



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES DE *Burkholderia cepacia* EM SUPORTE DE
QUITOSANA FUNCIONALIZADA COM EDTA E APLICAÇÃO NA REAÇÃO DE
ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Bruna Alves Teixeira Lima *

Orientadora: Dr^a. Juliana Alves Vale

*Bolsista CAPES

João Pessoa – PB – Brasil
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS
EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES DE *Burkholderia cepacia* EM
SUPORTE DE QUITOSANA FUNCIONALIZADA COM EDTA E
APLICAÇÃO NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS

**Bruna Alves Teixeira
Lima ***

Dissertação de Mestrado
apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Química pela
Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Dr^a. Juliana Alves Vale

***Bolsista CAPES**

**João Pessoa – PB – Brasil
2022**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732i Lima, Bruna Alves Teixeira.

Imobilização das lipases de *Burkholderia cepacia* em suporte de quitosana funcionalizada com edta e aplicação na reação de esterificação de ácidos graxos / Bruna Alves Teixeira Lima. - João Pessoa, 2022.
66 f. : il.

Orientação: Juliana Alves Vale.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Química. 2. lipase de *Burkholderia cepacia*. 3. Biocatalisadores. 4. Síntese heterogênea. 5. Glutaraldeído. I. Vale, Juliana Alves. II. Título.

UFPB/BC

CDU 54 (043)

Dedico este trabalho aos meus pais, Edite e Jozivaldo, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus objetivos. Sem vocês, eu não seria nada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Edite e Jozivaldo. Pelo apoio de sempre, mesmo nos momentos que estive ausente. Meus primeiros professores, a quem devo toda minha garra e perseverança. Nenhum agradecimento será suficiente para retribuir tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha orientadora Dr^a Juliana Alves Vale pela oportunidade e por abrir as portas do LASOB (Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise).

Ao professor Dr^o Claudio Gabriel pelos ensinamentos (que foram muitos), pela imensa paciência e carinho nesses anos.

Aos professores participantes tanto da pré-banca (Dr^o Rodrigo Cristiano), como da banca de defesa (Dr^o Claudio Gabriel e Dr^o Savio Moita Pinheiro), por contribuírem com seus conhecimento e experiência.

Aos meus professores da UFPB - Campus II, onde pude fazer a graduação, por me inspirarem a buscar o meu melhor ontem, hoje e sempre.

As meninas do grupo de pesquisa do LASOB. Renata, Paloma e Poliana, pelos momentos de descontração e aprendizado. E em especial a Renata, sem você esta dissertação teria sido muito mais difícil de ser realizada.

A todos os amigos que fiz durante o mestrado e que foram primordiais nessa etapa. Crescemos, aprendemos e nos divertimos.

Aos meus amigos da vida que entenderam minha ausência e me motivaram sempre.

Agradeço também aos laboratórios onde desenvolvi minha pesquisa, Laboratório de Compostos de Coordenação e Química de Superfície (LCCQS-UFPB) e Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA-UFPB), não deixando de agradecer grandemente as pessoas que conheci nesses locais, que sempre tinham algo a ensinar.

À CAPES e CNPq pelo fomento da pesquisa.

Obrigada!

RESUMO

Título: IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES DE *Burkholderia cepacia* EM SUPORTE DE QUITOSANA FUNCIONALIZADA COM EDTA E APLICAÇÃO NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A biocatálise utiliza de enzimas em forma purificada ou células íntegras para promover reações orgânicas. No entanto, o custo de usar a enzima livre ainda é alto e a célula íntegra apresenta limitações quanto ao meio reacional, como variações de pH, temperaturas altas, entre outros. A imobilização de enzimas é uma alternativa, que tem se mostrado eficaz. O intuito ao imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que permaneçam intactas durante o processo, em comparação à enzima em sua forma livre. Podendo, inclusive, alcançar uma atividade catalítica superior a das enzimas livres. A imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* foi realizada em suportes de quitosana funcionalizada com EDTA (Qui-EDTA) e quitosana-EDTA ativada com glutaraldeído (Qui-EDTA-Glu), com intuito de que a enzima se una ao suporte, a partir de ligações covalentes entre os grupos amina da enzima e os grupos aldeído do glutaraldeído ou aos grupos ácidos do EDTA. As atividades enzimáticas dos derivados em reação da hidrólise do *p*-nitropalmitato foram determinadas a partir da concentração do *p*-nitrofenol formado. Dessa maneira, foram obtidas atividades de 336U/g para o derivado de quitosana funcionalizado com EDTA e 212U/g para o derivado de quitosana ativado com glutaraldeído. A análise de estabilidade operacional mostrou que há decaimento de 34% na reciclagem do derivado de quitosana-EDTA ativado com glutaraldeído, no entanto o derivado ativado apenas com EDTA se manteve estável entre os ciclos. O derivado de quitosana bifuncionalizado demonstrou melhor estabilidade de armazenamento em relação ao suporte funcionalizado apenas com EDTA. Os derivados foram testados também frente a reação de esterificação, onde o suporte de Qui-EDTA obteve melhores conversões, de até 80% em seu primeiro ciclo. Com isso, é notável a eficiência do biocatalisador obtido dos suportes funcionalizados de quitosana.

Palavras-chave: Biocatalisadores; Síntese heterogênea; Glutaraldeído; Enzimas.

