas hidrofóbicas: gotas de óleo (BASRI *et al.*, 1995), suportes hidrofóbicos (SUGIURA & ISOBE, 1976), bolhas de ar (SUGIURA & ISOBE, 1975), além de proteínas hidrofóbicas, inclusive outras moléculas de lipase (PALOMO *et al.*, 2004).

Por outro lado, as lipases também apresentam atividade catalítica em meios aquosos, comparável à atividade de esterases não lipásicas, em muitos casos. Isto pode ser explicado pela existência de um equilíbrio entre a conformação fechada e a(s) conformação(ões) aberta(s) das lipases, em sistemas aquosos homogêneos, que lhes permitiria serem cataliticamente ativas mesmo na ausência de interfaces (BRADY *et al.*, 1990; DEREWENDA *et al.*, 1992). A ocorrência desse equilíbrio abre alternativas para o desenho e controle das biotransformações catalisadas por estas enzimas.

O complexo mecanismo catalítico das lipases torna possível pensar que a alteração da abertura e do fechamento da proteína ou, mesmo, da forma exata da conformação aberta da enzima, poderia ocasionar uma modificação nas propriedades catalíticas da mesma. Desta forma, a possibilidade de controlar e modular este equilíbrio entre as formas, fechada e aberta, pode ser uma poderosa ferramenta para o aprimoramento das propriedades das lipases como enzimas de interesse industrial, especialmente para aplicações em síntese orgânica (PALOMO *et al.*, 2006).

1.9 Características das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei*

Entre as lipases de diferentes fontes, a de *Candida rugosa* (anteriormente *Candida cylindracea*) (Figura 7) tem despertado interesse devido à alta atividade e especificidade, sendo uma das lipases mais utilizadas em biotransformações (MARÍA *et al.*, 2006; YONG *et al.*, 2008). A princípio foram identificadas 2 isoformas desta enzima (TOMIZUKA, OTA & YAMADA, 1966; SHAW, CHENG & WANG, 1989; VEERARAGAVAN & GIBBS, 1989; BRAHIMI-HORN *et al.*, 1990; WU, GUO & SIH, 1990) mas, atualmente, são conhecidas sete isoformas (Lip1 a Lip7), das quais cinco foram caracterizadas bioquimicamente, Lip1 a Lip5 (LOTTI *et al.*, 1994a, LOTTI *et al.*, 1994b; BROCCA *et al.*, 1995; LOTTI & ALBERGHINA, 1996). Essas isoformas são compostas por 534 aminoácidos, possuem pesos moleculares de aproximadamente 60 KDa, ponto isoelétrico (pI) de 4,3 e compartilham mais de 70% de homologia (MARÍA *et al.*, 2006). Apesar de estruturalmente semelhantes, as isoformas possuem perfis enzimáticos diferentes e, por este motivo, é comum a falta de reprodutibilidade de resultados quando se trabalha com preparações enzimáticas não purificadas (AKOH, LEE & SHAW, 2004; ALCÁNTARA *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2004).

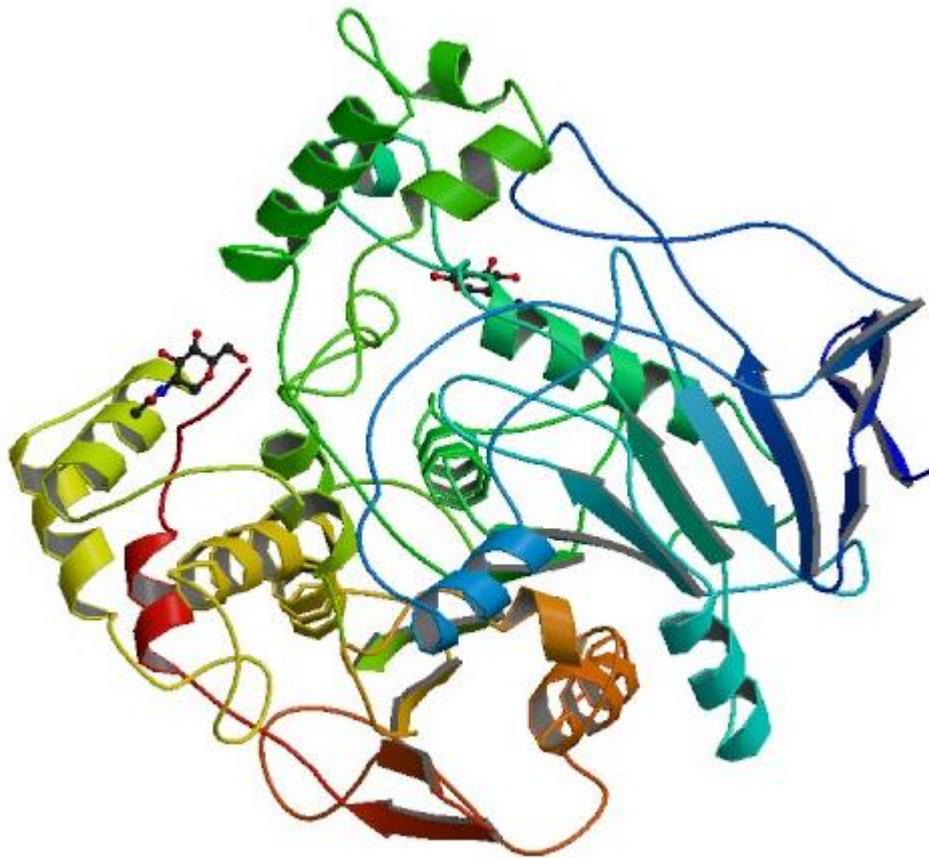


Figura 7: Estrutura da lipase de *Candida rugosa* (Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1TRH>).

As isoformas Lip1, Lip2 e Lip3 possuem tamanho molecular de 64, 62 e 60 KDa, respectivamente e são muito ativas a 35-40 °C e pH 7-8 (BENJAMIN & PANDEY, 2000). Estas três isoformas diferem em relação à especificidade, hidrofobicidade e pI (RÚA *et al.*, 1993).

A lipase Lip1 possui maior afinidade por ésteres de cadeia longa, enquanto que Lip2 e Lip3 hidrolisam ésteres de cadeia curta solúveis em água (MARÍA *et al.*, 2006). A Lip3 possui a maior atividade na hidrólise de diferentes ésteres de *p*-nitrofenila (LÓPEZ *et al.*, 2004). Em relação à purificação, a Lip1 e a Lip3 podem ser isoladas por um simples processo cromatográfico (LOTTI *et al.*, 1993).

Outra lipase, disponível comercialmente na forma solúvel, com alta atividade e boa estabilidade em condições diversas, é a lipase de *Rhizomucor miehei*, anteriormente *Mucor miehei* (RODRIGUES & FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010). Esta lipase já teve a sua estrutura 3D determinada por cristalografia de raios-X (Figura 8) (DEREWENDA,

DEREWENDA & DODSON, 1992; DEREWENDA, DEREWENDA & DODSON, 1992), possui um tamanho molecular de 31,6 KDa e um ponto isolétrico (pI) de 3,8, tendo sido ligada em diversos suportes, por diferentes protocolos de imobilização (RODRIGUES & FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010).



Figura 8: Estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei* (Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=3TGL>).

As lipases de *C. rugosa* e *R.miehei* diferem na geometria dos seus sítios ativos e por esta razão estão classificadas em sub-grupos distintos (PLEISS, FISCHER & SCHMID, 1998; NAIK *et al.*, 2010). A lipase de *Candida rugosa* possui sítio ativo do tipo túnel, enquanto que a lipase de *Rhizomucor miehei* possui sítio ativo do tipo fenda (PLEISS, FISCHER & SCHMID, 1998; NAIK *et al.*, 2010).

1.10 Utilização de lipases para a resolução estereosseletiva de aminoálcoois

Os ligantes de receptores beta-adrenérgicos constituem uma classe de grande relevância terapêutica, a qual inclui alguns compostos como as ariloxipropanolaminas (ex. propranolol e atenolol) e as ariletanolaminas (ex. nifenalol e sotalol) (KAPOOR *et al.*, 2003; KAPOOR *et al.*, 2005). Estes aminoálcoois desempenham um importante papel no tratamento de uma grande variedade de doenças, incluindo a hipertensão e doenças cardiovasculares. Esta atividade é fortemente dependente da estereoquímica do carbono carbinólico. Estes compostos ligam-se seletivamente aos receptores β -adrenérgicos, sendo que o enantiômero S é o principal responsável pela atividade β -bloqueadora, enquanto que o enantiômero R tem como efeitos colaterais a bronco-constricção, piorando o quadro de asma em pacientes propensos, e a diabetes (BARRET, 1985; LIMA, 1997; AVILA *et al.*, 2005; GOODMAN & GILLMAN, 2005). Neste contexto, a resolução de intermediários racêmicos é fundamental para a preparação do isômero ativo/mais ativo de compostos desta classe.

A utilização de lipases em resolução cinética de intermediários de síntese de ariloxipropanolaminas, ligantes de receptores beta-adrenérgicos, foi reportada por alguns autores. Kapoor e colaboradores (2003) obtiveram, em alto grau de pureza ótica, via hidrólise estereosseletiva utilizando lipases, os isômeros (R)- e (S)-1-cloro-3-(1-naftiloxi)-2-propanol, intermediários de síntese de fármacos como propranolol e nadoxolol.

Por outro lado, para compostos da classe das ariletanolaminas, como nifenalol e sotalol, também ligantes de receptores beta-adrenérgicos, verificou-se que somente o (R)-nifenalol e o (S)-sotalol são efetivos no tratamento de doenças cardiovasculares. Kapoor e colaboradores (2005) obtiveram os enantiômeros (R)- e (S)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol, precursores de (R)-nifenalol e (S)-sotalol, respectivamente, através de uma reação de transesterificação altamente eficiente, utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia*.

Barbosa e colaboradores (2010) investigaram a enantiosseletividade de derivados imobilizados da lipase de *Candida antarctica B* na resolução cinética da mistura racêmica de propranolol em meio orgânico. Estes pesquisadores obtiveram elevada enantiosseletividade ($E = 57$) com excesso enantiomérico de 96% para o enantiômero R, quando foi utilizado suporte com grupos epóxi para a imobilização da lipase.

A lipase de *Pseudomonas cepacia* foi utilizada com sucesso na síntese de álcoois opticamente ativos, através de reações de acilação em solventes orgânicos. Esta lipase

demonstrou uma elevada estereosseletividade ($E > 100$) na síntese de (S)-propranolol (MARGOLIN, 1993).

1.11 Aplicações do ácido mandélico como precursor de síntese de fármacos

Há um aumento da demanda para a separação de compostos racêmicos nos seus constituintes quirais em diversas indústrias, como nas farmacêutica e bioquímica, devido ao reconhecimento das diferenças na atividade farmacológica dos enantiômeros (MAO *et al.*, 2012).

Os ácidos α -hidroxicarboxílicos aromáticos são importantes intermediários para a síntese de diversos produtos farmacêuticos (COPPOLA & SCHUSTER, 1997; GROEGER, 2001). O ácido mandélico e seus ésteres são considerados os representantes mais importantes dessa classe de compostos, do ponto de vista comercial (GROEGER, 2001; CAMPBELL *et al.*, 2003). O ácido (R)-mandélico é tanto um precursor para síntese de diversos fármacos, como por exemplo, dos antibióticos penicilina e cefalosporina (WANG & TSAI, 2005), de agentes anti-tumorais e anti-obesidade (YADAV & SIVAKUMAR, 2004), quanto um agente de resolução em processos quirais. O ácido mandélico enantiomericamente puro e seus derivados são intermediários para a resolução de compostos racêmicos, como alcoóis e aminas (WHITESELL & REYNOLDS, 1983; HANSEN *et al.*, 2009; SCHRAMM & CHRISTOFFERS, 2009).

Devido as possibilidades de aplicação do ácido mandélico nas indústrias farmacêutica e de química fina, a síntese deste composto enantiomericamente puro tem sido investigada através de cristalização diastereomérica (WEHTJE, ADLERCREUTZ & MATTIASSON, 1990), síntese assimétrica e resolução cinética (HSU *et al.*, 1990), e rotas químico-enzimáticas (PALOMO *et al.*, 2002b). Para a produção de ácidos α -hidroxicarboxílicos enantiomericamente puros, várias rotas biológicas envolvendo lipases (EBERT *et al.*, 1992; PALOMO *et al.*, 2002a), esterases (YADAV & SIVAKUMAR, 2004), mandelato desidrogenases (YAMAZAKI, YOSHIMITSU & MAEDA, 1986; HUMMEL, SCHUTTE & KULA, 1989; REIKO & TOORU, 1994) e mandelato racemases (STRAUSS & FABER, 1999) tem sido investigadas. A figura 9 representa um exemplo de hidrólise estereosseletiva de mandelato de etila para a produção de ácido (R)-mandélico.

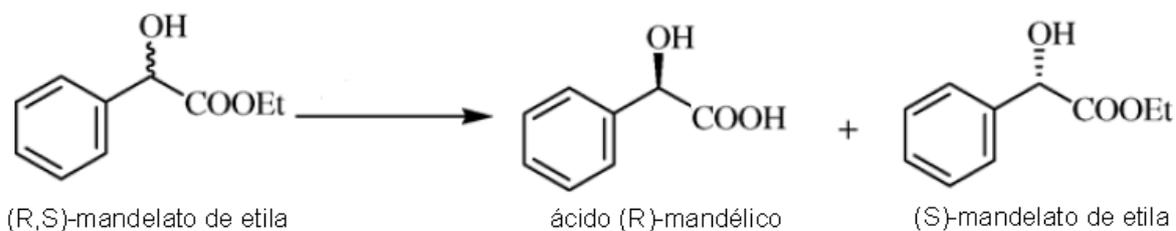


Figura 9: Exemplo de hidrólise estereosseletiva de mandelato de etila (adaptado de WANG & TSAI (2005)).

2. JUSTIFICATIVA

As lipases têm sido intensamente investigadas como alternativas para novas biotransformações. Entretanto, a exploração comercial destas enzimas ainda está muito aquém de suas reais potencialidades, representando um mercado com grandes perspectivas de crescimento. Por outro lado, ainda não existem biocatalisadores com o grau de enantiosseletividade adequado para a conversão de uma ampla gama de substratos orgânicos. Portanto, abordagens que visem à obtenção de biocatalisadores com alta enantiosseletividade para uso em reações específicas são de grande relevância.

Uma vez que as lipases, em sistemas homogêneos, estão em um equilíbrio entre a conformação fechada e a(s) conformação(ões) aberta(as), é possível observar atividade catalítica mesmo na ausência de interfaces. Desta forma, estratégias que permitam restringir as mudanças conformacionais envolvidas na catálise enzimática, por meio de modificações químico-estruturais, e possibilitem a alteração da forma exata do sítio ativo da lipase podem resultar em alterações importantes em termos de especificidade e enantiosseletividade.

Assim, a alteração deste equilíbrio pode ocorrer mediante o uso de diferentes metodologias químicas, tais como: a modificação química com reagentes que atuem sobre resíduos específicos da proteína, como lisina, cisteína ou ácido glutâmico; a imobilização de enzimas (engenharia do derivado) envolvendo diferentes áreas da proteína, em que seja possível controlar a orientação da lipase sobre o suporte, a rigidez das lipases imobilizadas e os microambientes que rodeiam as moléculas imobilizadas da enzima; a insolubilização por entrecruzamento protéico mediante o uso de reagentes bifuncionais, tais como o glutaraldeído, que reagem com os resíduos de lisina das lipases. Estas diferentes

abordagens podem promover modificações no mecanismo de abertura e fechamento da lipase, dando origem a alterações na forma exata da conformação aberta (ativa) final, efeito este que poderá ser refletido em modificações das propriedades de atividade e seletividade (enantio ou regioseletividade) da enzima.

Adicionalmente, uma mudança nas condições de reação (engenharia de reação) pode ter um grande efeito sobre as propriedades catalíticas das lipases, possivelmente em decorrência da modificação produzida sobre as interações globais das conformações presentes no equilíbrio (aberta e fechada), levando uma vez mais à mudança da forma exata da conformação aberta da enzima.

Em resumo, os efeitos causados por estas estratégias de “engenharia conformacional de proteínas” modulariam as propriedades da enzima e resultariam em alterações na atividade, estabilidade e seletividade (enantio ou regioseletividade) das lipases (MATEO *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de novas formulações de lipases fúngicas, utilizando estratégias de modificação químico-estrutural que permitam aprimorar a enantioseletividade destas enzimas para aplicação na resolução cinética de moléculas quirais de interesse farmacêutico e, também, estratégias que permitam obter biocatalisadores com estabilidade aumentada para aplicação na indústria farmacêutica.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar a modificação de dois tipos de lipases fúngicas mediante sua imobilização sobre diferentes suportes poliméricos.
- Caracterizar os biocatalisadores produzidos quanto à atividade, estabilidade e seletividade.
- Avaliar a eficiência dos diferentes biocatalisadores obtidos em reações de resolução cinética de mandelato de etila (reações de hidrólise).

- Selecionar o(s) melhor(es) biocatalisador(es) em função dos valores de rendimento, razão enantiomérica (E) e estereosseletividades obtidos.

Para tanto, serão utilizadas as lipases de *Candida rugosa* e de *Rhizomucor miehei*, obtidas comercialmente.

Serão utilizadas reações de hidrólise de mandelato de etila como modelo de estudo da enantiosseletividade das preparações de lipases imobilizadas obtidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e produtos químicos

Para as análises de atividade lipásica pelo método titulométrico foi utilizado azeite de oliva da marca Andorinha, para manter o mesmo índice de acidez. Etanol, acetona e nitrato de prata foram fornecidos pela Isofar. Dodecil sulfato de sódio, persulfato de amônio, hidróxido de sódio, iodo ressublimado e iodeto de potássio foram obtidos da Reagen. Fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, cloreto de sódio e fenolftaleína foram adquiridos da Vetec. Acrilamida, bisacrilamida, TEMED, ditiotreitol, glicerol, glicina, formaldeído, albumina de soro bovino, laurato de *p*-nitrofenila, reagente de Bradford, triton X-100, o suporte aminado DEAE-Sephacel e o suporte epóxi Eupergit C® foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. Glutaraldeído foi fornecido pela Mallinckrodt Chemicals. Os suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose e os padrões de massa molecular para eletroforese foram fornecidos pela GE Healthcare. Goma arábica foi obtida da Proquímios. Tris foi adquirido da GIBCOBRL. Éter etílico foi adquirido da Controltec. Acetonitrila, isopropanol, n-hexano e ácido trifluoroacético foram adquiridos da Tedia.

Metanol, butanol, ácido acético, ácido tricloacético, fosfato de amônio monobásico, bissulfito de sódio, carbonato de sódio, ferricianeto de potássio, tiosulfato de sódio e azul de bromofenol foram obtidos de diversas procedências, sendo todos de grau analítico.

4.1.2 Lipases

As lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram obtidas comercialmente (Fluka e Sigma-Aldrich, respectivamente) e mantidas refrigeradas (4 °C) até o momento da diluição em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5.

Após a diluição, as lipases foram dialisadas por 48 h em tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, com troca de tampão duas vezes ao dia. Em seguida, as lipases foram centrifugadas a 12000 rpm (Sorvall Legend XTR Centrifuge, Thermo Scientific) por 15 min, a 4 °C.

4.2 Métodos

4.2.1 Ensaios de atividade enzimática

4.2.1.1 Método Titulométrico

As atividades das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram determinadas utilizando um meio reacional constituído por 5 mL de emulsão de óleo de oliva (20%, v/v) em goma arábica 5% (p/v) e um volume adequado de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5 (DELLAMORA-ORTIZ *et al.*, 1997) para atingir 10 mL de mistura reacional.

As reações enzimáticas foram realizadas a 30 °C e 37 °C (para as lipases de *Rhizomucor miehei* e *Candida rugosa*, respectivamente), sob agitação magnética, sendo iniciadas com a adição de diferentes volumes da preparação enzimática. Após 15 minutos de incubação, as reações foram interrompidas com a adição de 10 mL de uma mistura paralisante de etanol/acetona (1:1). Foram preparados brancos, pela adição da mistura paralisante (etanol/acetona 1:1) ao meio reacional, antes da adição da preparação enzimática (inativação da enzima). A atividade foi medida pela titulação dos ácidos graxos liberados com solução de NaOH 0,02 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade enzimática (IU) corresponde à quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições experimentais estabelecidas.

4.2.1.2 Método Espectrofotométrico – Hidrólise de laurato de *p*-nitrofenila

Uma solução contendo 0,018 g de laurato de *p*-nitrofenila (*p*-NFL, PM = 321,4 g/Mol) em 1,0 mL de etanol foi utilizada como substrato. Desta solução, uma alíquota de 0,1 mL foi diluída em 9,9 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. A reação foi realizada com adição da preparação enzimática em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 a 0,9 mL da solução diluída de *p*-NFL, até completar 1,0 mL de volume total (PEREIRA-MEIRELLES, ROCHA-LEÃO & SANT'ANNA, 1997).

A absorbância do produto formado, no decorrer da reação enzimática, foi medida a 348 nm, em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific), por um intervalo de tempo de 2 minutos, sendo a leitura realizada a cada 5 segundos. Foram preparados ensaios em branco, substituindo-se a preparação enzimática pelo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0.

A quantificação do *p*-nitrofenol liberado pela reação enzimática foi realizada através da construção da curva padrão de *p*-nitrofenol (PM = 139,11g/Mol) (Anexo 1), que determina o fator de conversão dos valores de absorbância a 348 nm em concentração de *p*-nitrofenol ($\mu\text{moles/mL}$).

Uma unidade de atividade enzimática (1U) corresponde à quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições experimentais estabelecidas.

4.2.2 Determinação do teor de proteína

As concentrações de proteína das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foi determinada segundo Bradford (1976).

O teor de proteínas pôde ser quantificado a partir dos valores de absorbância, que foram convertidos em concentração de proteína utilizando-se o fator obtido a partir de uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) (Anexo 2).

4.2.3 Determinação da concentração de glutaraldeído

Para determinar a concentração de glutaraldeído em solução foi utilizado o procedimento descrito por Frigerio & Shaw (1968). A solução de glutaraldeído 25% (v/v) foi diluída para uma concentração de 5% (v/v). Uma alíquota de 1,0 mL da solução diluída de glutaraldeído reagiu por 10 minutos com 20 mL de bissulfito de sódio 0,25 M (NaHSO_3). Em seguida, o bissulfito que não reagiu com o glutaraldeído formando

complexo foi titulado com solução de iodo/iodeto 0,1 M. Foi realizado ensaio em branco pela substituição da solução de glutaraldeído por água destilada. A concentração de glutaraldeído foi determinada pela seguinte fórmula (FRIGERIO & SHAW, 1968):

$$\% \text{ GA (w/v)} = \frac{(I) (V_2 - V_1) (100.12) (100)}{2 S}$$

Onde:

I = concentração iodo/iodeto expressa em moles por mililitro.

V₂ = mililitros de iodo usados na titulação em branco.

V₁ = mililitros de iodo usados na titulação da amostra

S = volume da amostra.

4.2.4 Obtenção dos biocatalisadores imobilizados

4.2.4.1 Imobilização por adsorção a suporte aminado

As lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram incubadas por 1 h na presença de Triton X-100 0,005%. Em seguida, 6 g do suporte DEAE-Sephacel foram incubados com 30 mL de cada uma das preparações de lipase de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* (PESELA *et al.*, 2003; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). A adsorção foi realizada na presença de tampão fosfato de potássio 25 mM em pH 7,0 e 25 °C. Durante a adsorção foram retiradas alíquotas do sobrenadante, em diferentes tempos de imobilização, para determinação da atividade enzimática e do teor de proteína nos sobrenadantes. Após 90 min, os derivados foram lavados com tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7,0. A atividade lipásica dos sobrenadantes e dos derivados enzimáticos foi determinada pelo método espectrofotométrico anteriormente descrito. Os derivados obtidos foram estocados a 4 °C.

4.2.4.2 Dessorção da lipase adsorvida no suporte aminado

Em um tubo contendo 1 g da enzima imobilizada no suporte DEAE-Sephacel foram adicionados 5,0 mL de concentrações crescentes de NaCl, em tampão fosfato de potássio

25 mM, pH 7,0 (PESSELA *et al.*, 2003). Após 30 min a 25 °C, o sobrenadante foi retirado para determinação da atividade enzimática, pelo método espectrofotométrico e, também, do teor de proteína.

4.2.4.3 Capacidade de carga do suporte aminado na adsorção

As lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram incubadas por 1 h na presença de Triton X-100 0,005%. Em seguida, 250 mg do suporte DEAE-Sephacel foram incubados com 1,25 mL de diferentes concentrações destas preparações enzimáticas (PESSELA *et al.*, 2003; LÓPEZ-GALLEGU *et al.*, 2005). A adsorção foi realizada na presença de tampão fosfato de potássio 25 mM, em pH 7,0 e 25 °C. Após 90 min, foram retiradas alíquotas do sobrenadante para determinação da atividade enzimática, bem como do teor de proteína. A atividade lipásica foi verificada pelo método espectrofotométrico. Os derivados foram lavados com tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7,0, e ressuspendidos no mesmo tampão para determinação da atividade enzimática pelo método espectrofotométrico.

4.2.4.4 Imobilização por adsorção a suportes hidrofóbicos

A reação de imobilização foi iniciada com a adição de 100 mL da preparação enzimática de *C. rugosa* ou de *R. miehei*, diluída em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, a 1 g dos suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose (VOLPATO, 2009). Durante a adsorção foram retiradas alíquotas do sobrenadante, em diferentes tempos de imobilização, para determinação de sua atividade enzimática e do seu teor de proteína.

Após 1 h de reação a 4 °C, os derivados foram lavados com tampão fosfato 10 mM pH 7,0. A atividade lipásica dos sobrenadantes e dos derivados enzimáticos foi determinada pelo método descrito anteriormente. Os derivados obtidos foram estocados a 4 °C.