ABSTRACT

Title: IMMOBILIZATION OF LIPASES OF THE *Burkholderia cepacia* IN SUPPORT OF CHITOSAN FUNCTIONALIZED WITH EDTA AND APPLICATION IN THE ESTERIFICATION REACTION OF FATTY ACIDS

Biocatalysis uses enzymes in purified form or whole cells to synthesize reactions. However, the cost of using the free enzyme is still high and the integral cell has limitations regarding the reaction medium, such as pH variations, and high temperatures, among others. Enzyme immobilization is an alternative, which has been shown to be effective. The purpose of immobilizing an enzyme is to obtain a biocatalyst with activity and stability that remains intact during the process, compared to the enzyme in its free form. It can even achieve a catalytic activity superior to that of free enzymes. The immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* was carried out in supports of chitosan functionalized with EDTA (Qui-EDTA) and chitosan-EDTA activated with glutaraldehyde (Qui-EDTA-Glu), in order to bind the enzyme to the support, from covalent bonds between the amino groups of the enzyme and the aldehyde groups of glutaraldehyde or to the acid groups of EDTA. The enzymatic activities of the derivatives in the p-nitropalmitate hydrolysis reaction were determined from the p-nitrophenol concentration formed. In this way, activities of 336U/g were obtained for the chitosan derivative functionalized with EDTA and 212U/g for the chitosan derivative activated with glutaraldehyde. The operational stability analysis showed that there is a 34% decay in the recycling of the chitosan-EDTA derivative activated with glutaraldehyde, however the derivative activated only with EDTA remained stable between cycles. The bifunctionalized chitosan derivative showed better storage stability than the functionalized support with only EDTA. The derivatives were also tested against the esterification reaction, where the support Qui-EDTA was better conversions, of 80% in the first use. Thus, the efficiency of the biocatalyst obtained from the chitosan functionalized supports is remarkable.

Keywords: Biocatalysts; Heterogeneous synthesis; Glutaraldehyde; Enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do sítio catalítico na lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	18
Figura 2: Substratos e reações possíveis no sítio ativo da lipase.....	19
Figura 3. Reação de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenilpalmitato catalisada por lipase.....	35
Figura 4. Valores de atividade enzimática (U / g de suporte) obtidos com suportes e derivados.....	36
Figura 5. Atividade enzimática dos derivados durante reciclo.....	41
Figura 6. Valores da atividade enzimática pré e pós armazenamento.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de quantidade de proteína (mg de enzima/ g de suporte) obtido na imobilização dos suportes.....	38
Tabela 2: Parâmetros de imobilização da lipase em quitosana ativada com EDTA e quitosana ativada com EDTA e GLU atividade recuperada (Atr) e rendimento de imobilização.....	39
Tabela 3. Conversão do ácido oléico em ésteres usando o n-pentanol, catalisadas por lipases imobilizadas.....	43
Tabela 4. Conversão do ácido oléico em ésteres usando o isobutanol, catalisadas por lipases imobilizadas.....	43
Tabela 5. Conversão do ácido palmítico em ésteres usando o n-pentanol, catalisadas por lipases imobilizadas.....	44
Tabela 6. Conversão do ácido palmítico em ésteres usando o isobutanol, catalisadas por lipases imobilizadas	

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo de transesterificação feito por lipases.....	21
Esquema 2. Representação das estruturas da quitina e da quitosana.....	23
Esquema 3. Ilustração da resolução do 1-feniletanol com acetato de vinila utilizando a BCL imobilizada em sílica modificada.....	24
Esquema 4. Tipos de imobilização de enzimas aos suportes.....	26
Esquema 5. Representação esquemática das reações de esterificação via catálise ácida e por substituição nucleofílica.....	28
Esquema 6. Etapas de esterificação da mistura de ésteres de ácido láurico.....	29
Esquema 7. Suportes utilizados na multifuncionalização da quitosana.....	34
Esquema 8. Resumo esquemático da reação de imobilização da BC lipase no suporte de Qui-EDTA. A atividade da enzima (4.000 U/g do suporte) disponível no meio de imobilização foi baseada na atividade da BC lipase (30.000 U/g de proteína) dada pelo fabricante.....	51
Esquema 9. Resumo esquemático da reação de imobilização da BC lipase no suporte de Quit-EDTA com glutaraldeído.....	52

Sumário

INTRODUÇÃO	14
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Biocatálise	17
2.2 Enzimas	18
2.4 Imobilização enzimática	23
2.4.1 Métodos de imobilização enzimática.....	27
2.5 Reação de esterificação.....	29
OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Estudo da imobilização de lipase em quitosana funcionalizada	35
4.1.1. Determinação da atividade enzimática e quantidade de proteína.....	36
4.2 Estabilidade operacional de derivados na reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (p-NPP).....	41
4.3 Estabilidade de armazenamento	43
4.4 Desempenho da lipase imobilizada em quitosana na síntese de ésteres	43
PARTE EXPERIMENTAL	50
5.1 Imobilização da lipase	51
5.2 Caracterização dos suportes	53
5.2.1. Determinação da quantidade de proteína imobilizada	53
5.2.1.1 Cálculo da determinação da concentração de proteína	53
5.2.2 Determinação da atividade Enzimática.....	54
5.2.2.1 Cálculo do rendimento da imobilização.....	54
5.2.2.2 Cálculo da atividade recuperada.....	54
5.2.3 Estudo da estabilidade operacional.....	55
5.2.4 Estabilidade de armazenamento	55
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	58
Considerações finais.....	58
Perspectivas.....	59
REFERÊNCIAS	60

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

O uso de enzimas pela sociedade não é algo novo e vem se atualizando no decorrer dos anos. Em tempos históricos, onde não se conhecia o conceito de enzimas, o povo do antigo Egito produzia cerveja e vinho por fermentação enzimática. Milhares de anos depois, os estudos enzimáticos progrediram significativamente¹. Atualmente, o mercado industrial de enzimas têm apresentado um crescimento constante, com projeção de atingir US\$ 10,5 bilhões em 2024, isso representa aumento de 7% ao ano².