4.2.4.5 Imobilização covalente em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído

O suporte DEAE-Sephacel foi pré-ativado com duas concentrações diferentes de glutaraldeído de acordo com os protocolos reportados por Betancor e colaboradores (2006a, 2006b).

Em cada tubo contendo 5 g do suporte foram adicionados 20 mL de glutaraldeído a 0,5% (v/v) ou a 15% (v/v), diluídos em tampão fosfato 200 mM pH 7,0.

Após 1 h de reação a 25 °C, os suportes incubados com glutaraldeído a 0,5% foram lavados, exaustivamente, com tampão fosfato 25 mM pH 7,0, seguido de água milli-Q e filtrados a vácuo.

A reação de imobilização foi iniciada com a adição de 10 mL da preparação enzimática, diluída em tampão fosfato 5 mM pH 7,0, previamente incubada com Triton X-100 a 0,005% (v/v) por 1 h, ao suporte pré-ativado.

Durante a adsorção foram retiradas alíquotas do sobrenadante em diferentes tempos de imobilização para determinação da atividade enzimática e do teor de proteína. Após 90 minutos, os derivados foram lavados com tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7,0. A atividade lipásica dos sobrenadantes de imobilização e dos derivados enzimáticos foi determinada pelo método descrito anteriormente. Os derivados obtidos foram estocados a 4 °C.

Após 15 horas de reação a 25 °C, os suportes incubados com glutaraldeído a 15% (v/v) foram lavados, exaustivamente, com tampão fosfato 25 mM pH 7,0, seguido de água milli-Q e filtrados a vácuo.

Os procedimentos de imobilização, de determinação da atividade lipásica e do teor de proteína foram semelhantes aos utilizados para os suportes pré-ativados com glutaraldeído a 0,5 %. Da mesma forma, os derivados obtidos foram estocados a 4 °C.

4.2.4.6 Imobilização covalente em suportes epóxido (Eupergit C)

A reação de imobilização foi iniciada com a adição de 100 mL da preparação enzimática de *C. rugosa* ou de *R. miehei*, diluída em tampão fosfato 1 M pH 7,0, a 1 g do suporte (KNEZEVIC *et al.*, 2006). Durante a reação foram retiradas alíquotas do sobrenadante para determinação da atividade enzimática e do teor de proteína.

Após 4 h de reação a 4 °C, os derivados foram lavados com tampão fosfato 25 mM pH 7,0. A atividade lipásica dos sobrenadantes e dos derivados enzimáticos foi determinada pelo método espectrofotométrico. Os derivados obtidos foram estocados a 4 °C.

4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise das preparações enzimáticas foi realizada, antes e após os processos de imobilização, por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970).

As amostras contendo quantidades conhecidas de proteínas foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, contendo SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), ditioneitol 0,1 M, azul de bromofenol 0,2% (p/v)), fervidas por 5 minutos, centrifugadas (centrífuga Mini Spin, Eppendorf) e aplicadas no gel.

Para este sistema de eletroforese foi utilizado um gel de resolução (10% de acrilamida) e um gel de empacotamento (5% de acrilamida). Inicialmente, o sistema foi submetido a uma corrente de 45 V até o final do gel de empacotamento e, a partir do gel de resolução, o sistema foi submetido a uma corrente de 120 V.

Foi utilizado um padrão de massa molecular (GE Healthcare) contendo as seguintes proteínas: fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20,1 KDa) e α -lactalbumina (14,4 KDa).

Após a corrida, os géis foram corados pela prata para visualização das proteínas, de acordo com protocolo descrito na literatura (MERRIL, 1990).

A partir das massas moleculares e das mobilidades eletroforéticas relativas dos padrões (distância de migração da proteína em relação à distância de migração do corante do tampão de amostra) foram construídos gráficos para estimar as massas moleculares das lipases (Anexos 3 e 4).

4.2.6 Cálculo de rendimento de imobilização e atividade recuperada

Os parâmetros rendimento de imobilização e atividade recuperada foram calculados para avaliação da técnica de imobilização. O rendimento de imobilização expressa a quantidade de lipase, teoricamente imobilizada, enquanto a atividade recuperada é a relação de quanto, destas enzimas, se encontram ativas (BRÍGIDA, 2010).

O rendimento de imobilização e atividade recuperada foram obtidos pelas seguintes fórmulas (BRÍGIDA, 2010):

$$R(\%) = \left(1 - \frac{At_s}{At_b}\right) * 100$$

$$At_{recuperada} = \frac{At_d}{\frac{At_0}{Ms} * R} * 100$$

Onde:

R = rendimento de imobilização

$At_{recuperada}$ = atividade recuperada no derivado

At_s = atividade lipásica medida no sobrenadante após um dado período de imobilização (U)

At_b = atividade lipásica medida na preparação enzimática após o mesmo tempo de imobilização (U)

At_d = atividade lipásica medida no derivado (U/g)

At_0 = atividade lipásica na preparação enzimática (U)

M_s = massa do derivado (g)

4.2.7 Caracterização dos biocatalisadores

Os derivados enzimáticos foram avaliados quanto à atividade, seletividade e estabilidade, em diferentes condições.

4.2.8 Hidrólise enzimática do mandelato de etila

O mandelato de etila foi inicialmente dissolvido em 1 mL de DMSO e, em seguida, foi adicionado tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7,0 em quantidade suficiente para completar o volume final de 20 mL e obter uma concentração final de substrato de 10 mM. Os derivados selecionados foram incubados com 15 mL deste substrato e as reações de hidrólise foram conduzidas a 25 °C. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas nos tempos 0, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h e 30 h, paralisadas por filtração e imediatamente congeladas (TICOM, 2003).

4.2.9 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos produtos das reações de hidrólise enzimática

O grau de hidrólise (conversão) foi determinado por CLAE em fase reversa em cromatógrafo Shimadzu composto de forno (CTO-20A), injetor automático (SIL-30AC) e bomba (SIL-30AD), acoplado a detectores de rede de fotodiodos UV/Vis (Shimadzu SPD-M20A), utilizando o software LCSolutions. Para estes ensaios foi utilizada uma coluna Kromasil C18 100-5 (150 × 4,6 mm). A fase móvel foi constituída por tampão fosfato de amônio 10 mM pH 2,95 e acetonitrila (80:20 v/v nos primeiros 5 minutos, variando de 80:20 a 70:30 no minuto seguinte e permanecendo a 70:30 por mais 9 minutos, quando então retornava à concentração inicial para começar uma nova injeção), em fluxo de 1,2 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção de UV realizada a 225 nm (adaptado de VOLPATO, 2009).

4.2.10 Determinação da concentração dos isômeros do ácido mandélico por CLAE em coluna quiral

A análise dos isômeros do ácido mandélico foi realizada por CLAE em fase normal em cromatógrafo Elite LaChrom, composto de forno (L-2300), injetor automático (L-2200) e bomba (L-2130), acoplado a detectores de rede de fotodiodos UV/Vis (Elite LaChrom L-2455), utilizando o software EZChrom Elite. Para estes ensaios foi utilizada uma coluna quiral Kromasil CelluCoat 5 (250 x 4,6 mm). A fase móvel foi constituída por uma mistura isocrática de n-hexano acidificado com 0,1% de ácido trifluoroacético e isopropanol (90:10 v/v), em fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção de UV realizada a 230 nm (adaptado de ZHOU *et al.*, 2013).

4.2.11 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism®* para Windows (La Jolla, CA, EUA), através de análise de variância ANOVA unifatorial, na qual os resultados são considerados significativos quando a probabilidade é inferior a 5 % ($p < 0,05$ / intervalo de confiança de 95 %) e teste t de Student com nível de significância $\alpha = 0,05$ (intervalo de confiança de 95 %).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito da variação da concentração de enzima sobre a atividade lipásica

Para investigar o efeito da concentração de proteína sobre a atividade das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram utilizados os métodos titulométrico e espectrofotométrico. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 10 e 11.

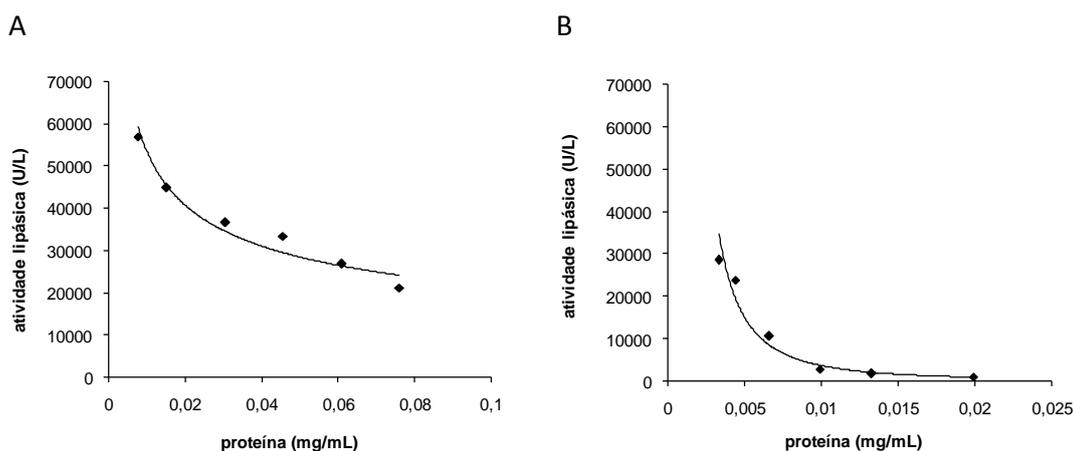


Figura 10: Efeito da concentração de proteína sobre a atividade da lipase de *Candida rugosa*, determinada pelos métodos titulométrico (A) e espectrofotométrico (B).

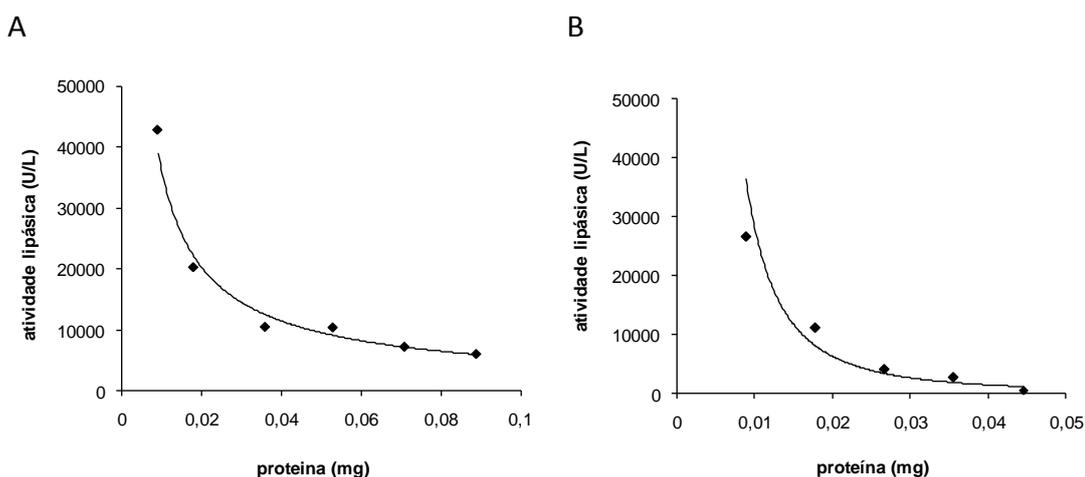


Figura 11: Efeito da concentração de proteína sobre a atividade da lipase de *Rhizomucor miehei*, determinada pelos métodos titulométrico (A) e espectrofotométrico (B).

Pode-se observar claramente, nas figuras 10A e 11A, com o método titulométrico, que as lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* apresentaram uma atividade maior

quando foi utilizada uma menor concentração de proteínas no ensaio. A atividade diminuiu à medida que a concentração de proteínas foi aumentando.

Com o método espectrofotométrico (Figuras 10B e 11B) foram obtidos resultados semelhantes ao método titulométrico, sendo possível reafirmar que ao aumentar a concentração de proteína houve a diminuição da atividade das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei*.

Os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico são também semelhantes aos obtidos por Palomo e colaboradores (2003), que mostraram a ocorrência de diminuição da atividade de diferentes preparações de lipase à medida que a concentração de proteínas era aumentada no ensaio. Estes pesquisadores propuseram que este efeito fosse decorrente da formação de dímeros de lipase, formados pela interação das regiões hidrofóbicas dos sítios ativos destas enzimas. A proporção destes dímeros aumentaria na medida em que a concentração de proteína aumentasse devido ao aumento das interações hidrofóbicas. Segundo eles, esta agregação poderia ser evitada pela adição de tensoativos à preparação enzimática ou pela utilização de substratos insolúveis, situação em que ocorreria a ativação interfacial.

No entanto, diferentemente do proposto por Palomo e colaboradores (2003), verificamos o mesmo efeito quando as atividades das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram determinadas pelo método titulométrico, condição em que é usado o óleo de oliva (substrato insolúvel) em emulsão, o qual promove a ativação interfacial da lipase. Assim, apesar de provável que a diminuição da atividade lipásica seja causada pela agregação da enzima, a ocorrência da ativação interfacial por si só talvez não seja suficiente para impedir a interação hidrofóbica e a consequente formação dos agregados enzimáticos. Esta possibilidade é corroborada por resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório (TICOM, 2003).

A partir destes experimentos, a atividade lipásica passou a ser sempre determinada pelo método espectrofotométrico.

5.2 Efeito da variação da concentração de proteína sobre a atividade lipásica de *Candida rugosa*, na ausência e presença de diferentes concentrações de Triton X-100

Para avaliar se o uso de Triton X-100 poderia evitar ou diminuir o efeito de agregação/dimerização, a atividade da lipase de *C. rugosa*, pré-incubada na presença deste

aditivo a 0,005% (v/v) e 0,05% (v/v), foi determinada utilizando-se duas concentrações de proteína. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 12.

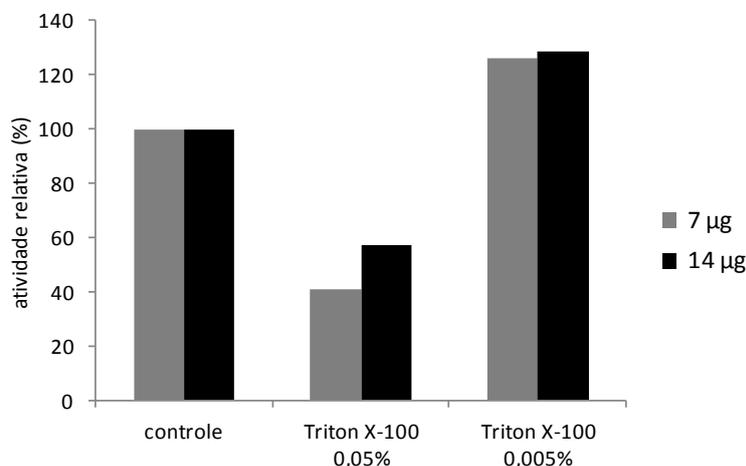


Figura 12: Atividade da lipase de *Candida rugosa* determinada pelo método espectrofotométrico, na ausência e na presença de Triton X-100.

Vários autores investigaram o efeito do Triton X-100 sobre a atividade de diversas lipases. Palomo e colaboradores (2003) verificaram que a atividade da lipase B de *Candida antarctica* diminuiu à medida que a concentração de proteínas foi aumentada. Na maior concentração testada (4 µg/mL), a atividade lipásica foi reduzida em 80%. Com a adição de Triton X-100 a 0,1% a atividade lipásica foi reduzida em apenas 10%, na mesma concentração de proteína.

Fernandez-Lorente e colaboradores (2003) obtiveram resultados semelhantes, ao verificarem uma diminuição da atividade da lipase de *Pseudomonas fluorescens* à medida que a concentração de proteínas foi aumentada. Estes autores verificaram uma redução de 80% na atividade da lipase de *Pseudomonas fluorescens*, na maior concentração de proteína testada (8 µg/mL). Quando o Triton X-100 a 0,1% foi adicionado, a atividade lipásica da preparação enzimática praticamente não foi alterada, permanecendo próxima de 100%. Assim, estes autores propuseram que este detergente apresenta um efeito sobre a dissociação da estrutura bimolecular das lipases.

No entanto, diferentemente do observado por estes autores, verificamos que a adição do tensoativo Triton X-100 a 0,05% (v/v) acarretou em diminuição da atividade

lipásica de *Candida rugosa*, nas duas concentrações de proteína analisadas (Figura 12). Por outro lado, a adição de Triton X-100 a 0,005% (v/v) promoveu um aumento da atividade lipásica, tanto na concentração de proteína mais baixa quanto na mais alta (29% e 26% de aumento, respectivamente). Estes resultados sugerem um efeito do Triton X-100 a 0,005% (v/v) sobre a desagregação da lipase de *C. rugosa*.

5.3 Adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei*, pré-incubadas com triton X-100 a 0,005% (v/v), a suporte aminado

Os resultados da adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* ao suporte aminado DEAE-Sephacel estão apresentados nas figuras 13 e 14.

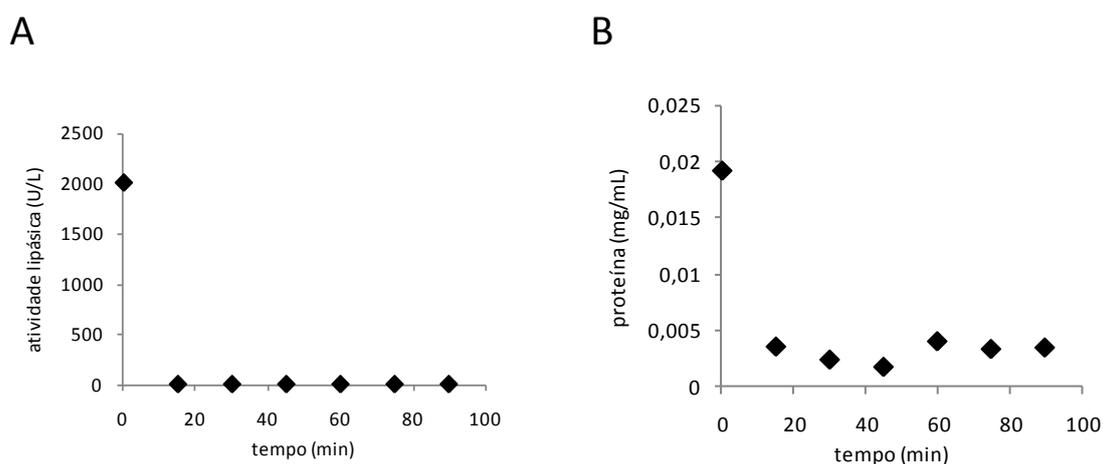


Figura 13: Adsorção da lipase de *Candida rugosa* no suporte DEAE-Sephacel. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

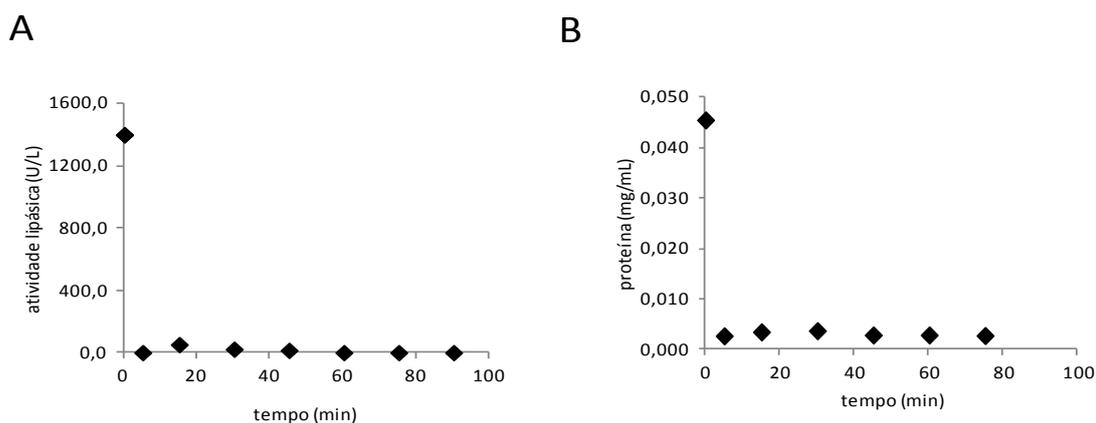


Figura 14: Adsorção da lipase de *Rhizomucor miehei* no suporte DEAE-Sepharcel. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

Os resultados das figuras 13A e 14A mostram que as lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram completamente retidas pelo suporte (DEAE-Sepharcel), não sendo detectada atividade lipásica no sobrenadante após 5 minutos de incubação das enzimas com o suporte, pelo método espectrofotométrico. Resultado semelhante também foi observado pela dosagem do teor de proteínas (Figuras 13B e 14B), onde foi observado decréscimo da concentração de proteínas após o início da reação, apesar de não ter havido total retenção da proteína pelo suporte, provavelmente por serem preparações não purificadas, que contêm outras proteínas além de lipase.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Bolivar e colaboradores (2009), que verificaram a adsorção da enzima penicilina G acilase de *E. coli* em diferentes suportes aminados. Estes autores verificaram que a enzima foi totalmente adsorvida nos suportes MANAE-agarose e amino-epoxi-agarose em baixa força iônica (5 mM de NaCl).

5.4 Dessorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* do suporte aminado

Os resultados da dessorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* do suporte DEAE-Sepharcel com concentrações de 100 a 800 mM de NaCl estão apresentados nas figuras 15 e 16.

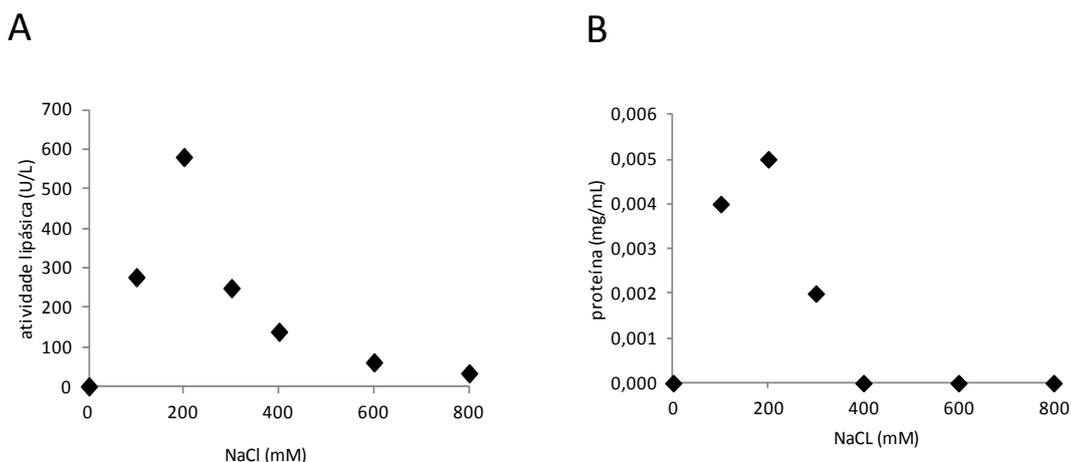


Figura 15: Dessorção da lipase de *Candida rugosa* do suporte DEAE-Sephacel com concentrações crescentes de NaCl. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

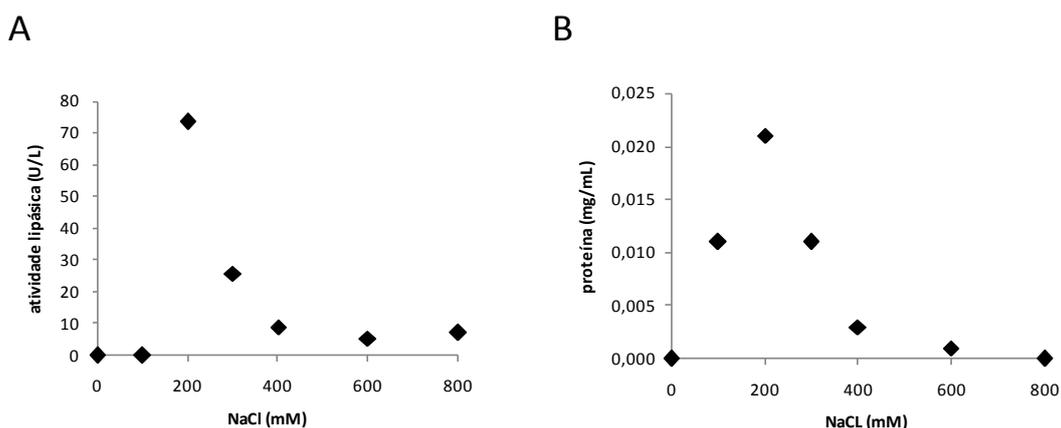


Figura 16: Dessorção da lipase de *Rhizomucor miehei* do suporte DEAE-Sephacel com concentrações crescentes de NaCl. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas(B).

Observa-se na figura 15A que a lipase de *C. rugosa* começou a ser desorvida do suporte com NaCl 100 mM. Com 200 mM de NaCl, aproximadamente 43% da atividade lipásica foram detectados no sobrenadante, pelo método espectrofotométrico. A desorção foi também verificada pelo aumento da concentração de proteínas à medida que foi aumentada a concentração de NaCl, ocorrendo o máximo de desorção com 200 mM de NaCl (Figura 15B).

A lipase de *R. miehei* também foi desorvida do suporte DEAE-Sephacel com concentrações crescentes de NaCl, sendo 200 mM a concentração mínima necessária para a desorção. Nesta concentração de NaCl, aproximadamente 61% da atividade lipásica

foram detectados no sobrenadante, pelo método espectrofotométrico (Figura 16A). Resultados semelhantes foram observados pela dosagem de proteínas (Figura 16B).

Estes resultados confirmam a adsorção das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* no suporte DEAE-Sephacel e sugerem uma possível agregação dessas lipases no momento da imobilização, acarretando em diminuição da atividade lipásica do derivado obtido.