As enzimas são biocatalisadores que aceleram muitas reações bioquímicas e químicas. São catalisadores naturais encontrados em plantas, animais e microrganismos, onde catalisam processos vitais para os organismos vivos. Estas estão envolvidas, inclusive, em uma ampla variedade de processos alimentares tradicionais, como fabricação de queijos, fabricação de cerveja e indústria do vinho. Os recentes avanços na biotecnologia, particularmente na engenharia de proteínas, forneceram a base para o desenvolvimento eficiente de enzimas com propriedades aprimoradas. Isso levou ao desenvolvimento de enzimas novas e feitas sob medida para aplicações completamente inovadoras, onde as enzimas não existiam anteriormente. O crescente conhecimento e aprimoramento de técnicas sobre extração e purificação de proteínas levam à produção de muitas enzimas com pureza de grau analítico para pesquisa e aplicações biotecnológicas.^{2,3,4}

Um biocatalisador promissor é a lipase (EC 3.1.1.3) que, em seu ambiente natural, catalisa a hidrólise de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos⁵. No entanto, em condições experimentais adequadas, essas enzimas também são biocatalisadores eficientes para a esterificação de ácidos graxos, alcoólise e reações de transesterificação⁶. A atividade enzimática das lipases é consideravelmente aumentada em meio lipídico, devido a mudança conformacional da enzima. Esta é uma característica conhecida de outras esterases, que hidrolisam principalmente ésteres solúveis em água⁷. A lipase de *Burkholderia cepacia* destaca-se pela versatilidade e tem sido amplamente utilizada em síntese orgânica, preparação de biodiesel, biodegradação e muitas outras reações em fases aquosas e não aquosas⁸.

Além disso, os biocatalisadores apresentam várias vantagens, em relação aos

catalisadores químicos industriais, como: alta seletividade, alta rotatividade, eficiência catalítica, entre outras ^{3,9}. Todavia, muitos processos catalíticos são dificultados pela presença de solventes orgânicos, alta temperatura, falta de condições adequadas de armazenamento e agentes estabilizantes. Dessa maneira, as aplicações industriais e farmacêuticas de enzimas dependem da introdução de técnicas de imobilização eficientes e estáveis. A imobilização enzimática proporciona o aumento da estabilidade, a reutilização das enzimas, reduz o custo dos processos industriais e é amigável ao meio ambiente. As enzimas imobilizadas incluem a capacidade de catalisar as reações em amplas condições reacionais³.

Um dos métodos de imobilização é a covalente multipontual, que promove a interação de vários resíduos de aminoácidos de uma mesma enzima com grupos ativos do suporte. Dessa forma, a estabilização enzimática é obtida após o aumento da rigidez de uma pequena parte de sua superfície, o que tornará a estrutura tridimensional geral mais rígida ⁷.

Vários suportes sólidos como xerogéis, areia e argila são amplamente utilizados para imobilização de forma ecologicamente correta³. Um imobilizador comum utilizado é a quitosana, esta é um polissacarídeo natural derivado da quitina e é um bom suporte devido à sua resistência, biodegradabilidade, hidrofobicidade e biocompatibilidade. Além disso, a quitosana é conhecida pelo seu baixo custo, sendo esta obtida a partir da casca de crustáceos e de resíduos da indústria do pescado. Este suporte pode ser modificado por ligações covalentes de seus grupos hidroxila e amino. As propriedades mecânicas desse polímero podem ser modificadas e melhoradas, usando reagentes bifuncionais como o glutaraldeído, glicidol e epícloridrina, por exemplo. Outra característica da quitosana é de ser solúvel em soluções ácidas e insolúvel em soluções aquosas⁷.

Diante do exposto, é possível inferir a ampla variedade de aplicação das enzimas e a necessidade de melhoramento dos processos biocatalíticos. Com isso, o presente trabalho propõe imobilizar a lipase de *Bhurkolderia cepacia* em quitosana funcionalizada com EDTA, bem como fazer a caracterização desse suporte e aplicá-lo em reações de esterificação.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO

TEÓRICA

CAPITULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biocatálise

A sociedade está sendo desafiada acerca da degradação do meio ambiente e o aumento do aquecimento global. Dessa maneira, faz-se necessário recorrer à novas demandas em relação aos dogmas tradicionais da economia de mercado. A atenção com as questões ambientais, com o consumo de energia e a qualidade dos produtos, vem incentivando vários setores industriais a usar tecnologias mais amigáveis ao meio ambiente e que sejam, contudo, eficientes. Nesse sentido, a tecnologia enzimática surge como uma alternativa satisfatória para a substituição gradual de processos químicos por biocatalisados ¹.