Resultados semelhantes foram obtidos por Pessela e colaboradores (2003), que conseguiram dessorver a enzima β -galactosidase de *Thermus sp* cepa T2 do suporte DEAE com concentrações crescentes de NaCl. A concentração mínima necessária para a dessorção desta enzima foi de 100 mM e mais de 40% de atividade da β -galactosidase foi detectada no sobrenadante do derivado tratado com 300 mM de NaCl.

5.5 Capacidade de carga do suporte aminado DEAE-Sephacel na adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei*

Os resultados da capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel na adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* estão apresentados na figura 17.

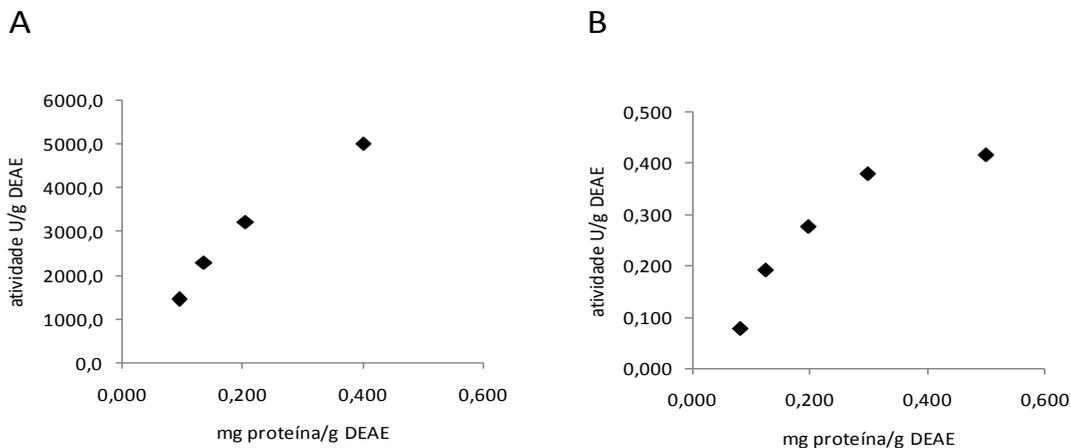


Figura 17: Capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel na imobilização das lipases de *Candida rugosa* (A) e *Rhizomucor miehei* (B).

A atividade lipásica de *Candida rugosa* no suporte DEAE-Sephacel aumenta proporcionalmente à concentração de proteína imobilizada neste suporte pelo menos até 0,200 mg proteína/g DEAE (Figura 17A). As proteínas se ligam aos grupos amino reativos do suporte até que estes estejam todos ligados, a partir deste momento, não ocorre mais adsorção de proteínas pelo suporte. Além disso, o aumento da concentração de proteínas

acarreta em aumento da formação de agregados/dímeros de lipases, que possuem atividade reduzida.

Este efeito foi mais claramente observado para a lipase de *Rhizomucor miehei* (Figura 17B). Verificou-se que a partir de 0,300 mg proteína/g DEAE o suporte não apresenta mais capacidade de adsorção da enzima.

Estes resultados são extremamente relevantes para o desenvolvimento de novos protocolos de imobilização, utilizando o máximo possível de proteína para carregar o suporte, com o mínimo de agregação.

5.6 Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por adsorção a suporte aminado

O rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* a suporte aminado estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por adsorção das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* a DEAE-Sephacel.

| | Suporte aminado DEAE-Sephacel | |
|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | Rendimento (%) | Atividade recuperada (%) |
| lipase de <i>Candida rugosa</i> | 100 | 41 |
| lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | 100 | 67 |

Na tabela 1 estão representados os resultados dos rendimentos para a adsorção das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* no suporte aminado DEAE-Sephacel. Estes resultados indicam que a lipase foi completamente imobilizada nesta resina de troca iônica. No entanto, uma vez que o cálculo do rendimento de imobilização é feito a partir da atividade enzimática remanescente no sobrenadante, o valor obtido representa o quanto de enzima foi teoricamente imobilizado no suporte.

As lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* imobilizadas por adsorção neste suporte, apresentaram atividades recuperadas de 41% e 67%, respectivamente.

Neste tipo de imobilização a adsorção da proteína ao suporte é eletrostática, uma interação mais fraca, o que implica na possibilidade de dessorção da enzima com aplicação de alta força iônica quando a atividade do catalisador não for mais rentável. Assim, o

suporte pode ser facilmente recuperado e pode-se proceder a uma nova imobilização (SILVA, 2009).

5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os resultados da análise das preparações enzimáticas antes e após os processos de imobilização por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), estão apresentados nas figuras 18, 19 e 20.

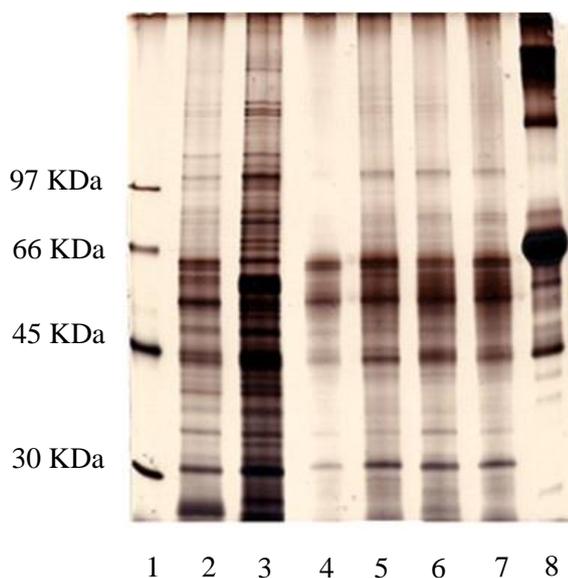


Figura 18: Análise da adsorção e dessorção da lipase de *Candida rugosa* em DEAE-Sephacel por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). 1: Padrão de peso molecular (fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa)); 2: Sobrenadante 90 min de imobilização; 3: Enzima bruta; Dessorção com 4: NaCl 100 mM; 5: NaCl 200 mM; 6: NaCl 400 mM; e 7: NaCl 600 mM; 8: Albumina de soro bovino.

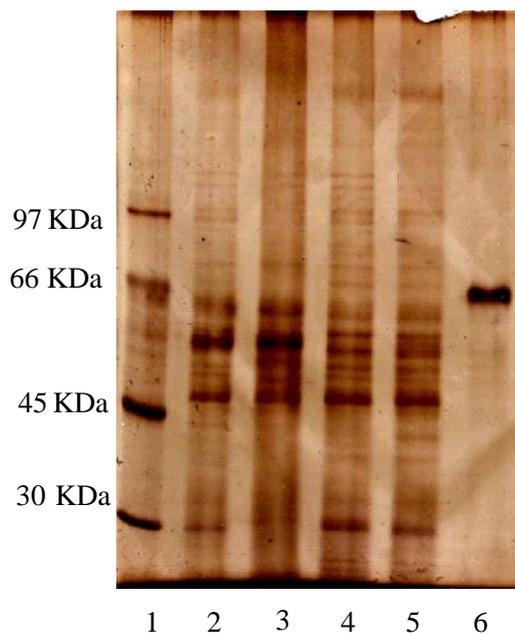


Figura 19: Análise da adsorção da lipase de *Candida rugosa* em DEAE-Sepharose por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). 1: Padrão de peso molecular (fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovalbumina (45 KDa), e anidrase carbônica (30 KDa)); 2: Enzima bruta; 3: Enzima imobilizada; 4: Sobrenadante 5 min de imobilização; 5: Sobrenadante 90 min de imobilização; 6: Albumina de soro bovino.

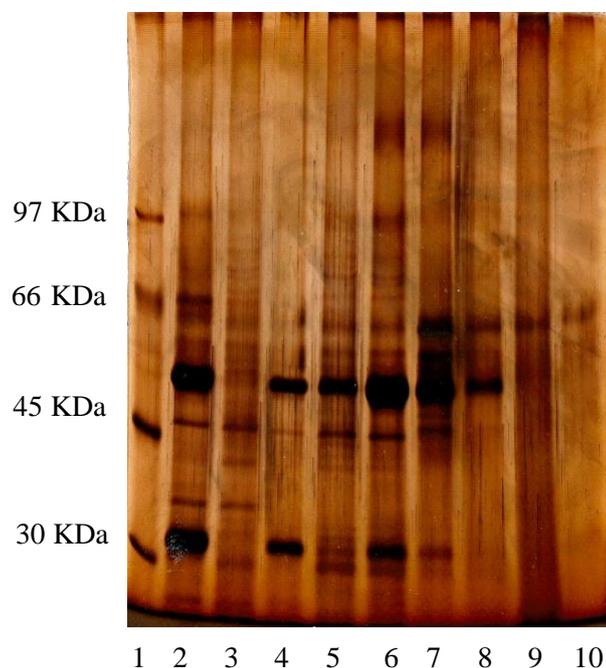


Figura 20: Análise da adsorção e dessorção da lipase de *Rhizomucor miehei* em DEAE-Sepharose por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). 1: Padrão de peso molecular (fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovalbumina (45 KDa), e anidrase carbônica (30 KDa)); 2: Enzima bruta; 3: Sobrenadante 90 min de imobilização; 4: Enzima

imobilizada; Dessorção com 5: NaCl 100 mM; 6: NaCl 200 mM; 7: NaCl 300 mM; 8: NaCl 400 mM; 9: NaCl 600 mM e 10: NaCl 800 mM.

As análises da lipase de *Candida rugosa* por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE), antes e após a realização da imobilização, mostraram que ocorreu a dessorção desta enzima do suporte a partir de 100 mM de NaCl (Figura 18).

Os resultados da figura 19 mostram uma banda de proteína mais abaixo que a do padrão de albumina, presente na preparação enzimática bruta e no derivado, mas ausente nos sobrenadantes da imobilização. A partir da mobilidade eletroforética obtida foi calculada a massa molecular da lipase, que correspondeu a 57,3 KDa.

Pernas e colaboradores (2000) relataram que a massa molecular das isoenzimas Lip2 e Lip3 da lipase de *Candida rugosa* são de 58 KDa e 62 KDa, respectivamente. Assim, a banda de proteína que corresponde à lipase de *Candida rugosa* deve estar na faixa de 60 KDa e ser observada no gel de eletroforese em posição próxima do padrão de albumina (66 KDa). Uma vez que não foi detectada atividade lipásica nos sobrenadantes após 5 e 90 minutos de reação e foi verificada uma banda de proteína com massa molecular muito próxima à da lipase de *C. rugosa* por SDS-PAGE (Figura 19), podemos concluir que a lipase de *C. rugosa* foi efetivamente imobilizada no suporte DEAE-Sephacel.

A eletroforese desnaturante da lipase de *Rhizomucor miehei* (Figura 20) também mostra a dessorção desta lipase com concentrações crescentes de NaCl, em que a maior parte da enzima foi dessorvida com 200 mM do sal.

Na preparação enzimática bruta e na enzima ligada ao suporte foi observada uma proteína com massa molecular próxima a do padrão de anidrase carbônica (30 KDa), que está ausente no sobrenadante da imobilização (Figura 20). Com os dados da mobilidade eletroforética relativa obtida por SDS-PAGE, foi possível calcular a massa molecular da lipase de *R. miehei* em 31,6 KDa. Rodrigues e Fernández-Lafuente (2010) relataram a massa molecular da lipase de *Rhizomucor miehei* como sendo 31,6 KDa, o que corresponde exatamente ao valor encontrado. Portanto, da mesma forma que para a lipase de *C. rugosa*, podemos concluir que a lipase de *R. miehei* foi de fato imobilizada no suporte DEAE-Sephacel, não sendo detectada no sobrenadante da preparação.

5.8 Adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* a suportes hidrofóbicos

Os resultados da adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* a suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose estão apresentados nas figuras 21, 22, 23 e 24.

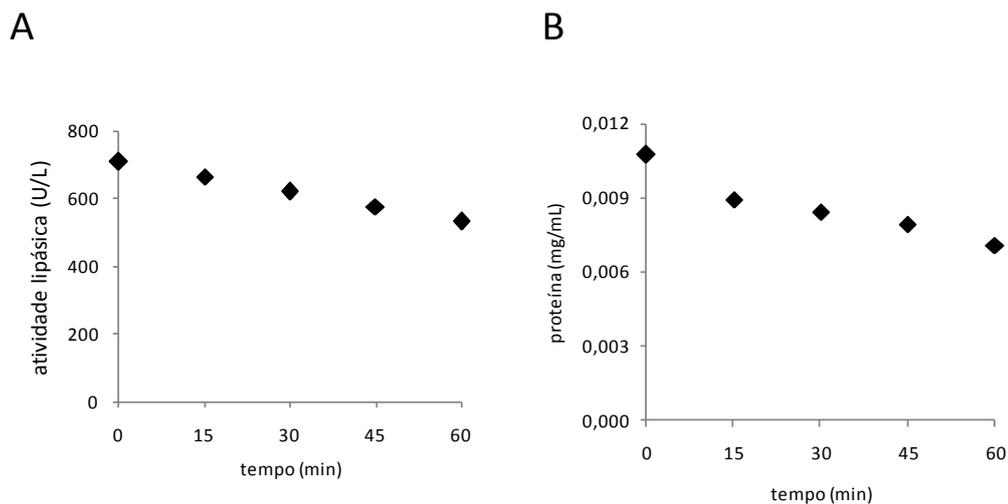


Figura 21: Adsorção da lipase de *Candida rugosa* a suporte hidrofóbico fenil-agarose. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

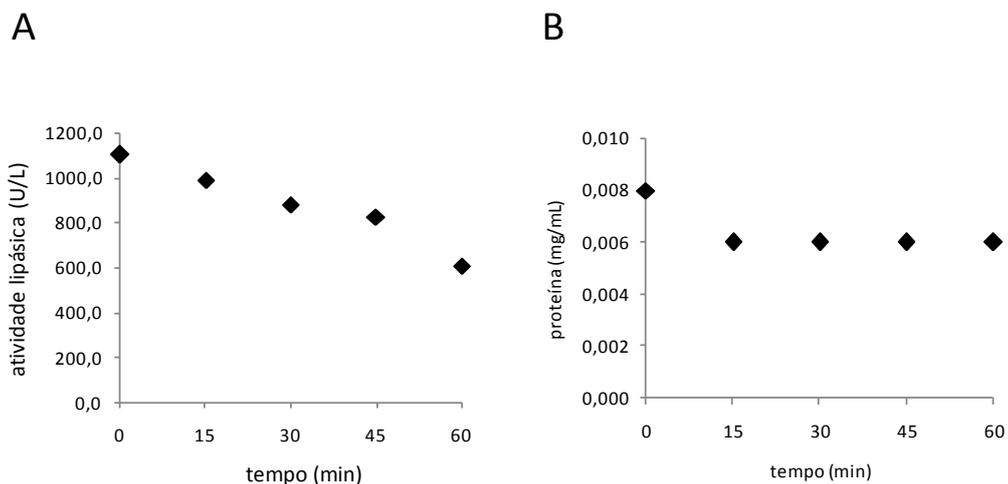


Figura 22: Adsorção da lipase de *Rhizomucor miehei* a suporte hidrofóbico fenil-agarose. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

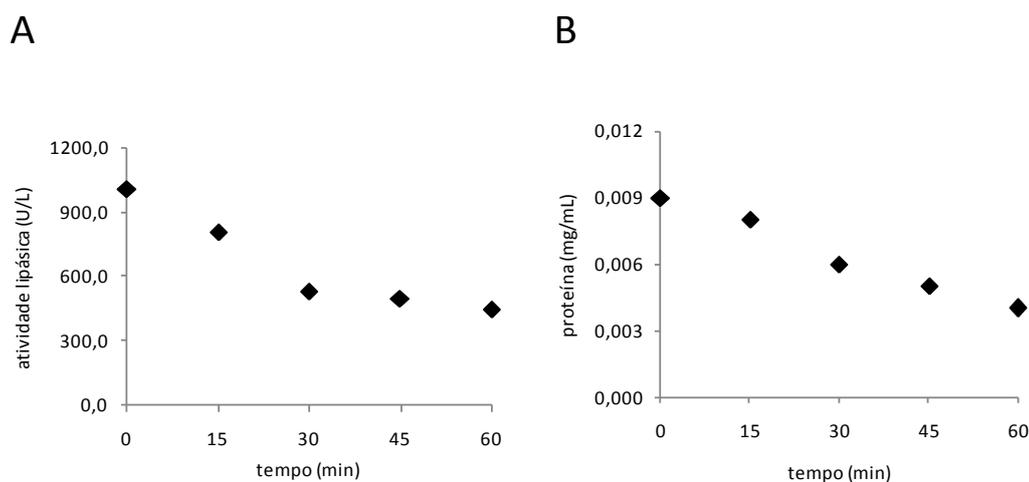


Figura 23: Adsorção da lipase de *Candida rugosa* a suporte hidrofóbico octil-agarose. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

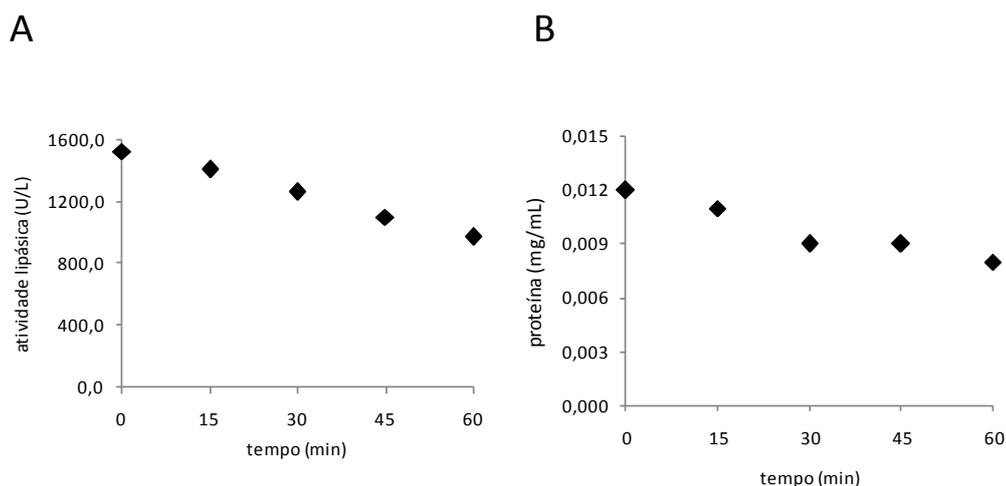


Figura 24: Adsorção da lipase de *Rhizomucor miehei* a suporte hidrofóbico octil-agarose. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

Os resultados das figuras 21A e 22A mostram que as lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram adsorvidas no suporte fenil-agarose, sendo detectada diminuição da atividade lipásica no sobrenadante, pelo método espectrofotométrico. Resultados semelhantes também foram observados com essas lipases adsorvidas no suporte octil-agarose (Figuras 23A e 24A). Os resultados da dosagem do teor de proteínas (Figuras 21B, 22B, 23B e 24B), também indicam que as lipases foram adsorvidas nestes suportes devido ao decréscimo da concentração de proteínas após o início da reação.

As lipases são adsorvidas nos suportes fenil-agarose e octil-agarose através da interação hidrofóbica da face interna de sua tampa com o suporte hidrofóbico, ocorrendo a fixação da conformação aberta, que é a conformação ativa da enzima (BRADY *et al.*, 1990; BASTIDA *et al.*, 1998 FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

5.9 Capacidade de carga dos suportes hidrofóbicos na adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei*

Os resultados da capacidade de carga dos suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose na adsorção das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* estão apresentados nas figuras 25 e 26.

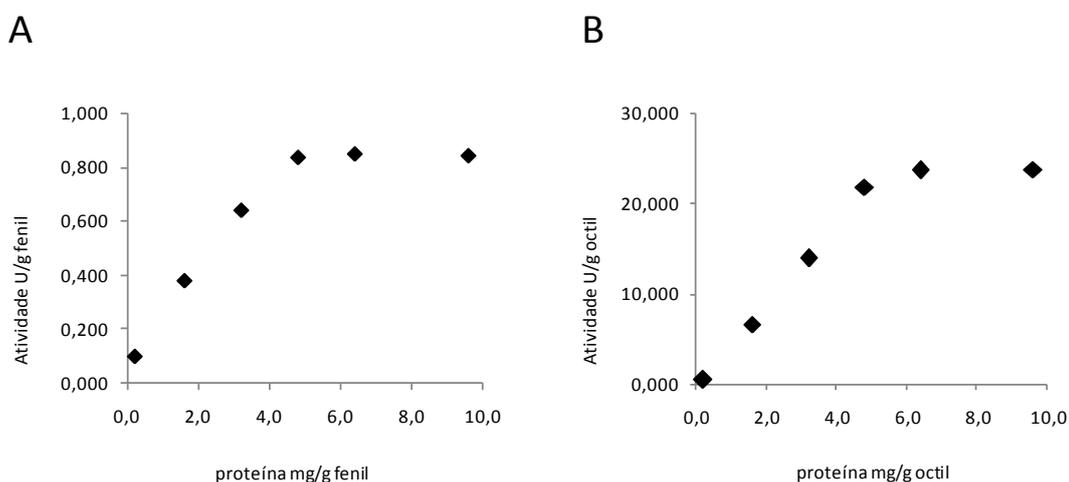


Figura 25: Capacidade de carga dos suportes hidrofóbicos na adsorção da lipase de *Candida rugosa*. Fenil-agarose (A) e octil-agarose (B).

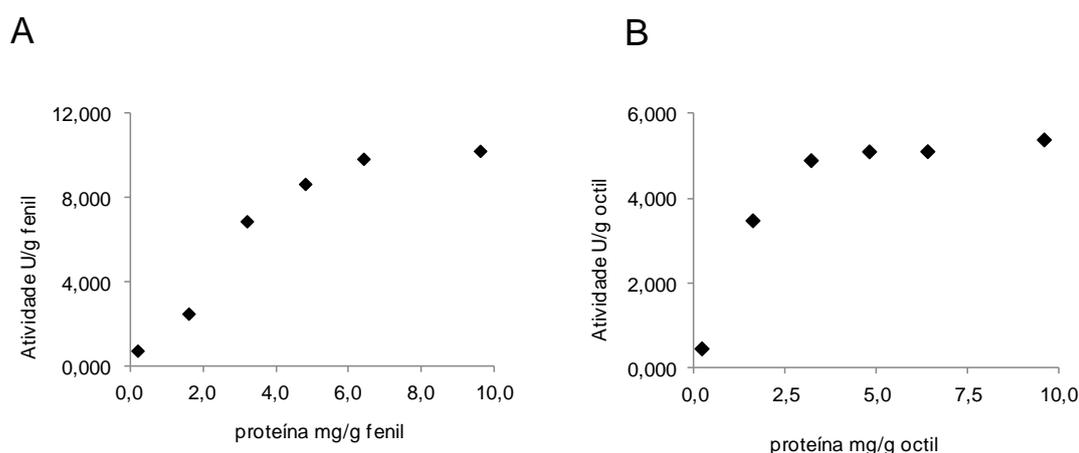


Figura 26: Capacidade de carga dos suportes hidrofóbicos na adsorção da lipase de *Rhizomucor meihei*. Fenil-agarose (A) e octil-agarose (B).

Observa-se nas figuras 25A e 25B que a capacidade de carga máxima dos suportes hidrofóbicos na adsorção da lipase de *C. rugosa* foi de 5 mg proteína/g fenil-agarose ou octil-agarose.

Os resultados das figuras 26A e 26B mostram que, em relação à adsorção da lipase de *R. meihei*, a capacidade de carga máxima foi de 5 mg proteína/g fenil-agarose ou 3 mg proteína/g octil-agarose.

A partir destes valores os suportes não apresentam mais capacidade de adsorver as enzimas, pois todos os seus grupos hidrofóbicos já estão ligados.

5.10 Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização a suportes hidrofóbicos

O rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por adsorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* aos suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização aos suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose.

| | fenil-agarose | | octil-agarose | |
|----------------------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| | Rendimento (%) | Atividade recuperada (%) | Rendimento (%) | Atividade recuperada (%) |
| lipase de <i>C. rugosa</i> | 25 | 22 | 56 | 78 |
| lipase de <i>R. miehei</i> | 48 | 22 | 36 | 54 |

A tabela 2 mostra rendimentos de 25% e 56% para a adsorção da lipase de *C. rugosa* aos suportes fenil-agarose e octil-agarose, respectivamente. As atividades recuperadas foram de 22% e 78%, para a lipase de *C. rugosa* imobilizada nestes suportes.

Para a lipase de *R. miehei* adsorvida aos suportes fenil-agarose e octil-agarose foram obtidos rendimentos de imobilização de 48% e 36% e atividades recuperadas de 22% e 54%, respectivamente.

Estes resultados indicam que as lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* foram imobilizadas nestas resinas hidrofóbicas. No entanto, devido aos baixos valores de rendimento e atividade recuperada os derivados obtidos por imobilização em fenil-agarose não foram utilizados nos estudos subsequentes.

5.11 Imobilização covalente das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído

Os resultados da imobilização covalente das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* no suporte aminado DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v) ou 15% (v/v) estão apresentados nas figuras 27, 28, 29 e 30.