A biocatálise utiliza de enzimas em forma purificada ou células íntegras para converter um substrato molecular. Dessa maneira, realizando reações orgânicas onde o substrato pode ser convertido, por essa enzima, em um produto¹¹. Louis Pasteur foi precursor do exemplo moderno de biocatálise em 1858, demonstrando a obtenção de sua solução de ácido tartárico através da fermentação com uma variedade de microrganismos, incluindo o molde comum *Penicillium glaucum*¹⁰.

Além disso, o emprego de enzimas proporciona a possibilidade em se obter um produto estereosseletivo. Essa característica é bem vinda em muitas reações de síntese orgânica, em que se almeja obter um centro assimétrico específico. Esse processo é denominado síntese assimétrica. O produto de uma síntese assimétrica resultará em uma molécula de elevada pureza óptica. Em contrapartida, o produto da síntese racêmica será um composto de uma mistura de seus possíveis estereoisômeros em partes iguais. Existem vários fármacos que já são comercializados nas farmácias em suas formas opticamente puras, ou seja, sem a mistura com o outro isômero, que por muitas vezes pode vir a ser tóxico^{10,11}.

Desse modo, o crescente interesse em processos biocatalisados promove uma constante busca por novos biocatalisadores. Embora alguns destes sejam até hoje extraídos de tecidos animais e vegetais, a maioria das enzimas é obtida a partir de microrganismos. Dessa forma, a triagem de cepas microbianas - em amostras de solo, água, ar, madeira, frutos, e principalmente em amostras oriundas de ambientes extremos

e restritos -, ainda é a forma mais comum utilizada. O emprego de enzimas isoladas em larga escala é caro, devido aos seus altos custos e a necessidade de adição de cofatores ou de um sistema de regeneração destes. Uma alternativa é utilizar um processo biocatalítico com células íntegras onde estas condições adversas são superadas pelo baixo custo da reciclagem natural de co-fatores^{1,2,3}.

Enzimas são catalisadores naturais, a catálise é um processo que aumenta a velocidade em que uma reação se aproxima do equilíbrio. Uma vez que, a velocidade de uma reação está relacionada a sua energia livre de ativação, um catalisador age diminuindo essa barreira energética. Dessa forma, ele estabiliza o estado de transição em relação à reação não catalisada¹³.

Em muitos casos, não há nada de exclusivo nos mecanismos de catálise das enzimas, em comparação com os mecanismos não enzimáticos. As propriedades destas que as tornam catalisadores tão eficientes, são: a especificidade pela ligação com o substrato, combinada com uma organização otimizada dos grupos catalíticos. A organização dos grupos catalíticos e grupos de ligação das enzimas, obviamente, é produto do enorme tempo da evolução. A natureza tem tido ampla oportunidade para ajustar de forma refinada o desempenho da maioria das enzimas^{11,12,13}.

2.2 Enzimas

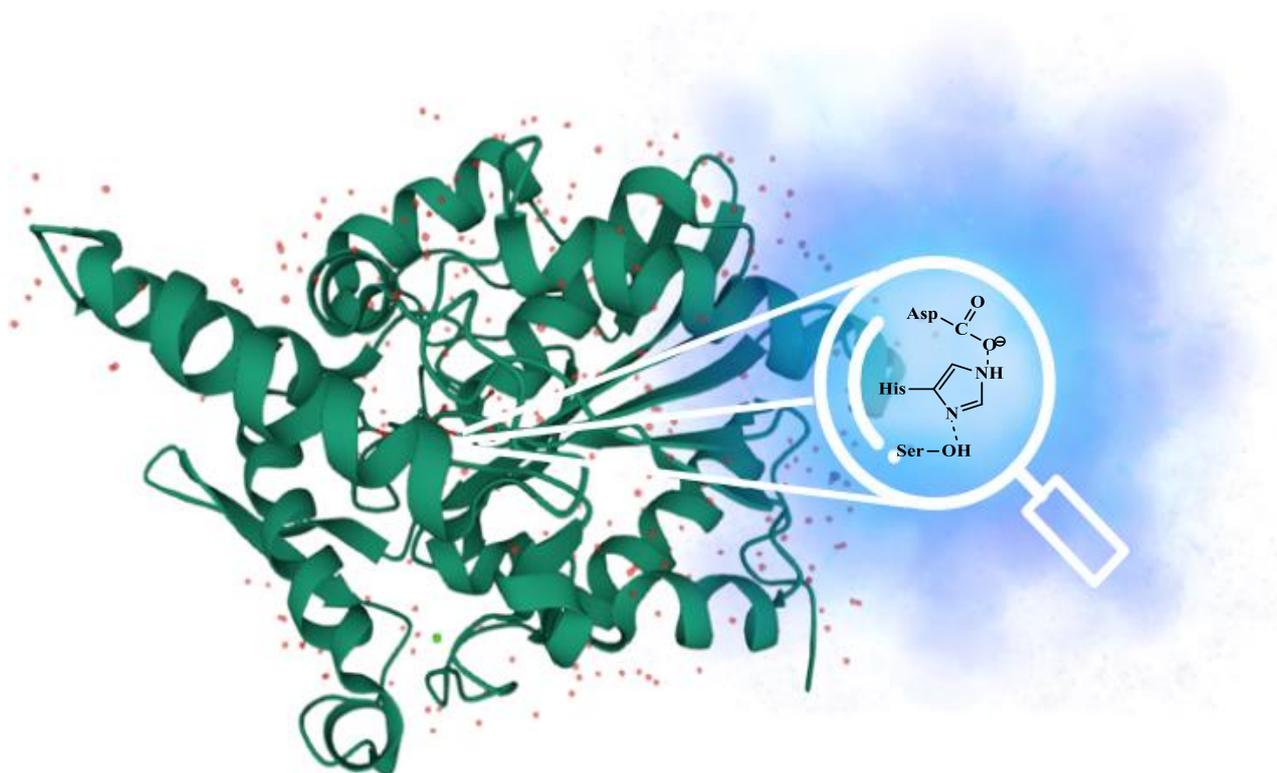
Enzimas são, em suma, proteínas que catalisam reações com alta especificidade, estereosseletividade e podem ser largamente usadas em bioprocessos industriais. O uso de enzimas em catálise tem aumentado nos últimos anos, principalmente nas áreas de síntese orgânica, modificação de alimentos e desenvolvimento de biocombustíveis^{9,13,30}