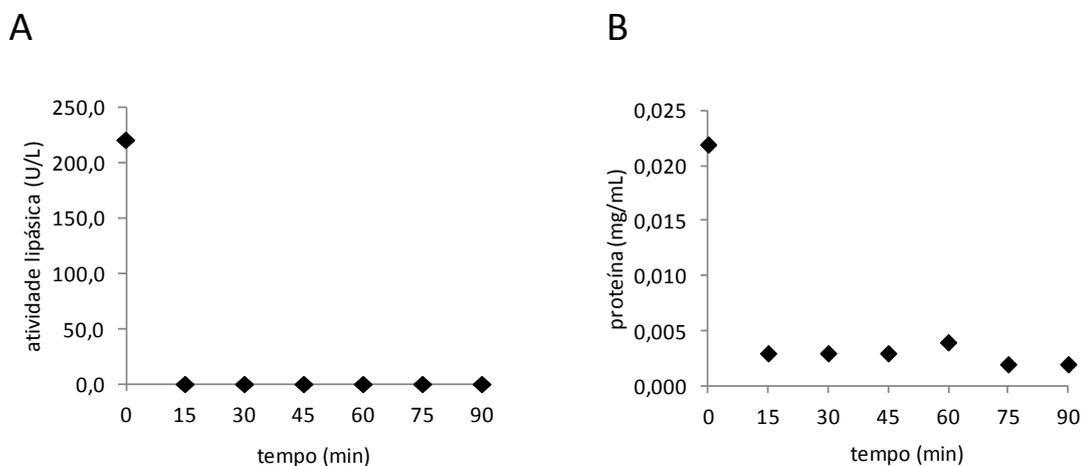


Figura 27: Imobilização da lipase de *Candida rugosa* em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v). Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

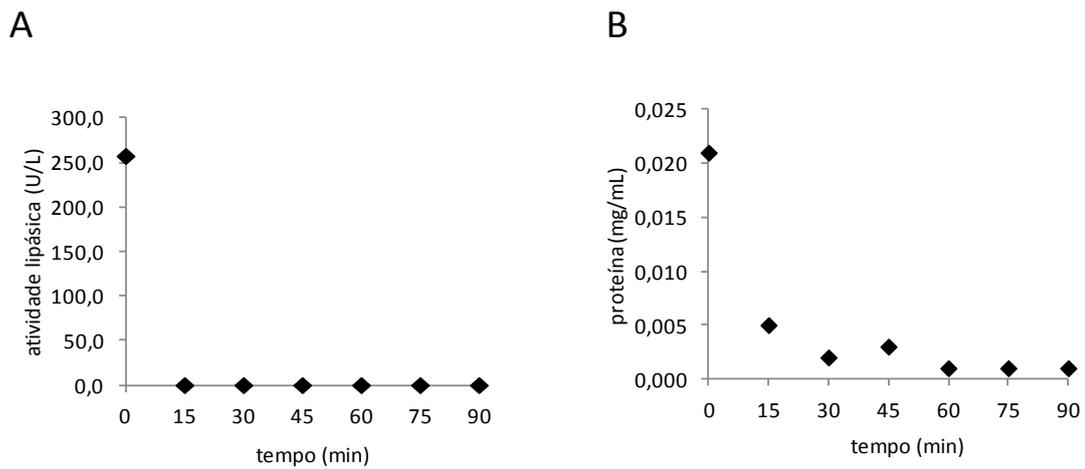


Figura 28: Imobilização da lipase de *Candida rugosa* em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 15% (v/v). Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

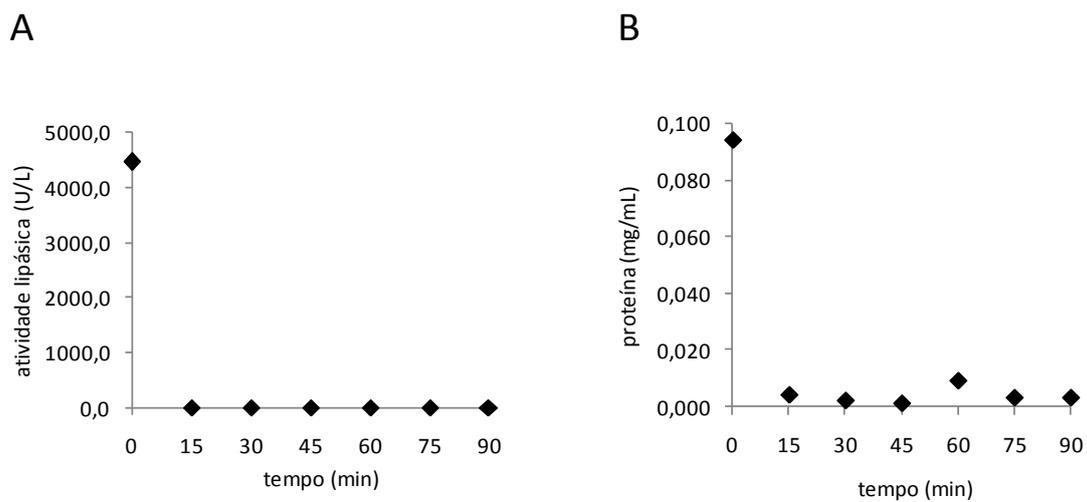


Figura 29: Imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v). Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

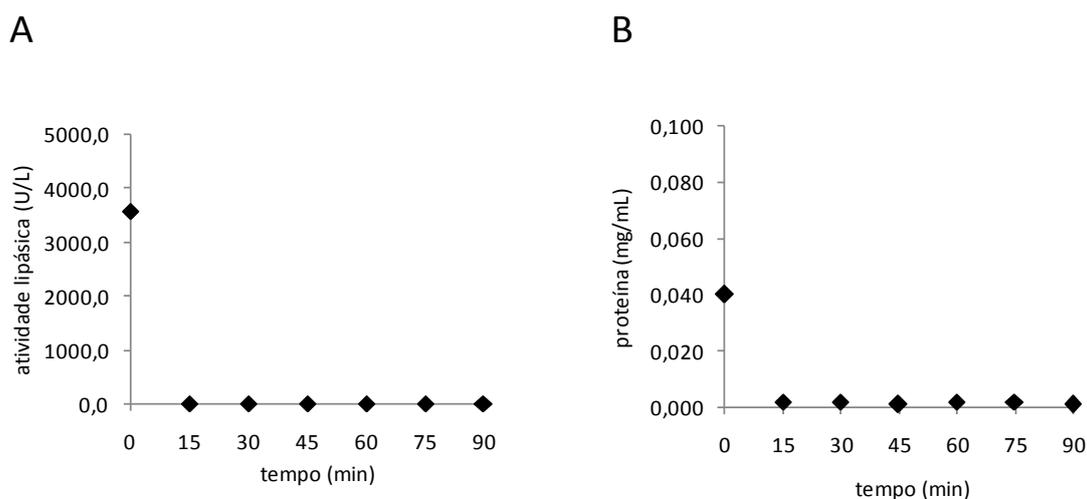


Figura 30: Imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 15% (v/v). Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

Observa-se que a lipase de *Candida rugosa* foi completamente imobilizada no suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído, tanto a 0,5% (v/v) como a 15% (v/v) (Figuras 27A e 28A, respectivamente), não tendo sido detectada atividade lipásica no sobrenadante após 15 minutos de incubação da enzima com o suporte, em ambos os casos. Os resultados da dosagem do teor de proteínas do sobrenadante (Figuras 27B e 28B) também sugerem a completa imobilização das proteínas, sendo observado o desaparecimento das proteínas do sobrenadante logo após o início da reação.

A lipase de *Rhizomucor miehei* também foi completamente imobilizada no suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído, tanto a 0,5% (v/v) como a 15% (v/v) (Figuras 29A e 30A, respectivamente). Os resultados da dosagem do teor de proteínas do sobrenadante (Figuras 29B e 30B) também sugerem a completa imobilização das proteínas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Betancor e colaboradores (2006b) utilizando as enzimas D-aminoácido oxidase e glutaril 7-ACA acilase. Segundo estes autores, o glutaraldeído a 0,5% (v/v) e 15% (v/v) modifica os grupos amino do suporte com uma ou duas moléculas de glutaraldeído (monômeros ou dímeros), formando suportes heterofuncionais. Assim, a reação de imobilização de proteínas nos suportes pré-ativados ocorreria, primeiramente, através da interação iônica de grupos com carga negativa da superfície da proteína com os grupos amino do suporte, seguida pela ligação covalente possibilitada pelos monômeros ou dímeros de glutaraldeído da superfície do suporte com grupos amino da superfície da proteína (BETANCOR *et al.*, 2006b).

5.12 Capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído

Os resultados da capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído na imobilização covalente das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* estão apresentados nas figuras 31 e 32.

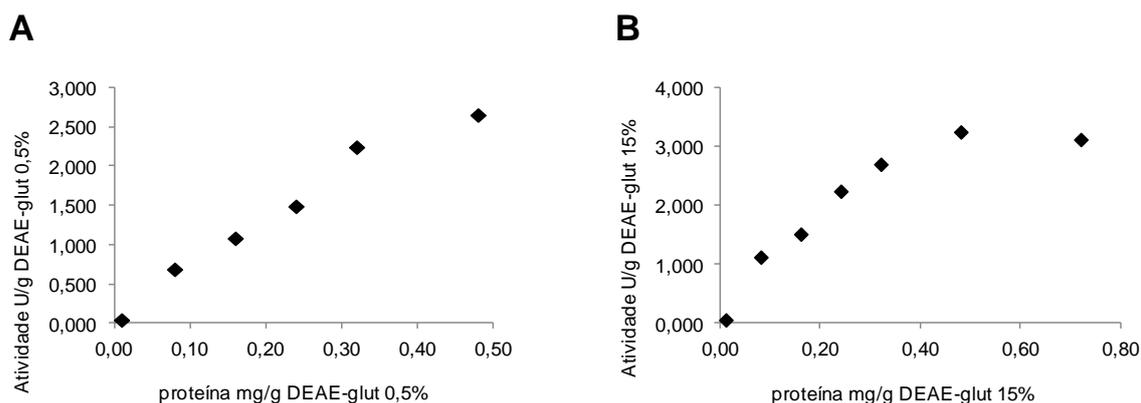


Figura 31: Capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído na imobilização da lipase de *Candida rugosa*. Suporte pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v) (A) e 15% (v/v) (B).

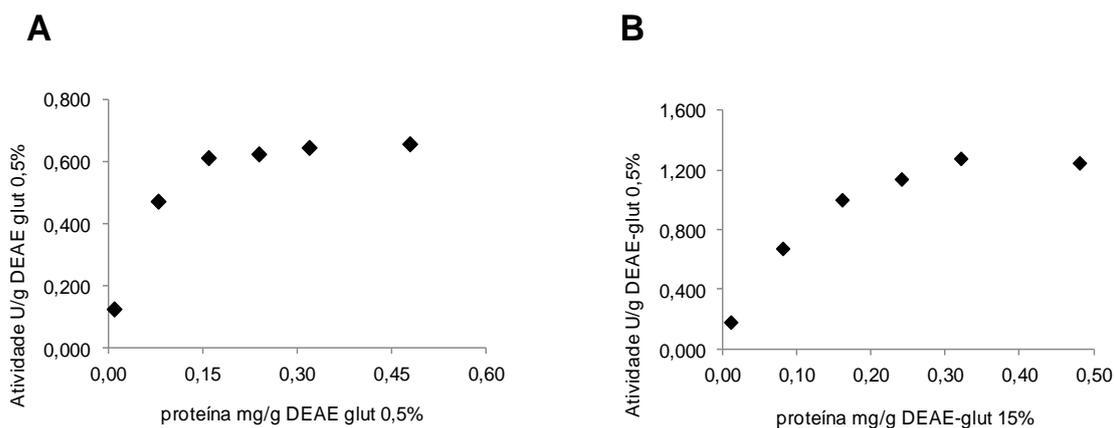


Figura 32: Capacidade de carga do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído na imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei*. Suporte pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v) (A) e 15% (v/v) (B).

Inicialmente, o aumento de atividade da lipase de *Candida rugosa* no suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v) e 15% (v/v) é diretamente

proporcional ao aumento da concentração de proteína imobilizada nestes suportes covalentes. Para estes dois tipos de suportes a partir de 0,30 mg proteína/g suporte, o aumento da concentração de proteínas não leva a um proporcional incremento na atividade do derivado obtido.

Resultados semelhantes foram obtidos para a lipase de *R. miehei* imobilizada no suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v) e 15% (v/v). Entretanto, o máximo de proteína retida foi 0,20 mg/g destes suportes.

A ligação covalente é possibilitada pelos monômeros ou dímeros de glutaraldeído da superfície do suporte com grupos amino da superfície da proteína (BETANCOR *et al.*, 2006b). A ligação ocorre até que todos os monômeros e dímeros estejam ligados, a partir deste momento, não ocorre mais imobilização de proteínas pelo suporte. Adicionalmente, o aumento da concentração de proteínas acarreta em aumento da formação de agregados/dímeros de lipases, que possuem atividade reduzida.

5.13 Dessorção das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído

Os resultados da dessorção das lipases de *C. rugosa* e de *R. miehei* do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com glutaraldeído 0,5% (v/v) e 15% (v/v) estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 3. Dessorção das lipases de *C. rugosa* e de *R. miehei* do suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído (imobilização covalente).

| | lipase de <i>Candida rugosa</i> | lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| | Dessorção com NaCl 800 mM (%) | Dessorção com NaCl 800 mM (%) |
| monômeros DEAE-glutaraldeído | 0 | 0 |
| dímeros DEAE-glutaraldeído | 0 | 0 |

Os resultados da tabela 3 mostram que as lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* não foram dessorvidas dos suportes, modificados com monômeros e dímeros de glutaraldeído, mesmo com aplicação de alta força iônica (NaCl 800 mM).

Persson, Bulow e Mosbach (1990) relataram que na imobilização por ligação covalente, a ocorrência de dessorção da enzima durante as reações catalíticas é reduzida devido à forte ligação entre a enzima e o suporte.

Assim, estes resultados confirmam a imobilização destas lipases por ligação covalente, possibilitada pelos monômeros ou dímeros de glutaraldeído da superfície do suporte com grupos amino da superfície da proteína.

5.14 Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído

O rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente da lipase de *C. rugosa* em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído.

| lipase de <i>Candida rugosa</i> | | |
|---------------------------------|----------------|--------------------------|
| | Rendimento (%) | Atividade recuperada (%) |
| monômeros DEAE-glutaraldeído | 100 | 48 |
| dímeros DEAE-glutaraldeído | 100 | 33 |

Tabela 5. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente da lipase de *R. miehei* em suporte DEAE-Sephacel pré-ativado com diferentes concentrações de glutaraldeído.

| lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | | |
|------------------------------------|----------------|--------------------------|
| | Rendimento (%) | Atividade recuperada (%) |
| monômeros DEAE-glutaraldeído | 100 | 40 |
| dímeros DEAE-glutaraldeído | 100 | 39 |

Os resultados das tabelas 4 e 5 mostram rendimentos de 100% para todas as reações de imobilização covalente.

Com a lipase de *C. rugosa* foram obtidos derivados com atividade recuperada de 48% e 33% para os suportes modificados com monômeros e dímeros de glutaraldeído, respectivamente, enquanto que com a lipase de *R. miehei* foram obtidos derivados que apresentaram 40% e 39% de atividade recuperada, respectivamente.

Segundo Betancor e colaboradores (2006b), a atividade e estabilidade das enzimas imobilizadas em suportes ativadas com glutaraldeído dependem do protocolo imobilização

empregado. Os diferentes grupos podem produzir diferenças na estabilidade, sendo que o espaçador mais curto (monômero) pode dar uma maior rigidez, enquanto o mais longo (dímero) pode permitir a reação com mais grupos e, finalmente, a obtenção de melhores resultados (BETANCOR *et al.*, 2006b).

5.15 Imobilização covalente das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* em suporte epóxido Eupergit C

Os resultados da imobilização covalente das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* em suporte epóxido Eupergit C estão apresentados nas figuras 33 e 34.

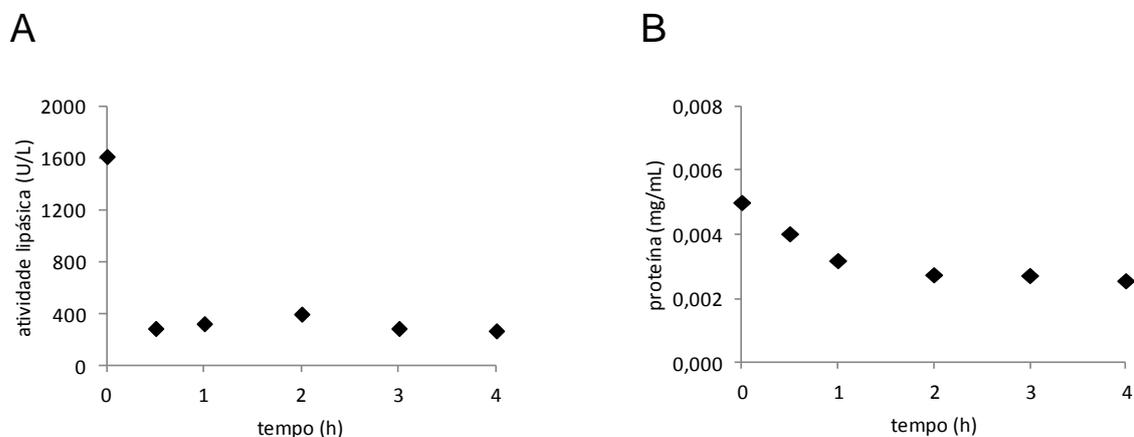


Figura 33: Imobilização covalente da lipase de *Candida rugosa* em suporte epóxido Eupergit C. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

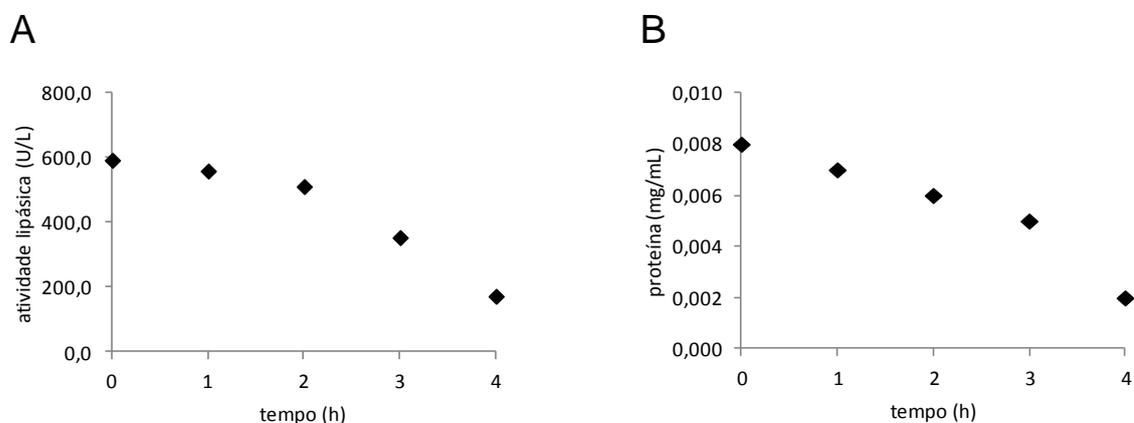


Figura 34: Imobilização covalente da lipase de *Rhizomucor miehei* em suporte epóxido Eupergit C. Atividade lipásica no sobrenadante da imobilização (A) e dosagem de proteínas (B).

Observa-se, nas figuras 33A e 34A que as lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* foram imobilizadas no suporte epóxido Eupergit C, devido ao decréscimo da atividade lipásica detectada no sobrenadante durante os tempos de incubação da enzima com o suporte. Os resultados da dosagem do teor de proteínas do sobrenadante (Figuras 33B e 34B) também sugerem a imobilização das proteínas.

O suporte Eupergit C forma ligações covalentes multipontuais muito estáveis com as enzimas, sob condições experimentais muito suaves, como pH neutro (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; MATEO *et al.*, 2000). A ligação covalente ocorre através dos grupos oxirano do suporte que reagem com os grupamentos amino da enzima em pH neutro ou alcalino, ou com os grupamentos sulfidril e carboxila, em condições ácidas, neutras e alcalinas (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; MATEO *et al.*, 2000; KNEZEVIC *et al.*, 2006).

5.16 Capacidade de carga do suporte Eupergit C na imobilização covalente das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei*

Os resultados da capacidade de carga do suporte Eupergit C na imobilização covalente das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* estão apresentados na figura 35.

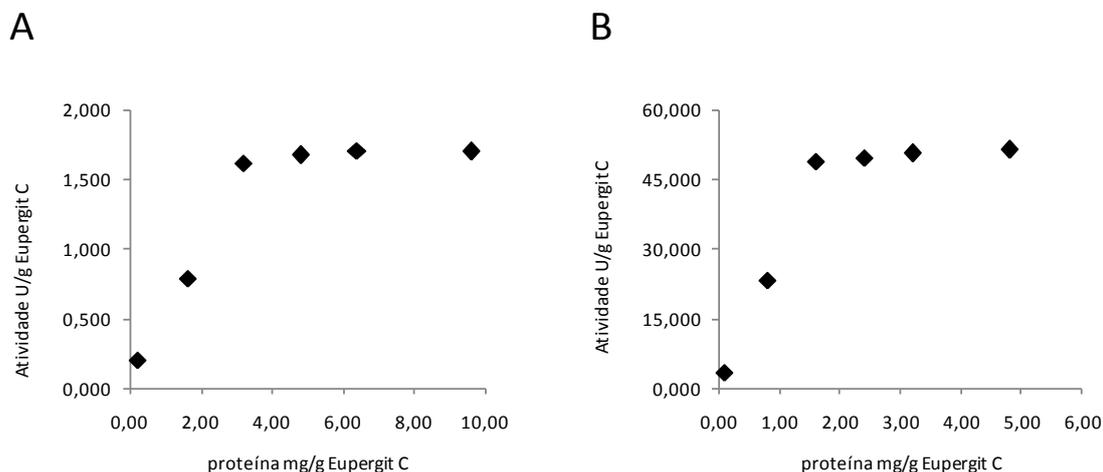


Figura 35: Capacidade de carga do suporte Eupergit C na imobilização covalente das lipases de *Candida rugosa* (A) e *Rhizomucor miehei* (B).

A capacidade de carga máxima do suporte epóxido Eupergit C, na imobilização das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei*, foi de 3 mg proteína/g suporte e 1,5 mg proteína/g suporte, respectivamente (Figuras 35A e 35B).

As proteínas se ligam aos grupos oxirano do suporte até que estes estejam todos ligados, a partir deste momento, o suporte não apresenta mais capacidade de imobilização das enzimas (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; MATEO *et al.*, 2000; KNEZEVIC *et al.*, 2006).

5.17 Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente em suporte epóxido Eupergit C

O rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* em suporte epóxido Eupergit C estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados obtidos por imobilização covalente das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* em suporte Eupergit C.

| Suporte Eupergit C | | |
|------------------------------------|----------------|--------------------------|
| | Rendimento (%) | Atividade recuperada (%) |
| lipase de <i>Candida rugosa</i> | 83 | 28 |
| lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | 71 | 30 |

Os resultados da tabela 6 mostram rendimentos de 83% e 71% para as reações de imobilização covalente das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei*, respectivamente, em suporte epóxido Eupergit C. Foram obtidos derivados com atividade recuperada de 28% e 30% para as lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* imobilizadas neste tipo de suporte.

Com a metodologia utilizada, foram obtidos derivados pela reação de grupos oxirano do suporte que formaram ligações covalentes multipontuais com os grupos reativos dos resíduos de aminoácidos das lipases (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; MATEO *et al.*, 2000; KNEZEVIC *et al.*, 2006).

5.18 Estabilidade à estocagem a 4 °C dos derivados obtidos por imobilização das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei*

Os resultados da estabilidade à estocagem a 4 °C dos derivados obtidos por imobilização das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* em diferentes tipos de suportes estão apresentados nas figuras 36 e 37.

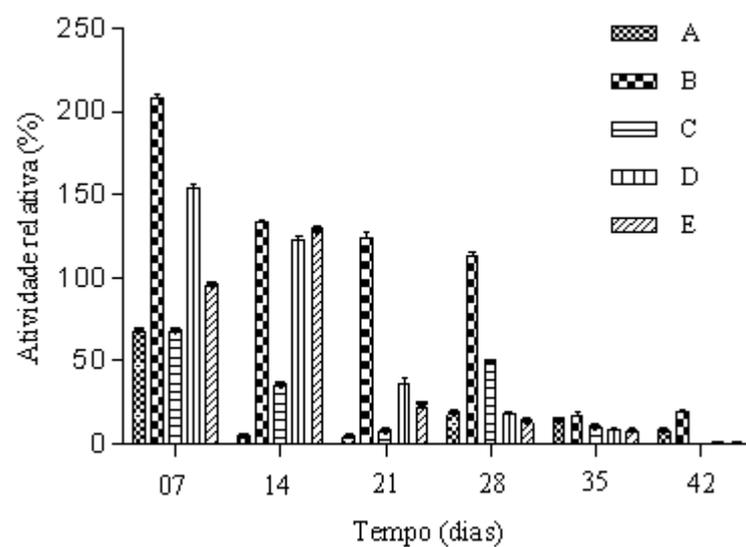


Figura 36: Estabilidade à estocagem a 4 °C dos derivados obtidos por imobilização da lipase de *Candida rugosa* em suporte aminado DEAE-Sephacel (A), suporte aminado modificado com monômeros (B) e dímeros (C) de glutaraldeído, e suportes hidrofóbicos octil-agarose (D) e fenil-agarose (E).

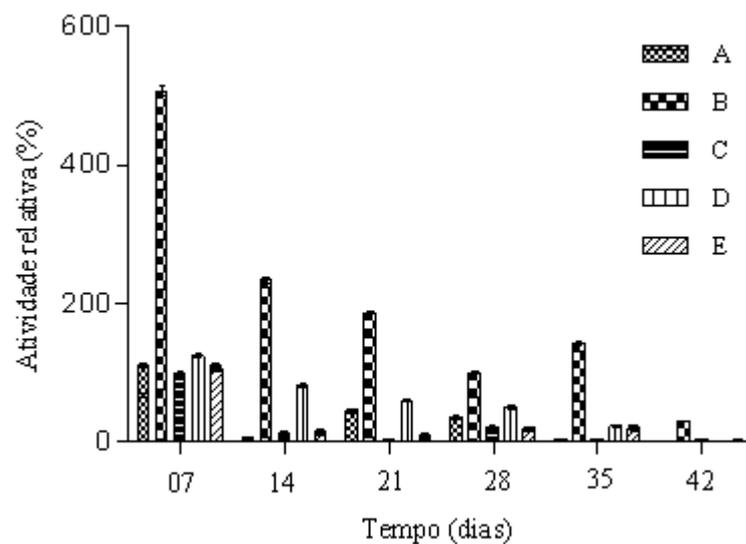


Figura 37: Estabilidade à estocagem a 4 °C dos derivados obtidos por imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* em suporte aminado DEAE-Sephacel (A), suporte aminado modificado com monômeros (B) e dímeros (C) de glutaraldeído, e suportes hidrofóbicos octil-agarose (D) e fenil-agarose (E).

Os derivados obtidos com o suporte aminado DEAE-Sephacel modificado com monômeros de glutaraldeído apresentaram a melhor estabilidade à estocagem a 4 °C, permanecendo com atividade acima de 100% por até 28 dias para a lipase de *C. rugosa* e por até 35 dias para a lipase de *R. miehei*. Vários autores têm relatado que o uso de glutaraldeído na ativação de suportes aminados acarreta em elevada estabilidade da ligação amino-glutaraldeído (BURTEAU, BURTON & CRICHTO, 1989; VAN AKEN *et al.*, 2000; DOS REIS-COSTA *et al.*, 2003; MAGNAN *et al.*, 2004; SEYHAN & ALPTEKIN, 2004; BETANCOR *et al.*, 2006b). Essa imobilização covalente geralmente confere uma significativa melhora na estabilidade da enzima quando comparada com a imobilização por adsorção (KARIM & HASHINAGA, 2002; IDRIS & BUKHARI, 2012).

Os derivados obtidos por adsorção da lipase de *C. rugosa* a suporte aminado e suporte modificado com dímeros de glutaraldeído só permaneceram com boa estabilidade por 7 dias, enquanto que os derivados obtidos por adsorção a suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose permaneceram com aproximadamente 100% de atividade por até 14 dias. Por outro lado, o derivado obtido por adsorção da lipase de *R. miehei* a suporte hidrofóbico octil-agarose apresentou 50% de atividade por até 28 dias, enquanto que os derivados obtidos pela imobilização desta lipase a suporte aminado, suporte modificado com dímeros de glutaraldeído, e suporte hidrofóbico fenil-agarose só permaneceram estáveis por 7 dias.

Por não haver mais suporte Eupergit C disponível no laboratório não foi possível preparar novamente os derivados para analisar quanto à estabilidade à estocagem a 4 °C e realizar os ensaios subsequentes.

5.19 Hidrólise enzimática do mandelato de etila

5.19.1 Curva padrão de ácido (R,S)-mandélico

Para quantificar a concentração de ácido mandélico formado nas reações de hidrólise do mandelato de etila foi construída a curva padrão de ácido (R,S)-mandélico nas concentrações 0,1562; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5 mM. O cromatograma obtido por CLAE em coluna de fase reversa C18 para o padrão de ácido mandélico 1,25 mM está apresentado na figura 38, enquanto que os resultados da curva padrão estão apresentados na figura 39.

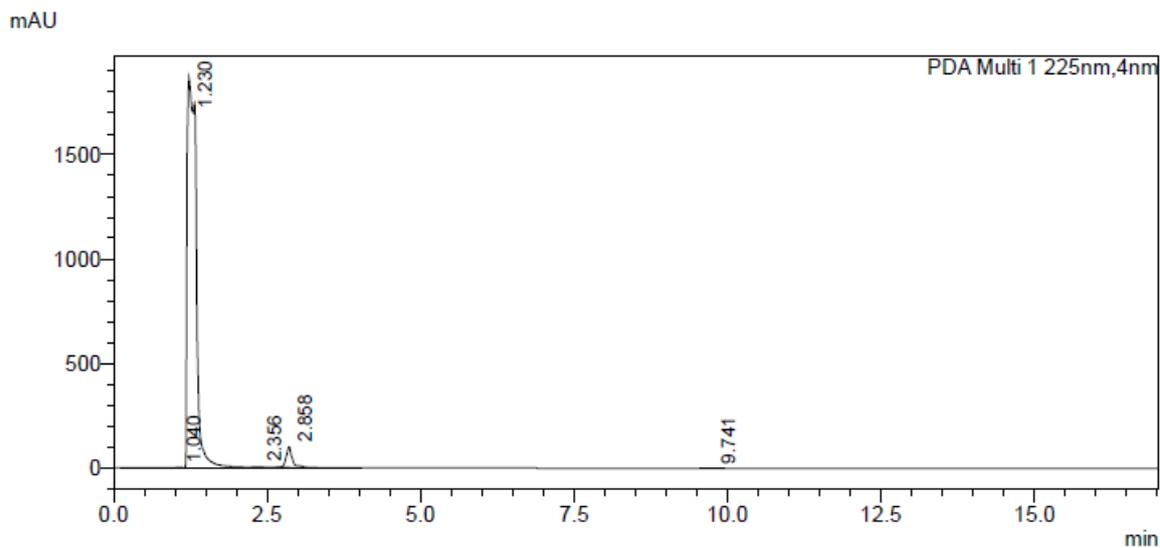


Figura 38: Cromatograma do padrão de ácido (R,S)-mandélico 1,25 mM.

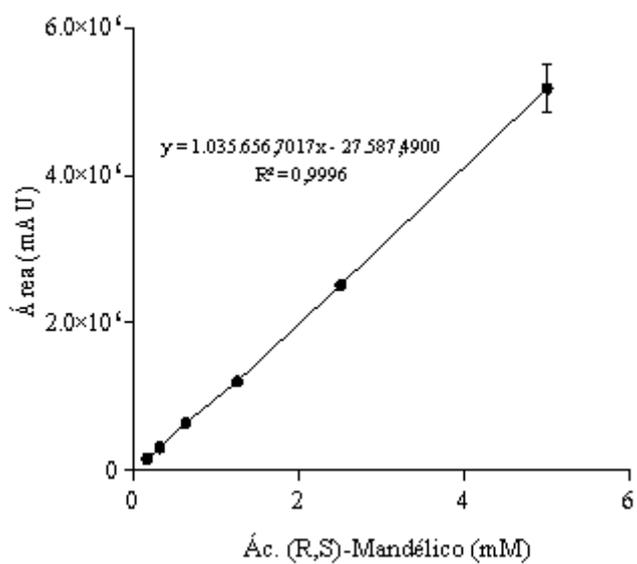


Figura 39: Curva padrão de ácido (R,S)-mandélico.

O padrão de ácido (R,S)-mandélico apresentou tempo de retenção de 2,8 min (Figura 38).

A curva padrão de ácido (R,S)-mandélico (Figura 39) apresentou uma excelente linearidade, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996. Este coeficiente é

superior ao preconizado pela RDC 899/2003 que estabelece um R^2 mínimo igual a 0,99. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,1240 e 0,4134 mM, respectivamente.

O teste *t* de Student foi aplicado para as triplicatas de cada concentração do padrão e as variações não foram significativas (nível de significância $\alpha=0,05$ e intervalo de confiança de 95%).

5.19.2 Análise por CLAE do grau de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico

Para avaliar o grau de hidrólise do mandelato de etila (conversão), o ácido mandélico formado nesta reação foi identificado e quantificado por CLAE em coluna de fase reversa. Os cromatogramas das amostras e os resultados das conversões estão apresentados nas figuras 40 a 52.

Com a metodologia analítica utilizada foi possível identificar e quantificar o ácido mandélico produzido nas reações de hidrólise, com uma boa resolução e tempo de análise relativamente curto. O ácido mandélico apresentou tempo de retenção médio de 2,8 min (Figura 37), enquanto que o mandelato de etila apresentou tempo de retenção médio de 10,4 min (Figura 40).

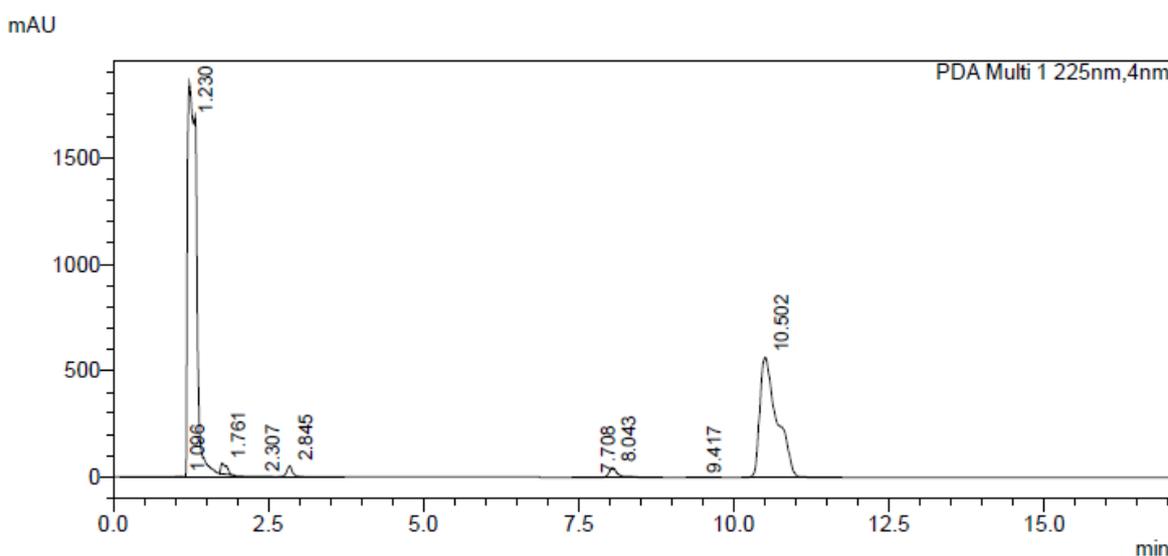


Figura 40: Cromatograma de amostra do tempo de 0 da reação de hidrólise.

O mandelato de etila utilizado como substrato para as reações de hidrólise não estava totalmente puro, visto que se observa também o pico do ácido mandélico no cromatograma (Figura 40). Desta forma, para o cálculo da concentração de ácido

mandélico produzido nas reações de hidrólise foi descontada a concentração inicial de ácido mandélico presente no substrato.

O derivado da lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte octil-agarose apresentou 4,2% conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em 30 h de reação (Figuras 41 a 43, tabela 7).

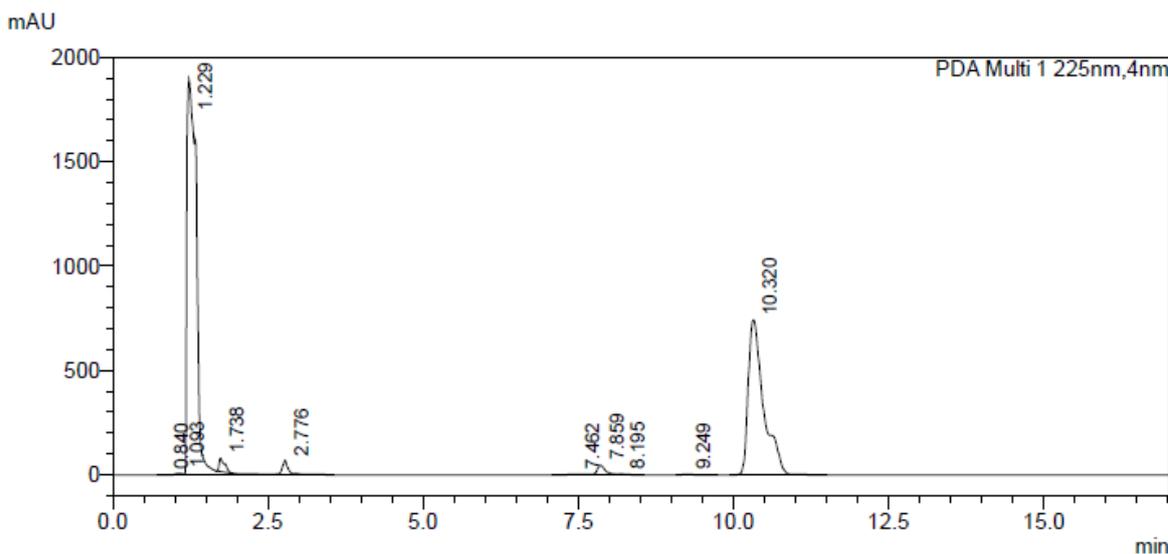


Figura 41: Cromatograma de amostra do tempo de 3 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *C. rugosa* imobilizada em octil-agarose.

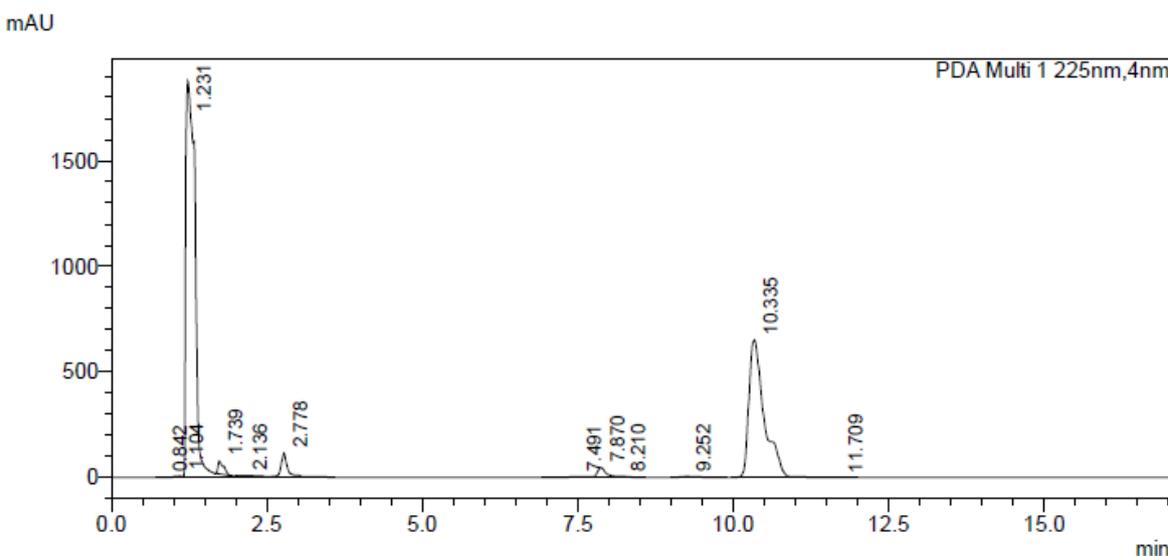


Figura 42: Cromatograma de amostra do tempo de 30 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *C. rugosa* imobilizada em octil-agarose.

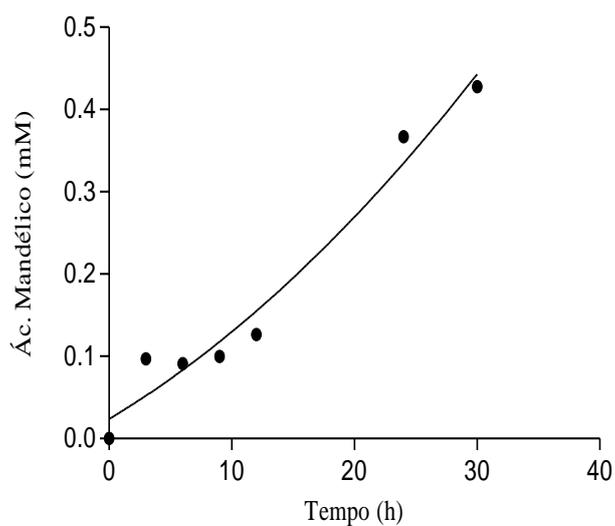


Figura 43: Ácido mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando a lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte octil-agarose.

O derivado da lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte octil-agarose apresentou 3,6% de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em 30 h de reação (Figuras 44 a 46, tabela 7).

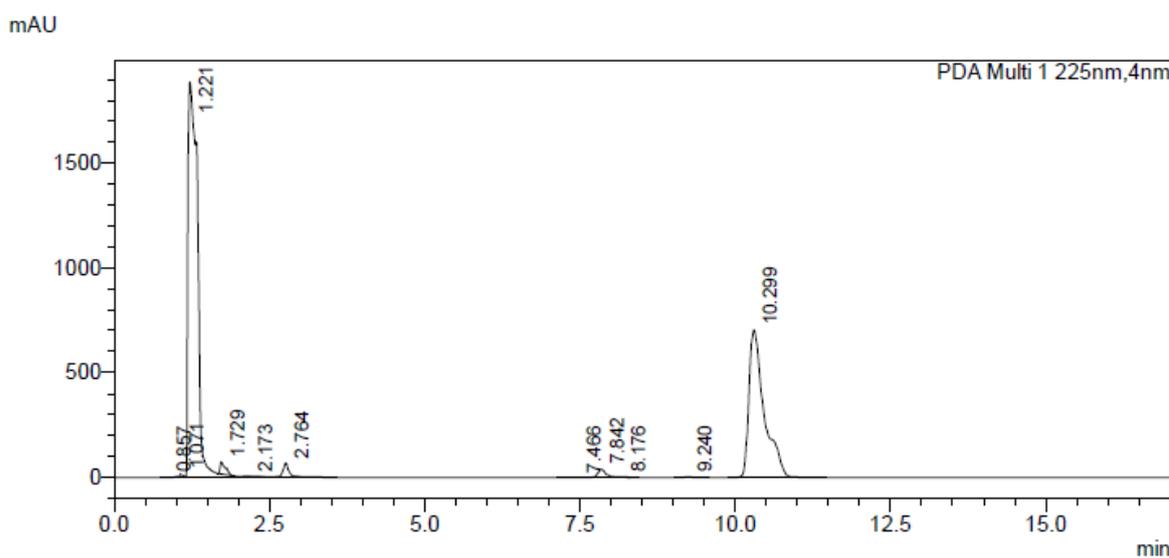


Figura 44: Cromatograma de amostra do tempo de 3 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *R. miehei* imobilizada em octil-agarose.

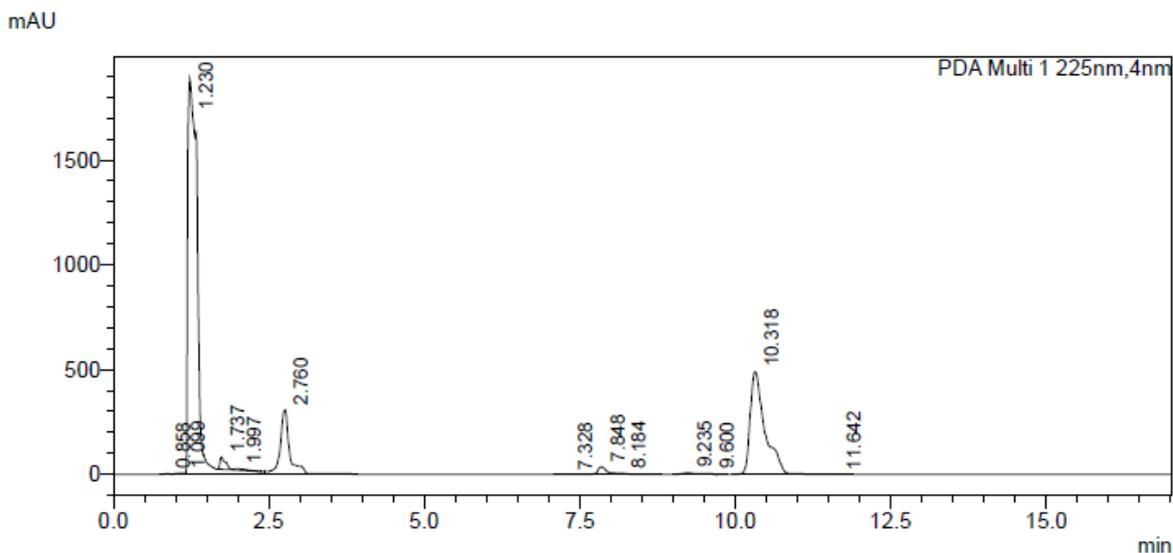


Figura 45: Cromatograma de amostra do tempo de 30 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *R. miehei* imobilizada em octil-agarose.

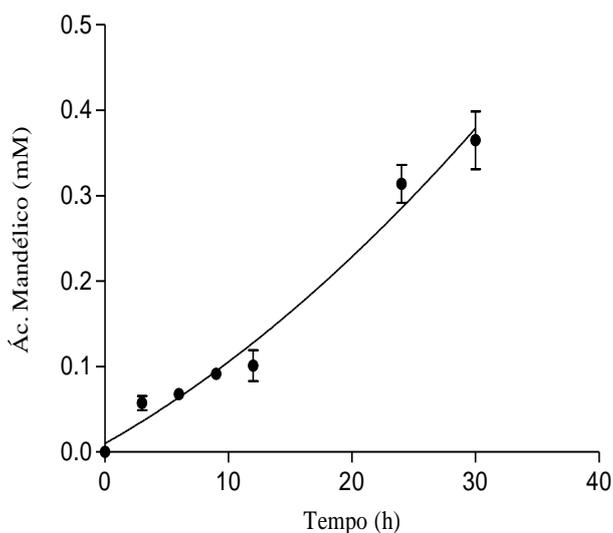


Figura 46: Ácido mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte octil-agarose.

O derivado obtido com a lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído apresentou 2,4% de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico em 30 h de reação (Figuras 47 a 49, tabela 7).

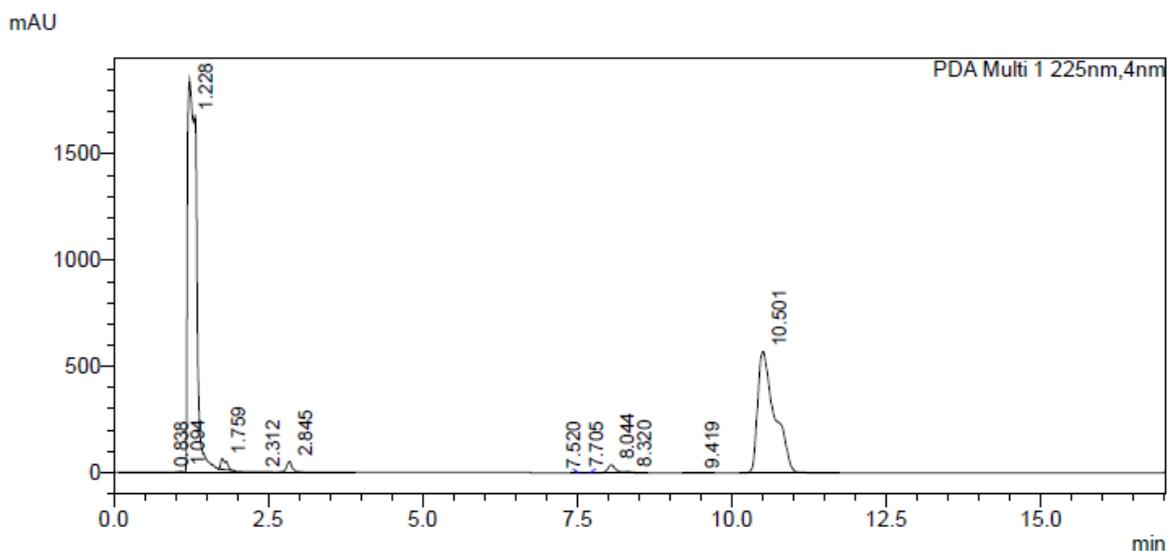


Figura 47: Cromatograma de amostra do tempo de 3 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído.

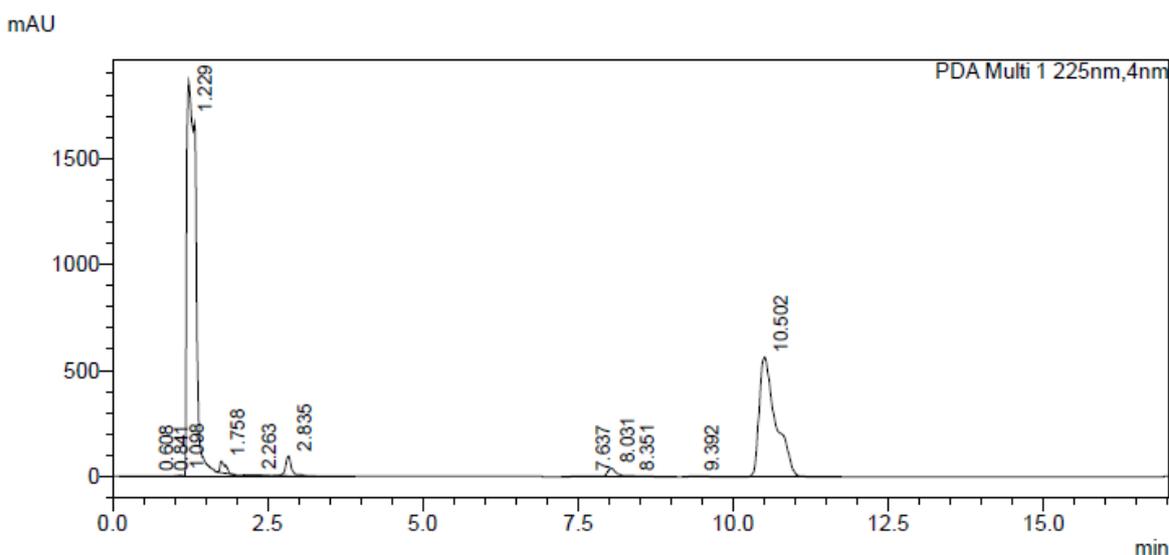


Figura 48: Cromatograma de amostra do tempo de 30 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído.