É preciso salientar, inclusive, que algumas moléculas de ácido ribonucléico [RNA] podem catalisar reações, envolvendo ligações fosfodiéster e ligações peptídicas. Os RNAs com atividade catalítica, são chamados de ribozimas. Contudo, estes são encontrados com menor frequência que as enzimas protéicas.¹³

Entre as enzimas, formadas de cadeias peptídicas, existe uma região comum, como um bolso ou uma fenda, chamada de sítio ativo. Na lipase (E.C. 3.1.3 triacilglicerol acil hidrolases), este sítio, formado pelo dobramento da própria enzima, possui resíduos dos aminoácidos Serina-Histidina-Aspartato/Glutamato, também conhecido como tríade catalítica que participam da ligação com o substrato e da catálise como mostrado na Figura 1. O substrato liga-se à enzima, formando um complexo enzima-substrato. Essa

ligação resulta em uma mudança conformacional na enzima (encaixe induzido), que permite a catálise. O complexo enzima-substrato é convertido em complexo enzima-produto, que posteriormente se dissocia em enzima e produto^{12,13}.

Figura 1: Ilustração do sítio catalítico na lipase de *Burkholderia cepacia*.



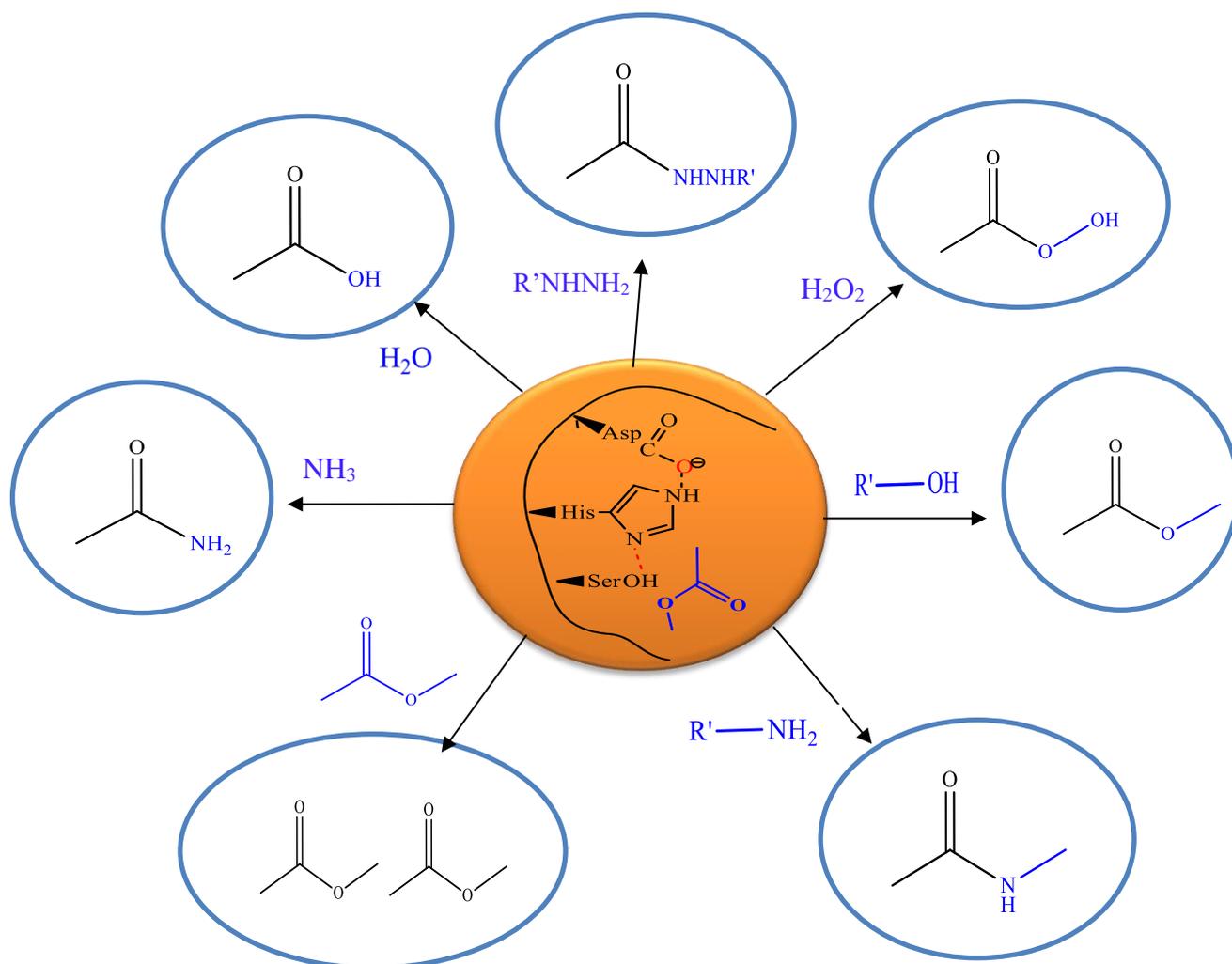
Fonte: Adaptado de Protein Data Bank⁴⁵