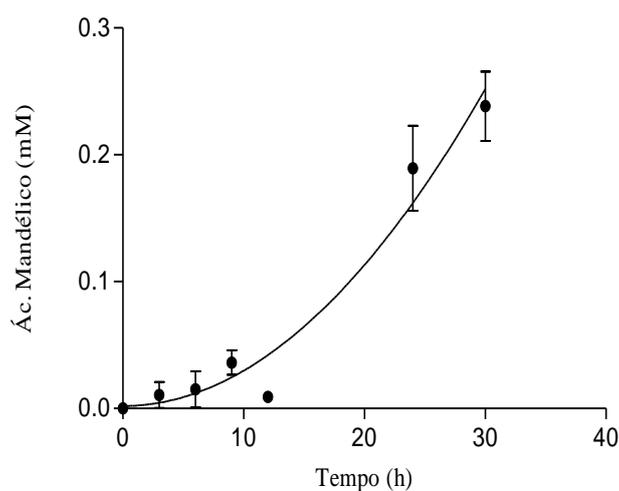


Figura 49: Ácido mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando a lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído.

Estes três derivados não apresentaram eficiência na conversão de mandelato de etila em ácido mandélico nas condições de reação utilizadas (Figuras 43, 46 e 49, tabela 7).

Por outro lado, o derivado obtido pela imobilização da lipase de *R. miehei* em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído gerou a maior concentração de ácido mandélico em 30 h de reação (2,21 mM), tendo sido, portanto, o derivado que promoveu a maior conversão (22,1%) de mandelato de etila em ácido mandélico (Figuras 50 a 52, tabela 7). Com base a equação $y = 0,0015*x^2 + 0,0306*x - 0,0114$, resultante do ajuste dos dados do gráfico, é possível estimar que com um tempo de reação de 60 h seria obtida uma conversão de 72% de mandelato de etila em ácido mandélico.

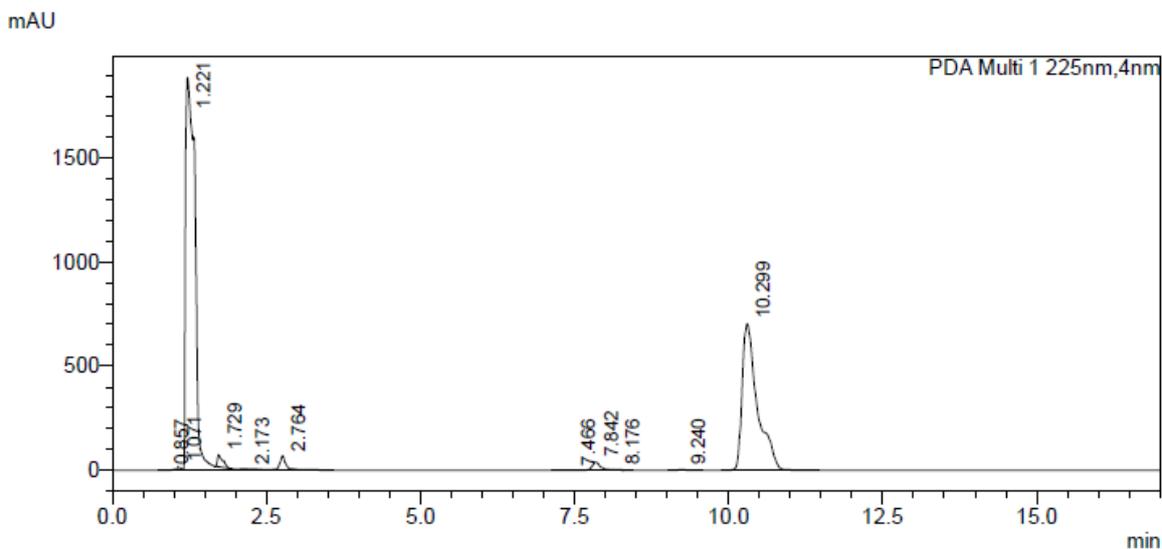


Figura 50: Cromatograma de amostra do tempo de 3 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído.

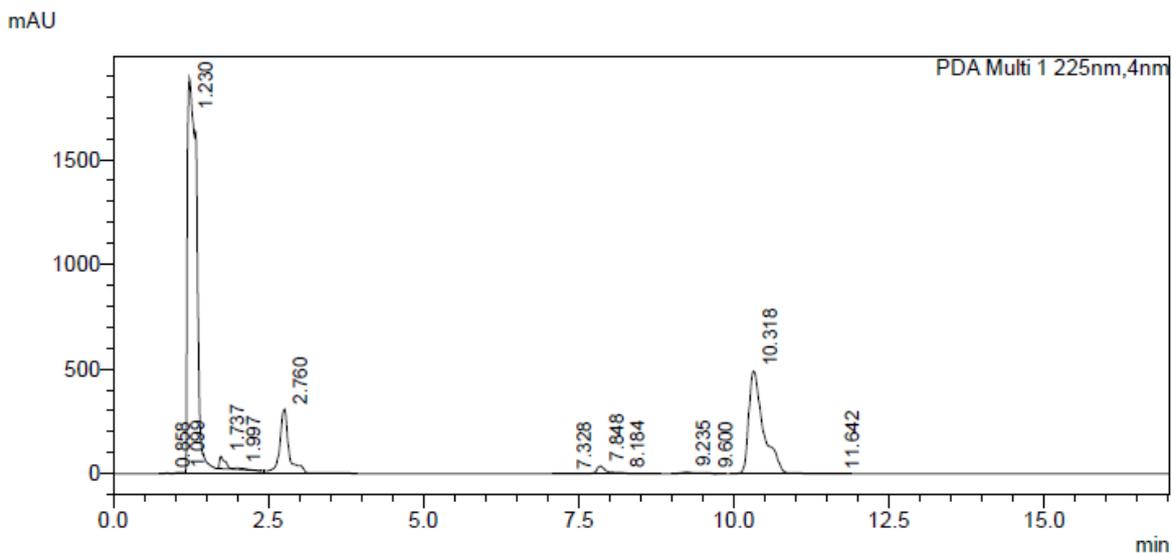


Figura 51: Cromatograma de amostra do tempo de 30 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído.

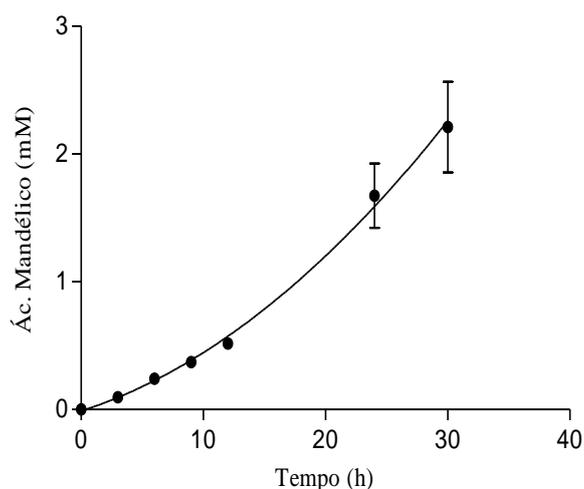


Figura 52: Ácido mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído.

Tabela 7. Conversão (%) de mandelato de etila em ácido mandélico.

| Tempo (h) | Conversão (%) | | | |
|-----------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
| | lipase de <i>C. rugosa</i> | | lipase de <i>R. miehei</i> | |
| | monômeros de glutaraldeído | octil-agarose | monômeros de glutaraldeído | octil-agarose |
| 3 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,6 |
| 30 | 2,4 | 4,2 | 22,1 | 3,6 |

A tabela 8 contém um resumo dos principais resultados obtidos para os derivados das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* imobilizadas por ligação covalente a suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído e por adsorção em octil-agarose.

Tabela 8. Comparação entre os derivados lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* imobilizadas por ligação covalente a suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído e por adsorção em octil-agarose.

| | lipase de <i>C. rugosa</i> | | lipase de <i>R. miehei</i> | |
|--|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
| | monômeros de glutaraldeído | octil-agarose | monômeros de glutaraldeído | octil-agarose |
| Rendimento de imobilização (%) | 100 | 78 | 100 | 53 |
| Atividade recuperada (%) | 47 | 21 | 67 | 34 |
| Estabilidade a 4 °C (dias) | 28 | 14 | 35 | 28 |
| Atividade de hidrólise de mandelato de etila ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ suporte) | 0,00009 | 0,0002 | 0,0007 | 0,0002 |
| Conversão (%) | 2,4 | 4,2 | 22,1 | 3,6 |

Os resultados mostram que o derivado obtido pela imobilização da lipase de *R. miehei* em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído apresentou os melhores resultados de rendimento (100%), atividade recuperada (67%), estabilidade à estocagem a 4 °C (35 dias), atividade de hidrólise de mandelato de etila (0,0007 µmol/min.mg suporte) e porcentagem de conversão (22,1%) dentre os quatro derivados analisados.

5.20 Determinação por CLAE em coluna quiral da concentração dos isômeros de ácido mandélico produzidos nas reações de hidrólise de mandelato de etila

5.20.1 Curva padrão de ácido (R)-mandélico

Para quantificar o ácido (R)-mandélico formado nas reações de hidrólise foi construída uma curva padrão de ácido (R)-mandélico. O cromatograma do padrão de ácido (R)-mandélico a 0,5 mM pode ser visualizado na figura 53 e os resultados da curva padrão estão apresentados na figura 54.

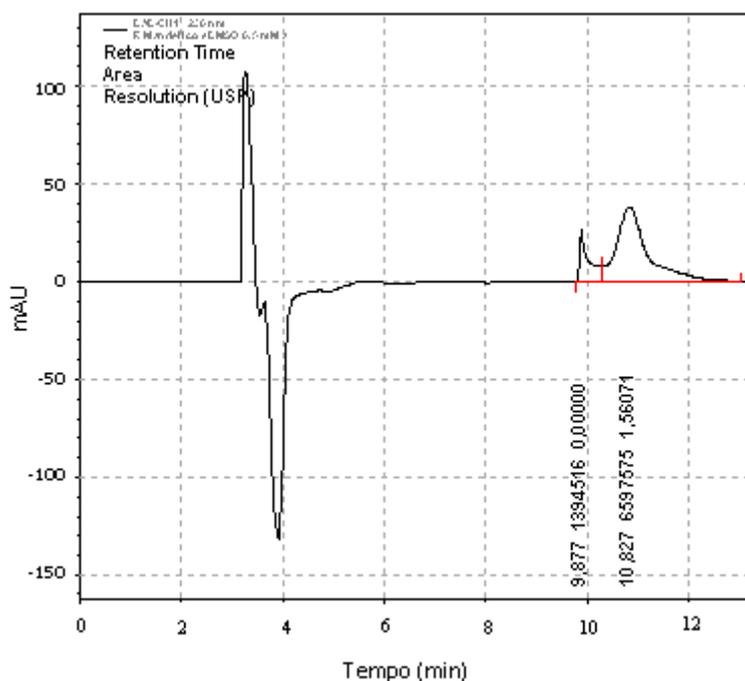


Figura 53: Cromatograma do padrão de ácido (R)-mandélico 0,5 mM.

A análise do cromatograma mostra que o pico com tempo de retenção em torno de 10,7 min corresponde ao ácido (R)-mandélico.

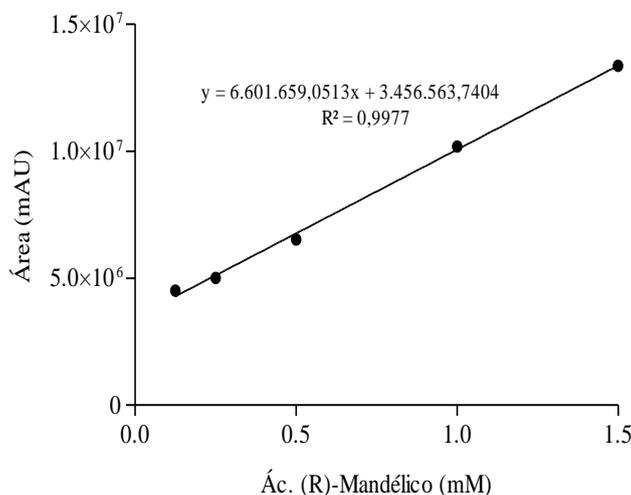


Figura 54: Curva padrão de ácido (R)-mandélico.

A curva padrão do ácido (R)-mandélico apresentou uma boa linearidade, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9977. O teste t de Student foi aplicado para as triplicatas de cada concentração de ácido (R)-mandélico e as variações não foram significativas (nível de significância $\alpha=0,05$ e intervalo de confiança de 95%).

Zhou e colaboradores (2013) conseguiram separar enantiômeros do ácido mandélico e seus derivados utilizando uma fase móvel constituída por n-hexano acidificado com ácido trifluoroacético 0,1% e isopropanol 80:20 (v/v) e 95:5 (v/v), em um fluxo de 0,8 mL/min. Entretanto, após a adaptação da metodologia, foi possível realizar as análises somente utilizando como fase móvel n-hexano acidificado com ácido trifluoroacético 0,1% e isopropanol 90:10 (v/v) e fluxo de 1,0 mL/min.

Com esta metodologia foi possível identificar o mandelato de etila e os ácidos (S)-mandélico e (R)-mandélico. Entretanto, não foi obtida uma boa resolução entre os picos destes dois isômeros, tendo sido observada a ocorrência de uma interferência possivelmente decorrente da interação do tampão utilizado no meio reacional e a fase estacionária, que inviabilizou a quantificação do ácido (R)-mandélico formado pela hidrólise do mandelato de etila. Devido a isto, não foi possível calcular o excesso enantiomérico e a enantiosseletividade para os derivados enzimáticos obtidos.

Para melhor resolução destes picos seria necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica que possibilite a resolução dos enantiômeros do ácido mandélico, sem interações/interferentes, possivelmente utilizando uma coluna quiral em fase reversa.

5.20.2 Curva padrão de ácido (S)-mandélico

Devido ao custo elevado para a aquisição de padrão de ácido (S)-mandélico, foram construídas as curvas padrão de ácido (R)-mandélico (Figura 54) e de ácido (R,S)-mandélico (Figura 56).

O cromatograma do padrão de ácido (R,S)-mandélico a 0,5 mM está apresentado na figura 55.

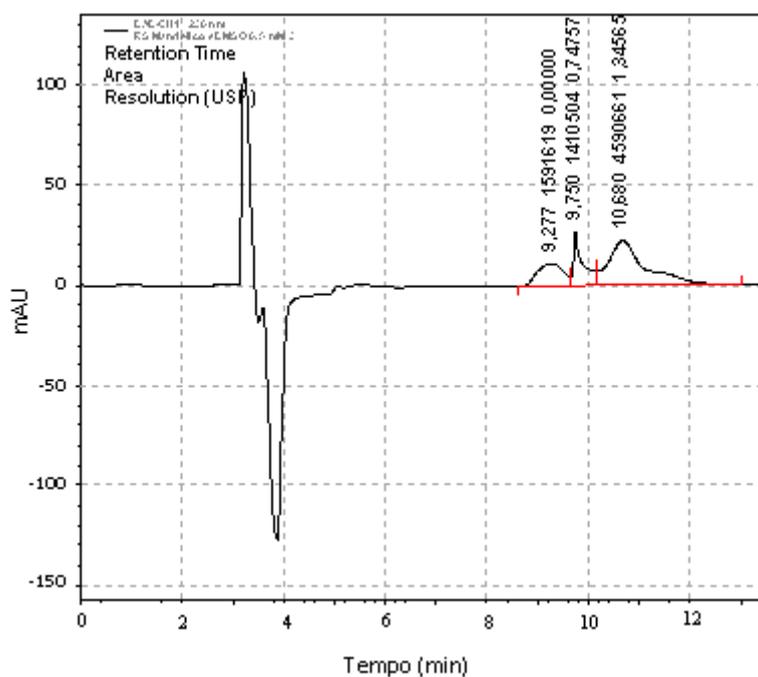


Figura 55: Cromatograma do padrão de ácido (R,S)-mandélico 0,5 mM.

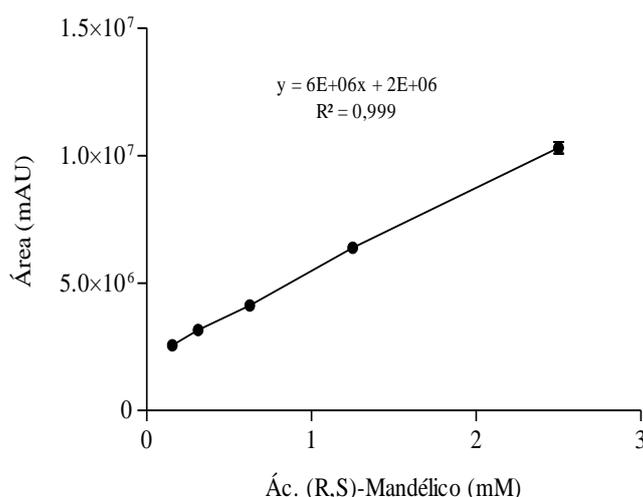


Figura 56: Curva padrão de ácido (R,S)-mandélico.

A análise dos cromatogramas mostra que o pico com tempo de retenção em torno de 10,7 min corresponde ao ácido (R)-mandélico (Figuras 53 e 55) e o pico com tempo de retenção de 9,3 min corresponde ao ácido (S)-mandélico (Figura 55).

Com as curvas padrão de ácido (R)-mandélico (Figura 54) e de ácido (R,S)-mandélico (Figura 56) foi possível calcular as porcentagens dos isômeros R (53%) e S (47%) contidas no padrão de ácido (R,S)-mandélico e utilizando os dados obtidos nos cromatogramas dos padrões de ácido (R,S)-mandélico foi construída a curva de ácido (S)-mandélico (Figura 57).

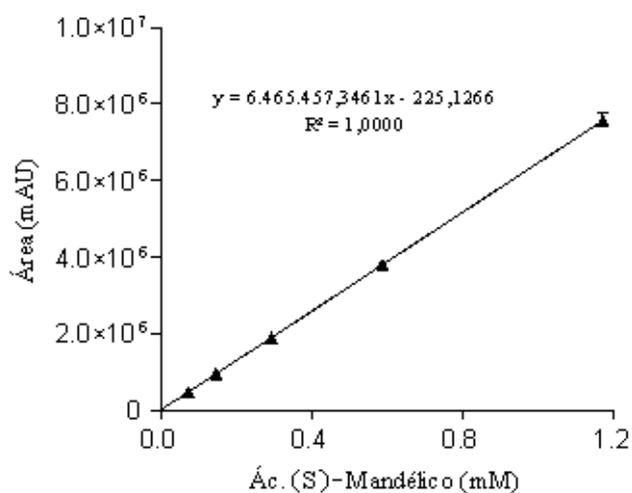


Figura 57: Curva padrão de ácido (S)-mandélico.

A curva padrão do ácido (S)-mandélico (Figura 57) apresentou uma excelente linearidade ($R^2 = 1,000$) e as variações entre as triplicatas de cada concentração de ácido (S)-mandélico não foram significativas (nível de significância $\alpha=0,05$ e intervalo de confiança de 95%).

Utilizando esta curva padrão foi possível quantificar o ácido (S)-mandélico formado nas reações de hidrólise.

5.20.3 Análise por CLAE em coluna quiral dos isômeros produzidos nas reações de hidrólise de mandelato de etila

A enantiopreferência dos derivados enzimáticos utilizados nas reações de hidrólise do (R,S)-mandelato de etila foi analisada por CLAE utilizando coluna quiral em fase normal. Os cromatogramas das amostras obtidas nos tempos 0 e 30 h da reação de hidrólise utilizando o melhor derivado enzimático estão apresentados nas figuras 58 e 59.

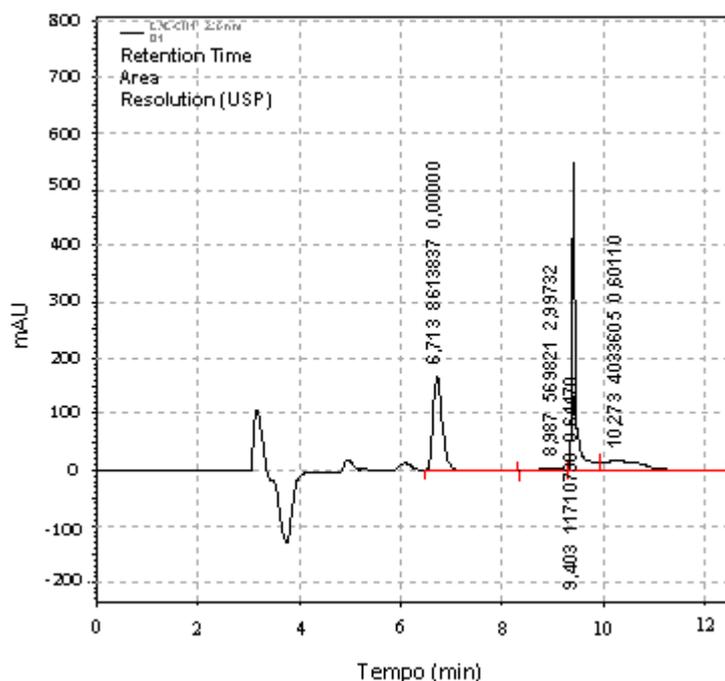


Figura 58: Cromatograma de amostra do tempo 0 da reação de hidrólise empregando a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído.

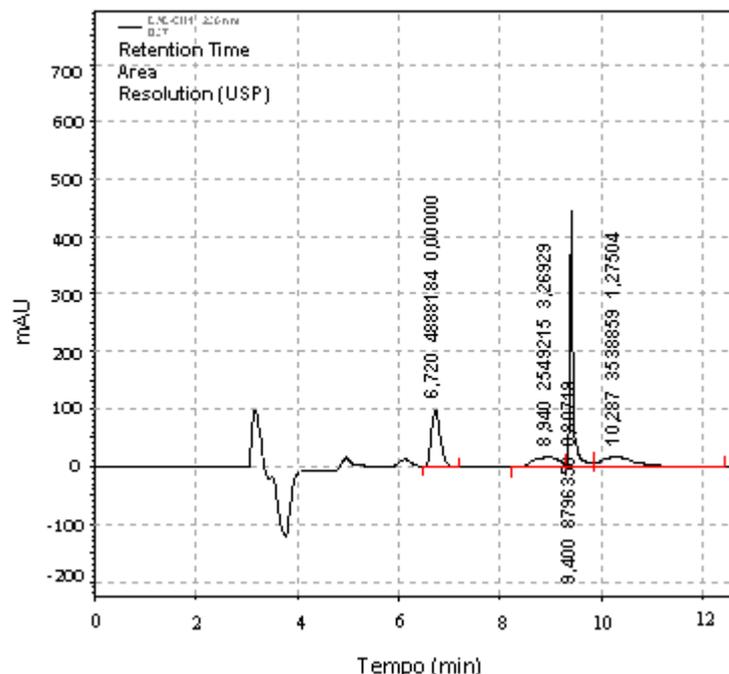


Figura 59: Cromatograma de amostra do tempo de 30 h da reação de hidrólise empregando a lipase de *R. miehei* immobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído.

A análise dos cromatogramas sugere que o pico com tempo de retenção de 6,7 min corresponde ao mandelato de etila (Figuras 58 e 59). Comparando-se os cromatogramas das amostras nos tempos 0 e 30 h de reação em que foi utilizado o derivado obtido por imobilização da lipase de *R. miehei* em suporte modificado com monômeros de glutaraldeído (Figuras 58 e 59), verificou-se uma diminuição da concentração de mandelato de etila e um aumento na concentração de ácido S-mandélico.

A formação de ácido (S)-mandélico ao longo da reação catalisada pela lipase de *R. miehei* immobilizada em suporte modificado com monômeros de glutaraldeído pode ser visualizada na figura 60.

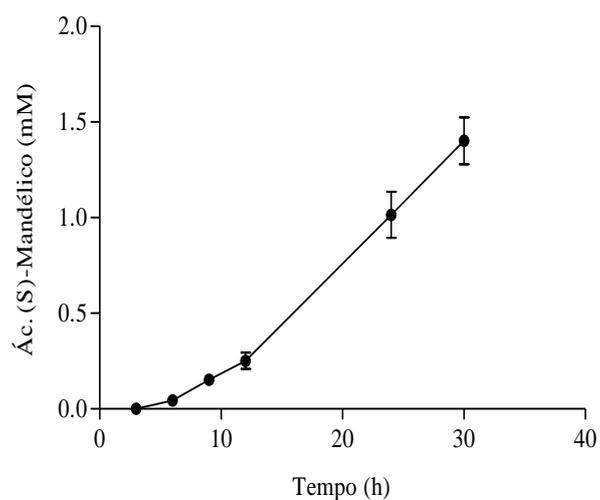


Figura 60: Ácido (S)-mandélico formado na reação de hidrólise do mandelato de etila utilizando a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído.

A comparação da concentração de ácido (S)-mandélico produzida em 30 h de reação pelos quatro derivados enzimáticos analisados demonstra que a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído foi evidentemente mais eficiente na hidrólise do mandelato de etila, produzindo 1,4 mM deste enantiômero (Figura 61).

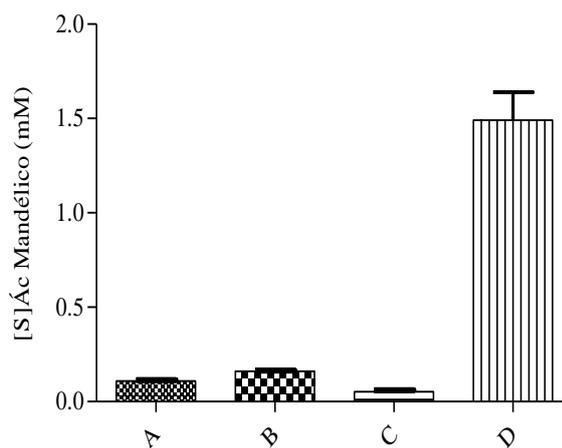


Figura 61: Ácido (S)-mandélico formado nas reações de hidrólise utilizando os derivados das lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* obtidos por imobilização em octil-agarose (A e B) e em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído (C e D), respectivamente.

A partir das concentrações médias de ácido (S)-mandélico produzido ao longo da reação de hidrólise de mandelato de etila catalisada pela lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído (Figura 61), calculou-se as porcentagens médias de ácido (S)-mandélico formado (Figura 62) em relação à concentração total de ácido mandélico em cada tempo de reação (Figura 52).

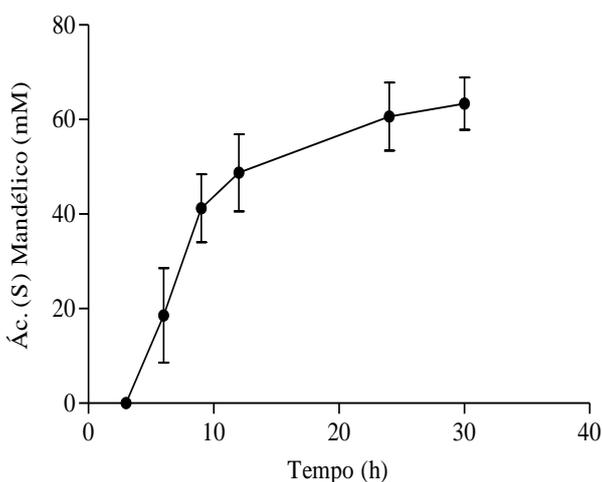


Figura 62: Porcentagem de ácido (S)-mandélico formado nas reações de hidrólise utilizando o derivado obtido com a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído.

A metodologia analítica utilizada permitiu estimar que 63% (1,4 mM) do total de ácido mandélico formado (2,21 mM) em 30 h de reação correspondem ao enantiômero *S*. Com base nestes resultados pode-se concluir que a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído tem enantiopreferência por (S)-mandelato de etila.

As lipases de *C. rugosa* e *R. miehei* diferem na geometria dos seus sítios ativos e por esta razão estão classificadas em sub-grupos distintos (PLEISS, FISCHER & SCHMID, 1998; NAIK *et al.*, 2010). A lipase de *Candida rugosa* possui sítio ativo do tipo túnel, enquanto que a lipase de *Rhizomucor miehei* possui sítio ativo do tipo fenda (Figuras 63 e 64) (PLEISS, FISCHER & SCHMID, 1998; NAIK *et al.*, 2010).

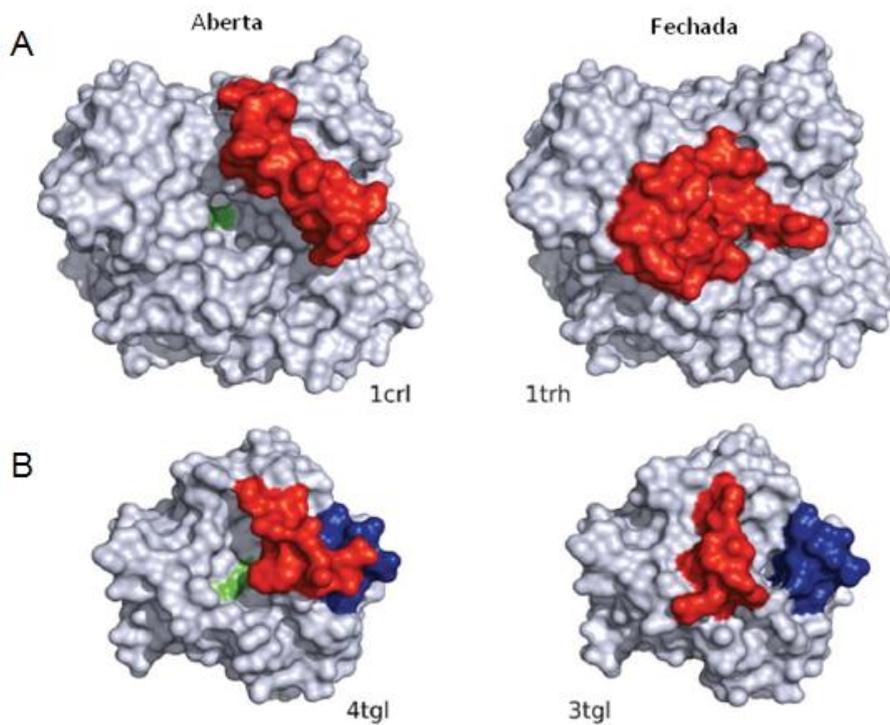


Figura 63: Estrutura dos sítios ativos das lipases de *Candida rugosa* (A) e *Rhizomucor miehei* (B). A tampa está em vermelho, a tríade catalítica em verde e o alça flexível em azul (PLEISS, FISCHER & SCHMID, 1998).

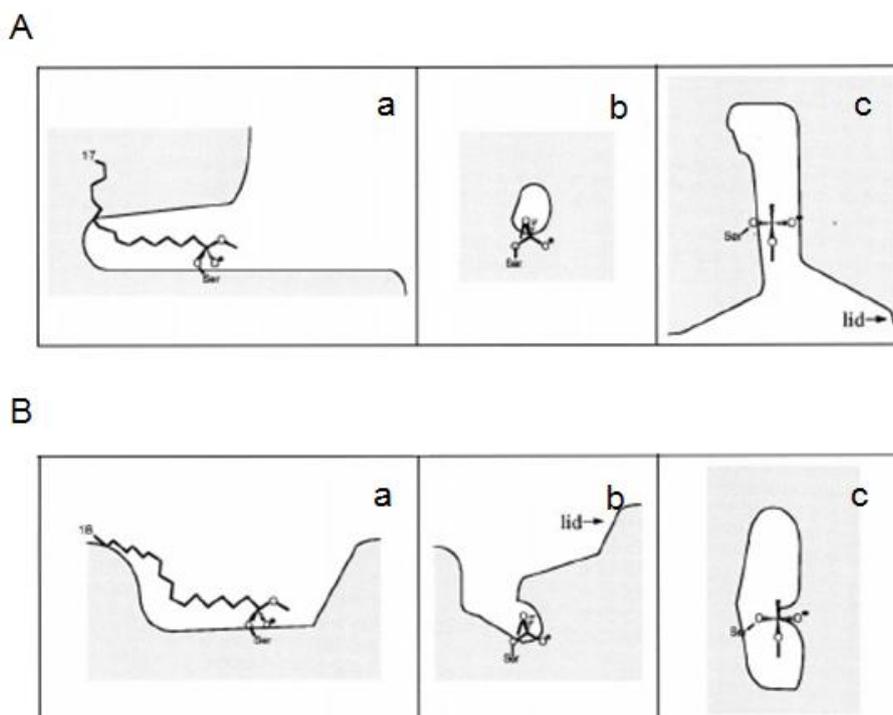


Figura 64: Esquema da geometria dos sítios ativos das lipases de *Candida rugosa* (A) e *Rhizomucor miehei* (B). Vista lateral (a), frontal (b) e de cima (c) (REHM *et al.*, 2010).

Estas enzimas também diferem no teor e distribuição dos resíduos de lisina. A lipase de *Candida rugosa* possui uma quantidade de resíduos de lisina que corresponde a cerca de 4% do total de aminoácidos da estrutura da proteína, enquanto que a lipase de *Rhizomucor miehei* tem cerca de 3% de resíduos de lisina em sua estrutura (WEBER *et al.*, 1997). Os resíduos de lisina presentes na superfície da lipase de *Candida rugosa* estão distribuídos por toda a superfície da enzima, enquanto que os da lipase de *Rhizomucor miehei* estão mais concentrados em uma região da estrutura da proteína (Figuras 65 e 66) (GROCHULSKI *et al.*, 1993; http://www.rcsb.org/pdb/explore/geoStructureApp.do?i_url=/pdb/xml/qpdb;3tgl&i_chain_id=A&i_init_option=Residue%20B%20Factor).

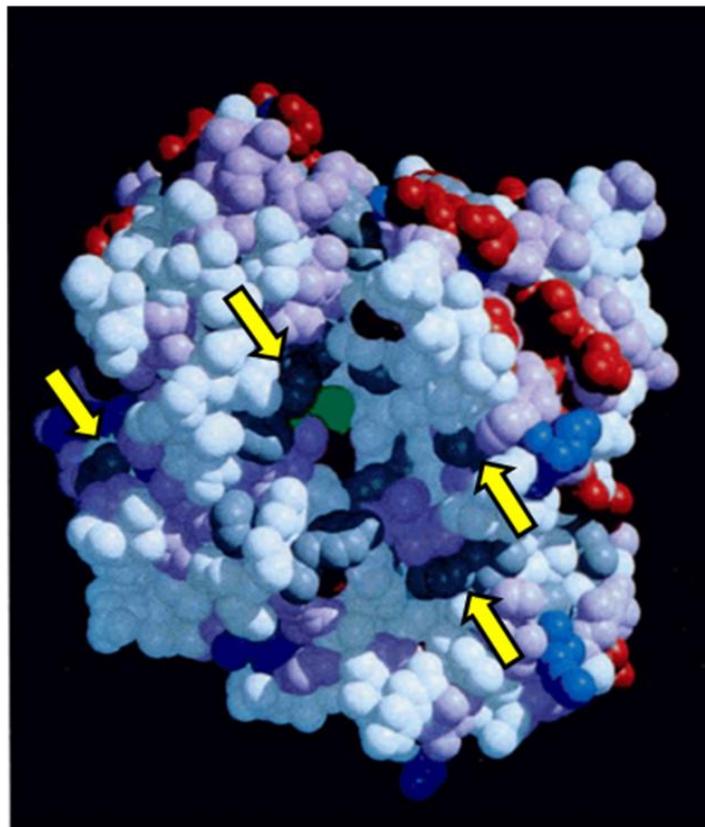


Figura 65: Estrutura da lipase de *Candida rugosa*. Resíduos de aminoácidos em azul escuro, Arg e Lys; azul claro, His; vermelho, Asp e Glu, cinza, Tyr, Trp e Phe; rosa, Thr, Ser, Asn e Gln; verde, resíduos da tríade catalítica Ser-209, Glu-341 e His-449; branco, Ile, Leu, Val, Ala, Gly, Pro, Met e Cys (GROCHULSKI *et al.*, 1993). Resíduos de lisina identificados pela seta amarela.

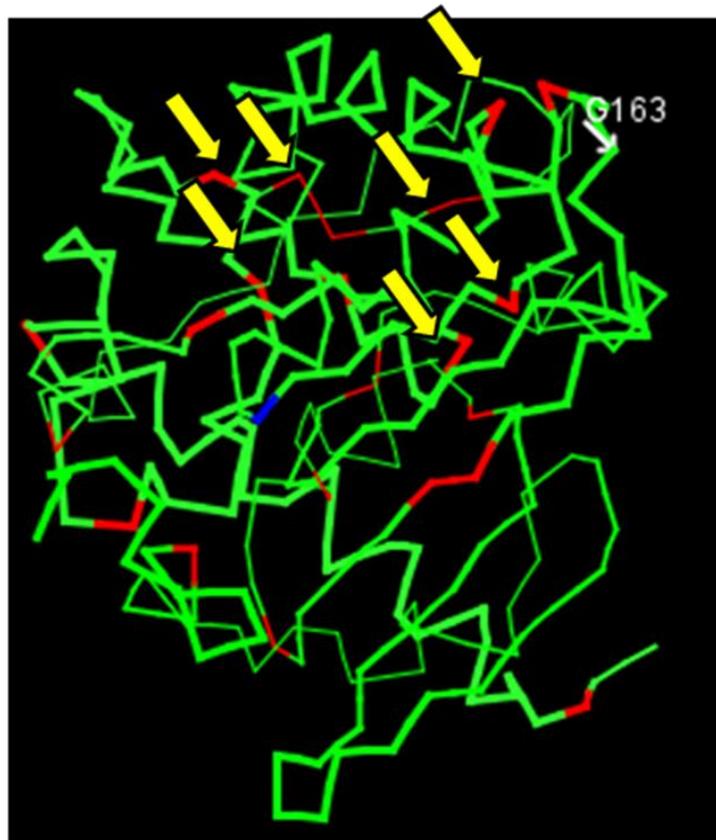


Figura 66: Estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei*. Resíduos de aminoácidos da tríade catalítica em azul e resíduos de lisina em vermelho identificados pela seta amarela (http://www.rcsb.org/pdb/explore/geoStructureApp.do?i_url=/pdb/xml/qpdb;3tgl&i_chain_id=A&i_init_option=Residue%20B%20Factor).

Devido a essa diferença nos resíduos de lisina da superfície das lipases, uma pode se ligar ao suporte ativado com monômeros de glutaraldeído de forma diferente da outra, o que explicaria a grande diferença de eficiência catalítica e, eventualmente, a enantiopreferência, que também estaria relacionada à diferença na estrutura dos sítios ativos destas enzimas.

6. CONCLUSÕES

As lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* foram imobilizadas nos suportes aminado DEAE-Sephacel, aminado modificado com monômeros e dímeros de glutaraldeído, hidróbicos fenil-agarose e octil-agarose e epóxido Eupergit C.

Utilizando CLAE em coluna quiral foi possível identificar o mandelato de etila e os ácidos (R)- e (S)-mandélicos. Entretanto, esta metodologia não permitiu uma boa resolução entre os picos dos ácidos (S)-mandélico e (R)-mandélico, tendo sido observada a ocorrência de uma interferência possivelmente decorrente da interação do tampão utilizado no meio reacional e a fase estacionária, que inviabilizou a quantificação do ácido (R)-mandélico formado pela hidrólise do mandelato de etila. Devido a isto, não foi possível calcular o excesso enantiomérico e a enantiosseletividade para os derivados enzimáticos obtidos.

Dentre os quatro derivados selecionados para utilização em reações de hidrólise do mandelato de etila, o derivado obtido com a lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado modificado com monômeros de glutaraldeído apresentou os melhores resultados de rendimento (100%), atividade recuperada (67%), estabilidade a estocagem a 4 °C (35 dias), atividade de hidrólise de mandelato de etila (0,0007 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ suporte) e porcentagem de conversão de mandelato de etila em ácido mandélico (22,1%).

A lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte aminado pré-ativado com monômeros de glutaraldeído foi mais eficiente na hidrólise do mandelato de etila, produzindo 1,4 mM de ácido (S)-mandélico. Estima-se que 63% do total de ácido mandélico produzido em 30 h de reação (2,21 mM) corresponda ao enantiômero *S*. Com base nestes resultados pode-se concluir que este derivado enzimático tem enantiopreferência pelo (S)-mandelato de etila.

7. PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho são:

- desenvolver uma metodologia analítica que possibilite a resolução dos enantiômeros do ácido mandélico, sem interações/interferentes, possivelmente utilizando uma coluna quirál em fase reversa.
- utilizar outras metodologias de imobilização para obter novos derivados da lipase de *Rhizomucor miehei* e comparar suas características com as do melhor derivado obtido neste trabalho.
- preparar derivados das lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* por imobilização em suporte Eupergit C, determinar estabilidade à estocagem a 4 °C e utilizar em reações de hidrólise de mandelato de etila, para comparação com o melhor derivado obtido neste trabalho.
- preparar e caracterizar derivados de outras lipases disponíveis comercialmente, tais como a lipase de *Candida antarctica* e a lipase de *Burkholderia cepacea*.
- avaliar o efeito das condições de reação (pH, temperatura e solventes orgânicos) na resolução cinética de mandelato de etila em reações de hidrólise catalisadas pelas lipases imobilizadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOH, C.C., LEE, G.C., SHAW, J.F. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids* 39(6), 513-526, 2004.
- ALCALDE, M., FERRER, M., PLOU, F.J., BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.* 24, 281-287, 2006.
- ALCÁNTARA, A.R., DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P., FERNÁNDEZ, M., HERNÁIZ, M.J., SÁNCHEZ-MONTERO, J.M., SINISTERRA, J.V. Resolution of racemic acids, esters and amines by *Candida rugosa* lipase in slightly hydrated organic media. *Food Technol Biotechnol* 42(4), 343-354, 2004.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnol. Lett.*, 21, 313-319, 1999.
- AVILA, R., RUIZ, R., AMARO-GONZÁLEZ, D., DÍAZ, O., GONZÁLEZ, J.A., NÚÑEZ, A.J. Increased racemate resolution of propranolol esters by lipase immobilized catalysis. *Latin Am. Appl. Res.* 35, 307-311, 2005.
- BAI, S., GUO, Z., LIU, W., SUN, Y. Resolution of (\pm)-menthol by immobilized *Candida rugosa* lipase on superparamagnetic nanoparticles. *Food Chem.* 96, 1-7, 2006.
- BARBOSA, O., ARIZA, C., ORTIZ, C., TORRES, R. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). *New Biotechnology*, 27 (6), 844-850, 2010.
- BARRET, A.M. Cardio beta-adrenoceptor blockade: the guest for selectivity. *J. Pharm.* 16 (2), 95-108, 1985.
- BARROS RUI, M., EXTREMINA, C.I., GONÇALVES, I.C., BRAGA, B.O., BALCÃO, V.M., MALCATA, F.X. Hydrolysis of α -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 908-916, 2003.
- BASRI, M., AMPON, K., YUNUS, W.M.Z., RAZAK, C.N.A., SALLEH, A.B.. Enzymatic synthesis of fatty esters by hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer beads. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 407-411, 1995.
- BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISEN, P., FERNÁNDEZ-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.

- BENJAMIN, S., PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43 (5), 453-460, 2000.
- BES T., GOMEZ-MORENO C., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Selective enzymatic oxidations: stabilization by multipoint covalent attachment of ferredoxin NAD-reductase: an interesting cofactor recycling enzyme. *J Mol Catal* 98, 161-169, 1995.
- BETANCOR, L., FUENTES, M., DELLAMORA-ORTIZ, G., LÓPEZ-GALLEGO, F., HIDALGO, A., ALONSO-MORALES, N., MATEO, C., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 32, 97-101, 2005.
- BETANCOR, L., LÓPEZ-GALLEGO, F., ALONSO-MORALES, N., DELLAMORA-ORTIZ, G., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Glutaraldehyde in Protein Immobilization. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*. Second edition. Ed. J.M. Guisán, Methods in Biotechnology. Vol. 22, Humana Press, Totowa, New Jersey, p. 57-64, 2006a.
- BETANCOR, L., LÓPEZ-GALLEGO, F., HIDALGO, A., ALONSO-MORALES, N., DELLAMORA-ORTIZ, G., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 877-882, 2006b.
- BIASUTTI, M.A., ABUIN, E.B., SILBER, J.J., CORREA, N.M., LISSI, E.A. Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants. *Adv. Colloid Interface Sci.* 136, 1-24, 2008.
- BOMMARUS, A.S., POLIZZI, K.M. Novel biocatalysts: Recent developments. *Chem. Eng. Sci.* 61, 1004-1016, 2006.
- BOLIVAR, J.M., MATEO, C., GODOY, C., PESSELA, B.C.C., RODRIGUES, D.S., GIORDANO, R.L.C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISAN, J.M. The cooperative effect of physical and covalent protein adsorption on heterofunctional supports. *Process Biochemistry*, 44, 757-763, 2009.
- BORGSTON, B., BROCKMAN, H.L. Lipases. Elsevier. Amsterdam. 1984.
- BRADY, L., BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z.S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TORKEMBURG, J.P., CHRISTIASSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L., MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, 767-770, 1990.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.
- BRAHIMI-HORN, M.C., GUGLIELMINO, M.L., ELLING, L., SPARROW, L.G. The esterase profile of a lipase from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta* 1042, 51-54, 1990.
- BRASIL (2003) Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RDC nº 899.
- BRÍGIDA, A.I.S. (2010) Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 193p.
- BROCCA, S., GRANDORI, R., BREVIARIO, D., LOTTI, M. Localization of lipase genes on *Candida rugosa* chromosomes. *Curr Genet* 28, 454-457, 1995.
- BRZOZOWSKI, A.M., SAVAGE, H., VERMA, C.S., TURKENBURG, J.P., LAWSON, D.M., SVENDSEN, A., PATKAR, S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39, 15071-15082, 2000.
- BURTEAU, N., BURTON, S., CRICHTON, R.R., Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase. *FEBS Lett.* 258, 185-189, 1989.
- CABRERA, Z., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., PALOMO, J.M., GUISÁN, J.M. Enhancement of Novozyme-435 catalytic properties by physical or chemical modification. *Process Biochem.* 44, 226-231, 2009.
- CAMPBELL, R.F., FITZPATRICK, K., INGHARDT, T., KARLSSON, O., NILSSON, K., REILLY, J.E., YET, L. Enzymatic resolution of substituted mandelic acids. *Tetrahedron Lett.* 44, 5477-5481, 2003.
- CARNELL, A. J. Desymmetrisation of prochiral ketones using lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 19–20, 83-92, 2002.
- CARREA, G., RIVA, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Edit.* 39, 2226-2254, 2000.
- CARVALHO, C.M.L., CABRAL, J.M.S. Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* 82, 1063-1085, 2000.
- CASTRO, H.F., ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova* 18, 544-554, 1995.
- CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C., AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27(1), 146-156, 2004.

- CHAUBEY, A., PARSHAD, R., KOUL, S., TANEJA, S.C., QAZI, G.N. Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter* sp. lipase: kinetic resolution of fluoxetine intermediate. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 42, 39-44, 2006.
- CHAUBEY, A., PARSHAD, R., GUPTA, P., TANEJA, S.C., QAZI, G.N., RAJAN, C.R., PONRATHNAM, S. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization for preparation of enantiopure masked β -amino alcohols. *Bioorg. Med. Chem.* 17(1), 29-34, 2009.
- CHEN, C.S., FUJIMOTO, Y., GIRDAUKAS, G., SIH, C.J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7294-7299, 1982.
- CHEN, B., HU, J., MILLER, E.M., XIE, W.C., CAI, M.M., GROSS, R.A. *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules* 9, 463-471, 2008.
- CLARK, D.S. Characteristics of nearly dry enzymes in organic solvents: implications for biocatalysis in the absence of water. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 359, 1299-1307, 2004.
- COLLINS, A. N., SHELDRAKE, G. N., CROSBY, J. (1997). Chirality in Industry. John Wiley: Chichester, UK.
- COPPOLA, G., SCHUSTER, H. α -Hydrolytic acids in enantioselective synthesis. Weinheim: Wiley-VCH; 1997.
- CÓRDOVA, A., JANDA, K.D. A highly chemo and stereoselective synthesis of B-keto esters via a polymer-supported lipase catalyzed transesterification. *J. Org. Chem.* 66, 1906-1909, 2001.
- COSTA NETO, P.R. (2002). Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Química. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 118p.
- CRUZ, J.C., PFROMM, P.H., REZAC, M.E. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica. *Process Biochem.* 44, 62-69, 2009.
- DABULIS, K., KLIBANOV, A.M. Dramatic enhancement of enzymatic-A activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 566-571, 1993.
- DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M.G., SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova* 27, 623-630, 2004.
- DA SILVA, T.M. (2009) Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em

Biologia Comparada. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 216p.

- 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.
- DEREWENDA, U., BRZOZOWSKI, A.M., LAWSON, D.M., DEREWENDA, Z.S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* 31, 1532-1541, 1992.
- DEREWENDA, Z.S., DEREWENDA, U., DODSON, G.G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* tryacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227, 818-839, 1992.
- DOS REIS-COSTA, L.S., ANDREIMAR, M., FRANÇA, S.C., TREVISAN, H.C., ROBERTS, T.J.C. Immobilization of lipases and assay in continuous fixed bed reactor. *Protein Peptide Lett.* 10, 619-628, 2003.
- D'SOUZA, S.F., KUBAL, B.S. A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 51, 151-159, 2002.
- EBERT, C., FERLUGA, G., GARDOSI, 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.
- FABER, K.; ed. Em *Biotransformation in Organic Chemistry*; 4^a ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2000.
- FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. ARMISÉN, P., SABUQUILLO, P., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids* 93, 185-197, 1998.
- FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUEZ, V., GUISÁN, J.M. The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into keto acids (phenylpyruvic acid). *Enzyme Microb. Technol.* 23, 28-33, 1998.
- FERNANDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., FUENTES, M., MATEO, C., GUISAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Self-Assembly of *Pseudomonas fluorescens* Lipase Into Bimolecular Aggregates Dramatically Affects Functional Properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 232-237, 2003.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., CABRERA, Z., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 565-569, 2007.

- FERNÁNDEZ-LORENTE, G., CABRERA, Z., GODOY, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., PALOMO, J.M., GUISÁN, J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem.* 43, 1061-1067, 2008.
- FILHO, M., PESSELA, B.C., MATEO, C., CARRASCOSA, A.V., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Immobilization-stabilization of an α -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 265-271, 2008.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, Department of Health and Human Services, Development of New Stereoisomeric Drugs, <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm>, publicado em 5 de janeiro de 1992, atualizado em 6 de julho de 2005, acesso em 13 de setembro de 2010.
- FRIGERIO, N.A., SHAW, M.J. A Simple method for determination of glutaraldehyde. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 17 (3), 176-181, 1968.
- GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* 17, 1-15, 2005.
- GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 63, 1721-1754, 2007.
- GOODMAN, L., GILLMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. MacMillan Company, 10th Edition, 2005.
- GOTOR-FERNANDEZ, V., BRIEVA, R., GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 40, 111-120, 2006.
- GROCHULSKI, P., LI, Y., SCHRAG, J.D., CYGLER, M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* 3, 82-91, 1994.
- GROCHULSKI, P., LI, Y., SCHRAG, J.D., BOUTHILLIER, F., SMITH, P., HARRISON, D., RUBIN, B., CYGLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (17), 12843-12847, 1993.
- GROEGER, H. Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α -hydrolytic carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis. *Adv Synth Catal.* 343, 547-558, 2001.
- GUIDINI, C.Z., FISCHER, J., SANTANA, L.N.S., CARDOSO, V.L., RIBEIRO, E.J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by

- combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 137-143, 2010.
- GUISÁN, J.M. Immobilization of Enzymes and Cells, second ed. Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp. 107-128, 2006.
- GUPTA, M.N. Thermostabilization of proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 14, 1-11, 1991.
- GUPTA, A., KHARE, S.K. Enzymes from solvent-tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29, 44-54, 2009.
- GUIEYSSE, D., SANDOVAL, G., FAURE, L., NICAUD, J.-M., MONSAN, P., MARTY, A. New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 3539-3543, 2004.
- HANSEN, M.M., BORDERS, S.S.K., CLAYTON, M.T., HEATH, P.C., KOLIS, S.P., LARSEN, S.D., LINDER, R.J., REUTZEL-EDENS, S.M., SMITH, J.C., TAMEZE, S.L., WARD, J. A., WEIGEL, L.O. Development of a practical synthesis of an aminoindanol-derived M1 agonist. *Org. Process Res. Dev.*, 13, 198-208, 2009.
- HASAN, F., SHAH, A.A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 235-251, 2006.
- 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.
- HOSHINO, T., YAMANE, T., SHIMIZU, S. Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acid. *Agric. Biol. Chem.* 54, 1459–1467, 1990.
- HSU, S.H., WU, S.S., WANG, Y.F., WONG, C.H. Lipase-catalyzed irreversible transesterification using enol esters: XAD-8 immobilized lipoprotein lipase-catalyzed resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron Lett.* 31, 6403-6406, 1990.
- HUMMEL, W., SCHUTTE, H., KULA, M.R. Microbiologically produced D-mandelate dehydrogenase process for obtaining it and its use. US Patent 4, 824, 781, 1989.
- HWANG, S., LEE, K., PARK, J., MIN, B., HAAM, S., AHN, I., JUNG, J. Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. *Biochem. Eng. J.* 17, 85-90, 2004.
- IDRIS, A., MOHD ZAIN, N.A., SUHAIMI, M.S. Immobilisation of Bakers yeast invertase in PVA–alginate matrix using innovative immobilization technique. *Process Biochem* 43, 331-338, 2008.
- IDRIS, A., BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances* 30, 550-563, 2012.