Uma característica particular de algumas lipases é a presença de uma face hidrofóbica como uma tampa que cobre o sítio ativo, presumivelmente para evitar a hidrólise dos ésteres não lipídicos em uma célula. Essa tampa se abre em ambiente hidrofóbico, ativando a enzima. Ao usar um suporte hidrofóbico, a lipase pode se ligar enquanto, simultaneamente, trava a tampa na posição aberta, com seu sítio ativo virado para o suporte¹⁴.

Ainda que possuam peculiaridades como a citada anteriormente, as reações catalisadas por enzimas são altamente eficientes, ocorrendo de 10³ até 10⁸ vezes mais rápido que as reações não catalisadas. Em síntese orgânica, as lipases são a classe de enzimas mais utilizada. Na natureza, essas enzimas atuam em grupos éster, mas também são capazes de catalisar reações de hidrólise ou síntese com alta seletividade, com uma

ampla variedade de substratos naturais e não naturais, permitindo sua aplicação para obtenção de diferentes classes de compostos orgânicos^{12, 13, 15}. A Figura 2 mostra o sítio ativo com o substrato acila, bem como alguns dos reagentes e produtos obtidos pelas lipases.

Figura 2: Relação de possíveis produtos obtidos pelo sítio ativo da lipase.



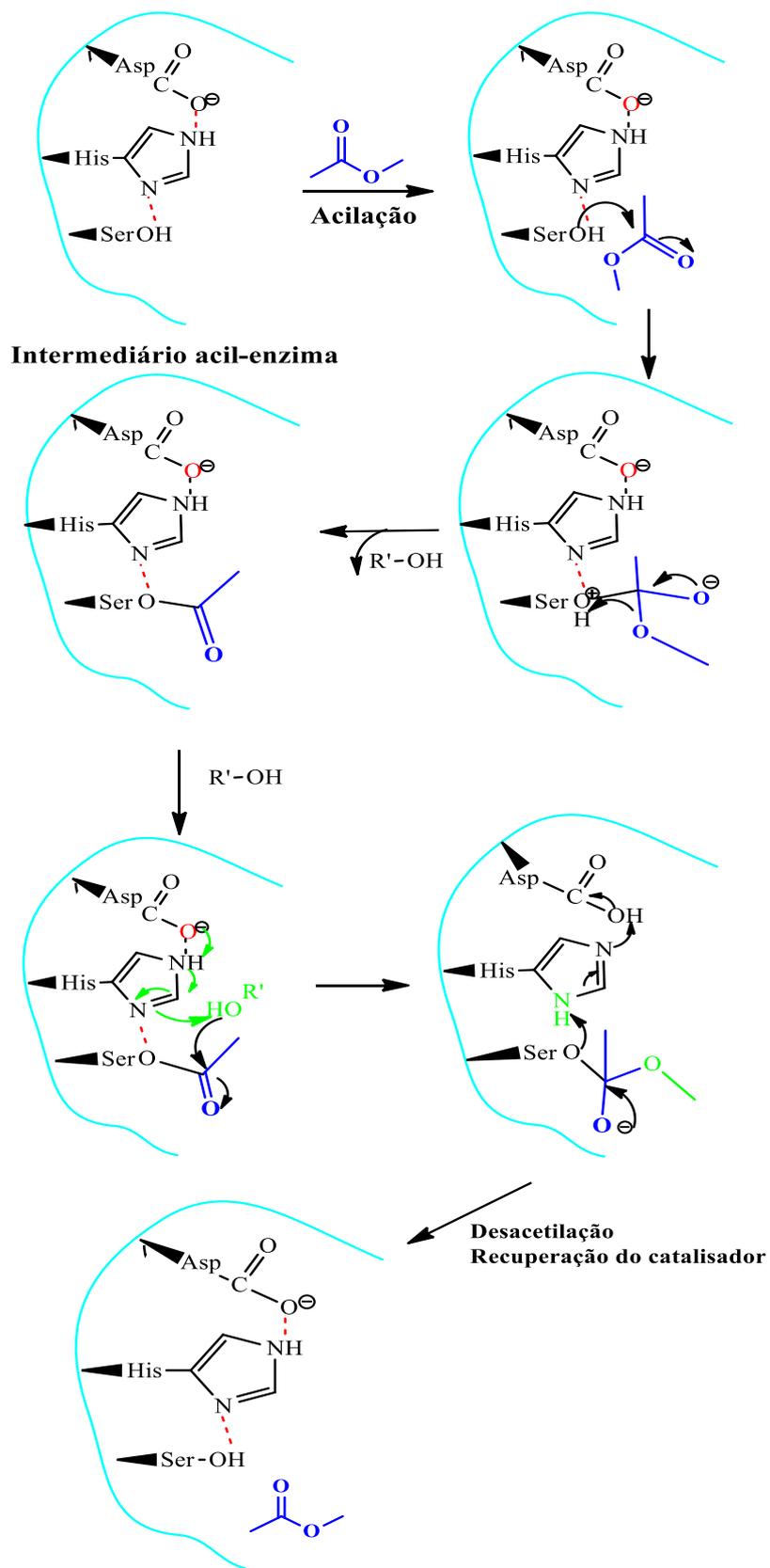
Fonte: Adaptado de ALNOCH, R. C. *et al.*¹⁷