- JIANG, Y.Y., GUO, C., XIA, H.S., MAHMOOD, I., LIU, C.Z., LIU, H.Z. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: enzyme activity in catalyzing esterification. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 58, 103-109, 2009.
- KARIM, M.R., HASHINAGA, F. Preparation and properties of immobilised pumelo, limonoid glycosyltransferase. *Process Biochem* 38, 809-814, 2002.
- KAPOOR, M., ANAND, N., KOUL, S., CHIMNI, S.S., MANHAS, K.S., RAINA, C., PARSHAD, R., TANEJA, S.C., QAZI, G.N. Kinetic resolution of 1-chloro-3-(1-naphthoxy)-2-propanol, an intermediate in the synthesis of β -adrenergic blockers. *Bioorg. Chem.* 31, 259-269, 2003.
- KAPOOR, M., ANAND, N., AHMAD, K., KOUL, S., CHIMNI, S.S., TANEJA, S.C. AND QAZI, G.N. Synthesis of β -adrenergic blockers (R)-(-)-nifenalol and (S)-(+)-sotalol via a highly efficient resolution of a bromohydrin precursor. *Tetrahedron: Asymmetry* 16, 717-725, 2005.
- KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* 11, 471-478, 1993.
- KATCHALSKI-KATZIR, E., KRAEMER, D. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10, 157-176, 2000.
- KAZLAUSKAS, R.J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Op. Chem. Biol.* 9, 195-201, 2005.
- KENNEDY, J.F., WHITE, C.A., MELO, E.H.M. The immobilization of enzymes and cells. *Chimica Oggi*, 5, 21-29, 1988.
- KIM, K.K., SONG, H.K., SHIN, D.H., HWANG, K.Y., SUH, S.W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5, 173-185, 1997.
- KIRIHARA, M., KAWASAKI, M., TAKUWA, T., KAKUDA, H., WAKIKAWA, T., TAKEUCHI, Y., KIRK, K. L. Efficient synthesis of (R)- and (S)-1-amino-2,2-difluorocyclopropanecarboxylic acid via lipase-catalyzed desymmetrization of prochiral precursors. *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 1753-1761, 2003.
- KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409, 241-246, 2001.
- KLIBANOV, A.M. Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 427-431, 2003.
- KNEZEVIC, Z., MILOSAVIC, N., BEZBRADICA, D., JAKOVLJEVIC, Z., PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by covalent attachment *Biochemical Engineering Journal* 30, 269-278, 2006.

- KOELLER, K.M., WONG, C.-H. Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409, 232-240, 2001.
- KUMAR, S., MOHAN, U., KAMBLE, A.L., PAWAR, S., BANERJEE, U.C. Cross-linked enzyme aggregates of recombinant *Pseudomonas putida* nitrilase for enantioselective nitrile hydrolysis. *Biores. Technol.* 101, 6856-6858, 2010.
- KUROIWA, T., NOGUCHI, Y., NAKAJIMA, M., SATO, S., MUKATAKA, S., ICHIKAWA, S. Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylose-coated magnetic nanoparticles. *Process Biochem.* 43, 62-69, 2008.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- LALONDE, J. Practical catalysis with enzyme crystals. *ChemTech* 15, 38-45, 1997.
- LAMAS ESTELA, M., BARROS RUI, M., BALCÃO, V.M., MALCATA, F.X. Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 642-652, 2001.
- LEI, L., BAI, Y.X., LI, Y.F., YI, L.X., YANG, Y., XIA, C.G. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *J.Magn.Magn.Mater.* 321, 252-258, 2009.
- LI, N., ZONG, M.-H., MA, D. *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed regioselective acylation of nucleosides: Enzyme substrate recognition. *J. Biotechnol.* 140, 250-253, 2009.
- LIMA, V.L.E. Os fármacos e a quiralidade: um breve abordagem. *Química Nova* 20(6), 657-663, 1997.
- LINDSAY, P.J., CLARK D.S., DORDICK J.S. Combinatorial formulation of biocatalyst preparation for increased activity in organic solvents: Salt activation of Penicillin amidase. *Biotechnol Bioeng.* 85, 553-560, 2004.
- LÓPEZ-GALLEGO, F., BETANCOR, L., MATEO, C., HIDALGO, A., ALONSO-MORALES, N., DELLAMORA-ORTIZ, G., GUIÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.* 119, 70-75, 2005.
- LÓPEZ, N., PERNAS, M.A., PASTRANA, L.M., SÁNCHEZ, A., VALERO, F., RÚA, M.L. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. *Biotechnol Prog* 20, 65-73, 2004.

- LOTTI, M., GRANDORI, R., FUSETTI, F., LONGHI, S., BROCCA, T., ALBERGHINA, L. Molecular cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene* 124, 45-55, 1993.
- LOTTI, M., BROCCA, S., FUSETTI, F., ALBERGHINA, L. Expression of recombinant *Candida rugosa* lipase. *Med Fac Landbouww Univ Gent* 59(4b), 2313-2319, 1994a.
- LOTTI, M., TRAMONTANO, A., LONGHI, S., FUSETTI, F., BROCCA, S., PIZZI, E., ALBERGHINA, L. Variability within the *Candida rugosa* lipases family. *Protein Eng* 7, 531-537, 1994b.
- LOTTI, M., ALBERGHINA, L. *Candida rugosa* lipase isoenzymes. In: Malcata FX, ed. *Engineering of/with Lipases*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 115-124, 1996.
- LOUWRIER, A. Industrial products: the return to carbohydrate-based industries. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27, 1-8, 1998.
- MAGNAN, E., CATARINO, I., PAOLUCCI-JEANJEAN, D., PREZIOSI-BELLOU, L., BELLEVILLE, M.P. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *Journal of Membrane Science*, 241, 161-166, 2004.
- MANCHEÑO, J.M., PERNAS, M.A., MARTÍNEZ, M.J., OCHOA, B., RÚA, M.L., HERMOSO, J.A. Structural insights into the Lipase/esterase behaviour in the *Candida rugosa* Lipases Family: Crystal Structure of the Lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 332, 1059-1069, 2003.
- MAO, S., ZHANG, Y., ROHANI, S., RAY, A.K. Chromatographic resolution and isotherm determination of (*R,S*)-mandelic acid on Chiralcel-OD column. *J. Sep. Sci.* 35, 2273-2281, 2012.
- MARGOLIN, A.L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 266-280, 1993.
- MARÍA, P.D., MONTERO, J.M.S., SINISTERRA, J.V., ALCÁNTARA, A.R. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol Adv* 24, 180-196, 2006.
- MARZO, A. How incoming guidelines on chiral drugs could impact on the international scenery of drug development. *Bollettino Chimico Farmaceutico* 132, 267-271, 1993.
- MATEO, C., ABIAN, O., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 509-515, 2000.
- MATEO, C., TORRES, R., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., ORTIZ, C., FUENTES, M., HIDALGO, A., LÓPEZ-GALLEGO, F., ABIAN, O., PALOMO, J.M., BETANCOR,

- L., PESSELA, B., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* 4, 772-777, 2003.
- MATEO, C., PALOMO, J.M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451-1463, 2007.
- MERRIL, C.R. Gel-Staining Techniques. *Meth. Enzymol.* 182, 477-488, 1990.
- MILED, N., BEISSON, F., DE CARO, J., DE CARO, A., ARONDEL, V., VERGER, R. Interfacial catalysis by lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11, 65-171, 2001.
- MOHD ZAIN, N.A., SUHAIMI, M.S., IDRIS, A. Hydrolysis of liquid pineapple waste by invertase immobilised in PVA-alginate matrix. *Biochem Eng J* 50(3), 83-88, 2010.
- MONTERDE, M., BRIEVA, R., SANCHEZ, V.M., BAYOD, M., GOTOR, V. Enzymatic resolution of the chiral inductor 2-methoxy-2-phenylethanol. *Tetrahedron: Asymmetry* 13, 1091-1096, 2002.
- MURTY, V.R., BHAT, J., MUNISWARAN, P.K.A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 7, 57-66, 2002.
- NAIK, S., BASU, A., SAIKIA, R., MADAN, B., PAUL, P., CHATERJEE, R., BRASK, J., SVENDSEN, A. Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 65, 18-23, 2010.
- NARDINI, M., LANG, D.A., LIEBETON, K., JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B.W. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* 275, 31219-31225, 2000.
- NIETO, I., ROCCHIETTI, S., UBIALLI, D., SPERANZA, G., MORELLI, C.F., FUENTES, I.E., ALCÁNTARA, A.R., TERRENI, M. Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract-enzymatic resolution of (R,S)-2-tetralol. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 514-520, 2005.
- OSPRIAN, I., FECHTER, M.H., GRIENGL, H. Biocatalytic hydrolysis of cyanohydrins: an efficient approach to enantiopure alpha-hydroxy carboxylic acids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 24-25, 89-98, 2003.
- OZMEN, E.Y., SEZGIN, M., YILMAZ, M. Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *J. Mol. Catal.: B Enzym.* 57, 109-114, 2009.

- OZTURK, N., TABAK, A., AKGOL, S., DENIZLI, A. Reversible immobilization of catalase by using a novel bentonite–cysteine (Bent–Cys) microcomposite affinity sorbents. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 322, 148-154, 2008.
- PALLA, C.A., PACHECO, C., CARRÍN, M.E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal* 55, 199-207, 2011.
- PALOMO, J.M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FUENTES, M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica B* lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (\pm)- α -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* 13, 1337-1345, 2002a.
- PALOMO, J.M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., ORTIZ, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, 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, 2002b.
- PALOMO, J.M., MUNOZ, G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 19, 279-286, 2002c.
- PALOMO, J.M., FUENTES, M., FERNANDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., GUISAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality. *Biomacromolecules*, 4(1), 1-6, 2003.
- PALOMO, J., ORTIZ, C., FUENTES, M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. *J. Chromat. A* 1038, 267-273, 2004.
- PALOMO, J.M., SEGURA, R.L., MATEO, C., TERRENI, M., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Asymmetric reduction of acetophenone using lithium aluminium hydride modified with some novel amino alcohol Schiff bases. *Tetrahedron Asymmetry* 16, 869-874, 2005.
- PALOMO, J.M., SEGURA, R.L., FUENTES, M., ORTIZ, C.C., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Unusual enzymatic resolution of (\pm)-glycidyl-butyrate for the production of (S)-glycidyl derivatives. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 429-435, 2006.
- PALOMO, J.M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. *Adv. Synth. Catal.* 349, 1119-1127, 2007.

- PALOMO, J.M., SEGURA, R.L., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 704-707, 2007.
- PÁMIÉS, O., BACKVALL, J. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution. *Trends Biotechnol.* 22, 130-135, 2004.
- 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.
- PARK, Y.K., PASTORE, G.M., ALMEIDA, M.M. Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 252-254, 1988.
- PASTORE, G.M.; MACEDO, G.A. e PARK, Y.K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum sp.* *Rev. Microbiol.* 28, 90-95, 1997.
- PATEL, R.N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 804-826, 2002.
- PAULA, A.V., MOREIRA, A.B.R., BRAGA, L.P., CASTRO, H.F., BRUNO, L.M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Química Nova* 31, 35-40, 2008.
- PEREIRA-MEIRELLES, F.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.M., SANT'ANNA G.L Jr. A stable lipase from *Candida lipolytica*: cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65, 73-85, 1997.
- PERNAS, M.A., LOPEZ, C., PASTRANA, L., RUA, M.L. Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology*, 84, 163-174, 2000.
- PERSSON, M., BULOW, L., MOSBACH, K. Purification and site-specific immobilization of genetically engineered glucose dehydrogenase on thiopropyl-sepharose. *FEBS Lett* 270, 41-44, 1990.
- PERSSON, M., WEHTJE, E., ADLERCREUTZ, P. Factors governing the activity of lyophilised and immobilised lipase preparations in organic solvents. *Chem-BioChem* 3, 566-571, 2002.
- PESSELA, B.C.C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., FUENTES, M., VIÁN, A., GARCÍA, J.L., CARRASCOSA, A.V., MATEO, C., GUISÁN, J.M. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 369-374, 2003.

- PFROMM, P.H., REZAC, M.E., WURGES, K., CZERMAK, P. Fumed silica activated subtilisin Carlsberg in hexane in a packed-bed reactor. *AIChE J.* 53, 237-242, 2007.
- PLEISS, J., FISCHER, M., SCHMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids* 93, 67-80, 1998.
- POLLARD, D.J., WOODLEY, J.M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.* 25, 66-73, 2006.
- PROTEIN DATA BANK – PDB. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1TRH>>. Acesso em: 25 fev. 2012.
- PROTEIN DATA BANK – PDB. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=3TGL>>. Acesso em: 25 fev. 2012.
- REETZ, M.T. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Op. Chem. Biol.* 6, 145-150, 2002.
- REIKO, M., TOORU, Y. Manufacture of optically active mandelic acid with organisms. Jpn. Kokai. Koho JP 9607, 179, 1-18, 1994.
- RODRIGUES, R.C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64, 1-22, 2010.
- ROMERO, J. R. Fundamentos de estereoquímica dos compostos orgânicos. Ribeirão Preto, Ed. Holos, p.15 - 24, 1998.
- ROUCHI, M.A. Chiral roundup. *Chem. Eng. News* 80, 43-50, 2002.
- RU, M.T., WU, K.C., LINDSAY, J.P., DORDICK, J.S., REIMER, J.A., CLARK, D.S. Towards more active biocatalysts in organic media: increasing the activity of salt-activated enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 75, 187-196, 2001.
- RÚA, M.L., DÍAZ-MAURIÑO, T., FERNÁNDEZ, V.M., OTERO, C., BALLESTEROS, A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1156, 181-189, 1993.
- SANJAY, G., SUGUNAN, S. Acid activated montmorillonite: an efficient immobilization support for improving reusability, storage stability and operational stability of enzymes. *J. Porous Mater.* 15, 359-367, 2008.
- SANTANIELLO, E., FERRABOSCHI, P., GRISENTI, P., MANZOCCHI, A. The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. *Chem. Rev.* 92, 1071-1140, 1992.
- SARDA, L., DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 30, 513-521, 1958.

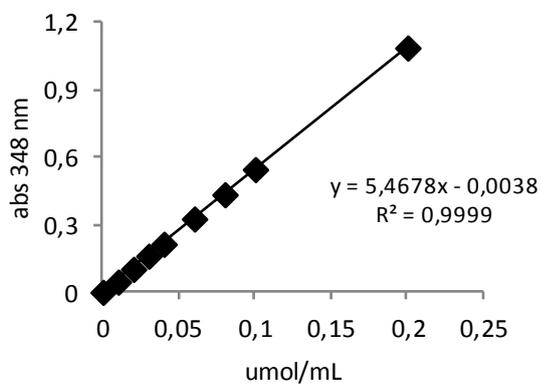
- SCHOEMAKER, H.E., MINK, D., WUBBOLTS, M.G. Dispelling the Myths – Biocatalysis in Industrial Synthesis. *Science* 299, 1694-1697, 2007.
- SCHRAMM, H., CHRISTOFFERS, J. Synthesis, resolution and absolute configuration of 4-amino-3-phenylpiperidine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 2724-2727, 2009.
- SERDAKOWSKI, A.L., DORDICK, J.S. Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends Biotechnol.* 26, 48-54, 2008.
- SEREOFLOU, E., LITINA, K., GOURNIS, D., KALOGERIS, E., TZIALLA, A.A., PAVLIDIS, I.V., STAMATIS, H., MACCALLINI, E., LUBOMSKA, M., RUDOLF, P. Smectite Clays as Solid Supports for Immobilization of beta-Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biochemical Properties. *Chem. Mater.* 20, 4106-4115, 2008.
- SEYHAN, T.S., ALPTEKIN, O. Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochem.* 39, 2149-2155, 2004.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 12, 627-662, 2001.
- SHAW, J.F., CHENG, C.H., WANG, Y.J. Characterization of three distinct forms of lipolytic enzyme in a commercial *Candida lipase* preparation. *Biotechnol Lett* 11, 779-784, 1989.
- SHELDON, R.A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv Synth Catal* 349(8-9), 1289-1307, 2007.
- SILVA, A.E. (2010). Estudo do processo enzimático de produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras residuais de fritura. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 62p.
- SILVA, T.M. (2009). Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, 172p.
- ST. CLAIR, N.L., NAVIA M.A. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7314-7316, 1992.
- STRAATHOF, A.J.J., PANKE, S., SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (6), 548-556, 2002.
- STRAUSS, U.T., FABER, K. Deracemization of (±)-mandelic acid using a lipase-mandelate racemase two-enzyme system. *Tetrahedron Asymmetry* 10, 4079-4081, 1999.

- SUGIURA, M., ISOBE, M. Comparative studies on the adsorption of lipase and various proteins at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta.* 397, 412-417, 1975.
- SUGIURA, M., ISOBE, M. Studies on the mechanism of lipase reaction. III. Adsorption of *Chromobacterium* lipase on hydrophobic glass beads. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 72-78, 1976.
- THEIL, F. Lipase-supported synthesis of biologically active compounds. *Chem. Rev.* 95, 2203-2227, 1995.
- TICOM, T.T.S. (2003) Otimização de parâmetros para obtenção de ácido mandélico a partir de mandelato de etila utilizando lipases. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 101p.
- TOMIZUKA, N., OTA, Y., YAMADA, K. Studies on lipase from *Candida cylindracea*: Part I. Purification and properties. *Agric Biol Chem* 30(6), 576-584, 1966.
- TORRES, R., ORTIZ, C., PESSELA, B.C.C., PALOMO, J.M., MATEO, C., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 167-171, 2006.
- TRIANAFYLLOU, A.O., WEHTJE, E., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B. How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media? *Biotechnol. Bioeng.* 54, 67-76, 1997.
- VAN AKEN, B.P., HENRY, L., SPIROS, N., AGATHOS, N. Co-immobilization of manganese peroxidase from *Phlebia radiata* on porous silica beads. *Biotechnol. Lett.* 8, 641-646, 2000.
- VEERARAGAVAN, K., GIBBS, B. Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol Lett* 5, 345-348, 1989.
- VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J.M., GRAILLE, J., HOSS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 9, 113-148, 2000.
- VOLPATO, G. (2009) Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 158p.
- WANG, P-Y, TSAI, S-W. Hydrolytic resolution of (R,S)-ethyl mandelate in biphasic media via *Klebsiella oxytoca* hydrolase. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 266-271, 2005.

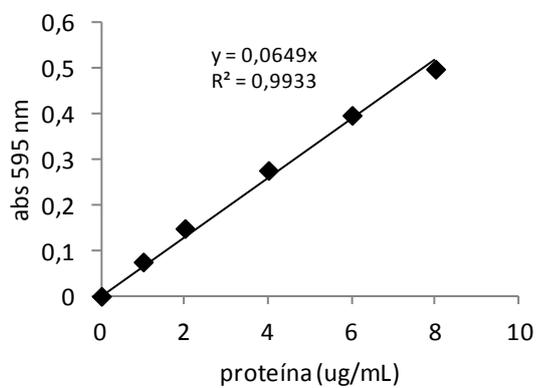
- WANG, W., DENG, L., PENG, Z.H., XIAO, X. Study of epoxydized magnetic hydroxyl particles as a carrier for immobilizing penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 255-261, 2007.
- WEBER, H.K., ZUEGG, J., FABER, K., PLEISS, J. Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 3, 131-138, 1997.
- WEHTJE, E., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B. Formation of C–C bonds by mandelonitrile lyase in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 36, 39-46, 1990.
- WHITESSELL, J.K., REYNOLDS, D. Resolution of chiral alcohols with mandelic acid. *J. Org. Chem.*, 48, 3548-3551, 1983.
- WILSON, L., PALOMO, J.M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., ILLANES, A., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 975-980, 2006.
- WU, S.H., GUO, Z.V., SIH, C.J. Enhancing the enantioselectivity of *Candida lipase* catalyzed ester hydrolysis via noncovalent enzyme modification. *J Am Chem Soc* 112, 1990-1995, 1990.
- WURGES, K., PFROMM, P.H., REZAC, M.E., CZERMAK, P. Activation of subtilisin Carlsberg in hexane by lyophilization in the presence of fumed silica. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 34, 18-24, 2005.
- XI, W.-W., XU, J.-H. Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. *Proc. Biochem.* 40, 2161-2166, 2005.
- YADAV, G.D., SIVAKUMAR, P. Enzyme-catalyzed optical resolution of mandelic acid via (R,S)-methyl mandelate in non-aqueous media. *Biochem. Eng. J.* 19, 101-107, 2004.
- YADAV, J.S., SUBBA REDDY, B.V., PADMAVANI, B., VENUGOPAL, CH., BHASKAR RAO, A. Enzymatic kinetic resolution of racemic 4-tetrahydropyrans by *Candida rugosa* lipase. *Tetrahedron Lett.* 48, 4631-4633, 2007.
- YAMAZAKI, D., YOSHIMITSU, H., MAEDA, H. Enzymic synthesis of optically pure (R)-mandelic acid and other 2-hydroxycarboxylic acids: screening for the enzyme, and its purification, characterization and use. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2621-2631, 1986.
- YAN, A.X., LI, X.W., YE, Y.H. Recent progress on immobilization of enzymes on molecular sieves for reactions in organic solvents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 101, 113-129, 2002.

- YILMAZ, E., SEZGIN, M., YILMAZ, M. Immobilized copper-ion affinity adsorbent based on a cross-linked β -cyclodextrin polymer for adsorption of *Candida rugosa* lipase. *Biocatal. Biotransform.* 27, 360-366, 2009.
- YILMAZ, E., CAN, K., SEZGIN, M., YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. *Bioresource Technology* 102, 499-506, 2011.
- YONG, Y., BAI, Y.X., LI, Y.F., LIN, L., CUI, Y.J., XIA, C.G. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. *Process Biochemistry* 43, 1179-1185, 2008.
- ZANIN, G.M., MORAES, F.F. Em *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*; Saiad, S.; Pietro, R.C.L.R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, Cap. 4, p. 35-85.
- ZHOU, Q.Z.K., CHEN, X.D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *J. Food Eng.* 48, 69-74, 2001.
- ZHOU, J., LIU, Q., FU, G-J; ZHANG, Z. Separation of mandelic acid and its derivatives with new immobilized cellulose chiral stationary phase. *Biomedicine & Biotechnology* 2013. *in press*

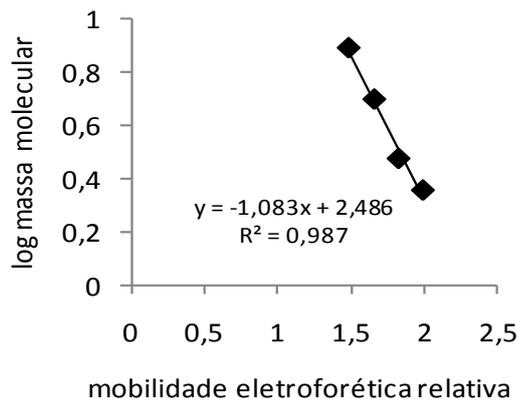
9. ANEXOS



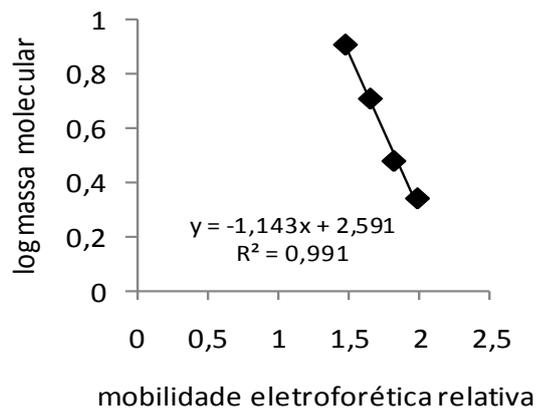
Anexo 1: Curva padrão de *p*-nitrofenol.



Anexo 2: Curva padrão de albumina de soro bovino.



Anexo 3: Mobilidade eletroforética relativa dos padrões de massa molecular na eletroforese da lipase de *Candida rugosa*.



Anexo 4: Mobilidade eletroforética relativa dos padrões de massa molecular na eletroforese da lipase de *Rhizomucor miehei*.