De modo análogo, quando uma enzima liga duas moléculas em uma reação bimolecular, esta não apenas aumenta a proximidade dos reagentes como também para os movimentos translacionais e rotacionais relativos destes, com isso aumentando suas reatividades. Desse modo, estudos teóricos indicaram que boa parte desse aumento de velocidade de reação, pode ser resultado da ligação da enzima ao substrato em uma conformação que, facilita a passagem para o estado de transição. As enzimas, conectam-se aos substratos de tal modo que eles são alinhados e fixados de maneira a otimizar suas reatividades. A energia livre necessária para isso é gerada da energia livre específica da

ligação do substrato com a enzima¹².

2.3 Mecanismo das lipases

O sítio ativo das lipases é conhecido por possuir a chamada tríade catalítica constituída pelo aminoácidos Serina-Histidina-Aspartato/Glutamato. Os resíduos desses aminoácidos são responsáveis diretamente pelo mecanismo desenvolvido por essas enzimas. Nas reações de transesterificação catalisadas por lipases, o mecanismo proposto envolve várias etapas. Iniciando com o ataque nucleofílico pelo oxigênio da serina no carbono carbonílico no grupo éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico, estabilizado pelas ligações de hidrogênio com átomos de nitrogênio de resíduos de histidina. Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-enzima. Os resíduos de Histidina e Aspartato auxiliam o ataque nucleofílico ao intermediário para formar o complexo tetraédrico que após rearranjo libera o produto e recupera o catalisador enzimático. Este mecanismo está apresentado no Esquema 1 ^{48,49}.

Esquema 1. Mecanismo de transesterificação feito por lipases.

Fonte: Adaptado de PIMENTEL, A.¹⁹

Com intuito de viabilizar as reações feitas por enzimas tem se desenvolvido novos

materiais, nos últimos anos, para a criação de uma infinidade de suportes para imobilização de lipases. Desse forma, obtendo melhores propriedades físicas e mecânicas, pois os suportes auxiliam na resistência e proporcionam aumento do rendimento das enzimas. Esses novos materiais podem ser nanopartículas magnéticas, nanotubos de carbono, polímeros sintéticos ou naturais, materiais mesoporosos, eletrofiados e biomateriais. Eles trazem propriedades interessantes, incluindo maiores áreas de superfície disponíveis para imobilização, que permitem uma ação enzimática ¹⁶.

2.4 Imobilização enzimática

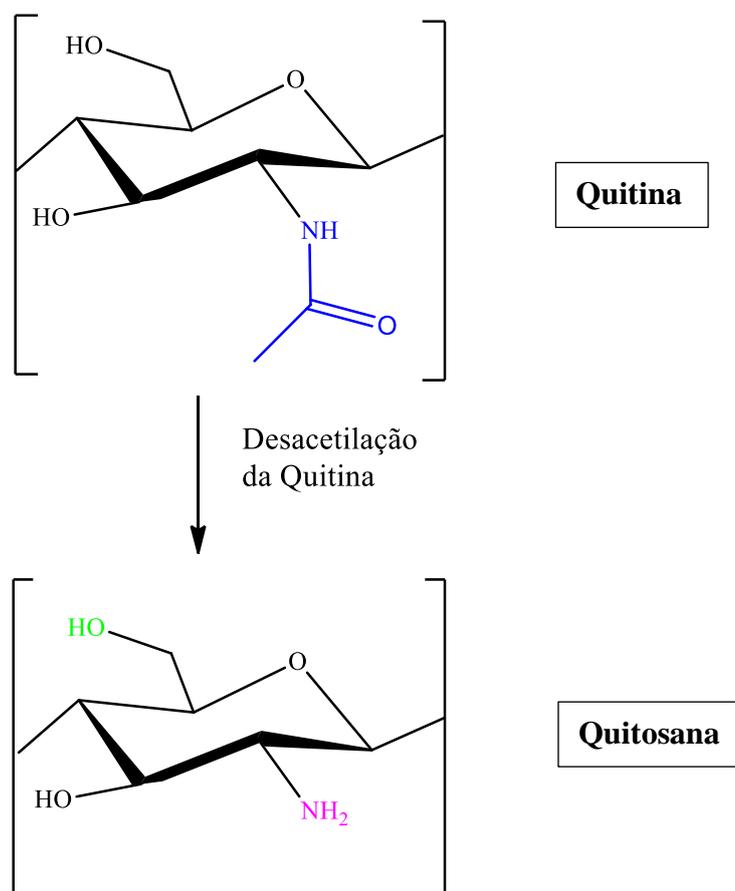
A imobilização de enzimas é uma alternativa que tem se mostrado eficaz. O intuito ao imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que permaneçam intactas durante o processo, em comparação à enzima em sua forma livre. A enzima imobilizada poderá exibir uma atividade catalítica superior. E inclusive, esperasse que não ocorram alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo ou desnaturação da proteína. O método de imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, no entanto não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização. Na literatura, inúmeros métodos têm sido estudados e empregados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações. Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas isoladas pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável, dessa forma se faz necessário estudo de maneiras que tornem esse processo mais eficiente^{9,19,20}.

Com isso, o uso de suportes para imobilização de enzimas isoladas tem sido essencial para viabilizar vários processos biocatalíticos. Exemplos envolvendo enzimas imobilizadas ou células integras imobilizadas são conhecidos, entre eles incluem o uso da glicose isomerase para a produção de xarope de milho rico em frutose, a penicilina G amidase para a produção de antibióticos semissintéticos, o uso de lipases para a produção de análogos da manteiga de cacau e a produção de amins quirais em solventes orgânicos, tudo em escala de milhares a centenas de milhares de toneladas por ano. Somente o processo da reação envolvendo a enzima glicose isomerase pode proporcionar a conversão de 107 toneladas de glicose por ano. Cabe destacar, inclusive, que a produção de glicose gera a conversão de 109 toneladas de amido de milho por ano usando amilases solúveis²³.

Um suporte largamente utilizado na imobilização de enzimas é a quitosana. Esse

biomaterial é atrativo quando utilizado como suporte devido às suas características únicas, como baixo custo, bioatividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade e insolubilidade em água. A quitosana é um polímero natural obtido a partir da desacetilação da quitina, o esquema 2 traz a representação dessas estruturas. As formas mais utilizadas da quitosana são como hidrogéis e membranas, devido às alterações físicas obtidas.²³ Este biopolímero possui uma estrutura linear muito semelhante à celulose, diferindo apenas em grupos funcionais. No entanto, a principal diferença entre eles são os grupos amino (NH_2) na estrutura da quitosana. A alta porcentagem de grupos amino reativos distribuídos na matriz polimérica da quitosana permite inúmeras modificações químicas, produzindo um material mais resistente e versátil^{24,25,26}.

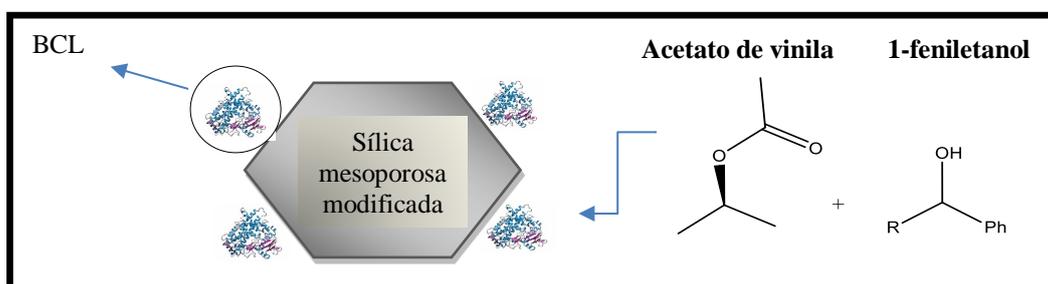
Esquema 2. Representação das estruturas da quitina e da quitosana.



Em estudo, pesquisadores desenvolveram um suporte de sílica mesoporosa modificada com fenil³³. A lipase utilizada foi a originada de *Burkholderia cepacia* (BCL), que é conhecida por ser um catalisador altamente enantiosseletivo para a resolução de

álcoois secundários quirais via reação de transesterificação, hidrólise e esterificação. Nesta pesquisa, foi avaliado o desempenho catalítico da BCL imobilizada e da BCL livre, realizando um teste de resolução do 1-feniletanol racêmico com acetato de vinila., estes estão ilustrados no esquema 3. A enzima imobilizada obteve até 50% de conversão com mais de 99 % de excesso enantiomérico em 25 minutos, entretanto a enzima livre obteve a mesma conversão em 27 horas, mostrando a eficiência da imobilização³³.

Esquema 3. Ilustração da resolução do 1-feniletanol com acetato de vinila utilizando a BCL imobilizada em sílica modificada.



Fonte: Adaptado de ZHENG, M. *Et al.*³³

No intuito de analisar a influência de grupos ativadores e o tempo de imobilização, pesquisadores utilizaram a lipase tipo B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em agarose e quitosana. Estes suportes foram funcionalizados com glicidol, glutaraldeído e epícloridrina variando o tempo de imobilização entre 5, 24 e 72 h. A partir disso foram avaliados a estabilidade térmica, a atividade hidrolítica e o pH alcalino na imobilização. A CAL B solúvel apresenta atividade máxima em pH 7,0, perdendo sua ativação abaixo de pH 6,0 e acima de pH 8,0. No intuito de investigar a estabilidade alcalina dessa enzima o estudo utilizou a incubação de amostras em pH 12 e temperatura ambiente. Ainda de acordo com os mesmos pesquisadores, analisar a estabilidade da estrutura tridimensional submetida a diferentes agentes de distorção (temperatura, pH extremo) é uma maneira indireta de confirmar a formação de ligação covalente multiponto. Após análises, o estudo concluiu que, o melhor derivado foi obtido quando a CALB foi imobilizada em quitosana ativada em duas etapas, utilizando glicidol e glutaraldeído, sendo este 58 vezes mais estável que a enzima solúvel⁷.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos, além de facilitar a recuperação e posterior reutilização do catalisador, oferece vantagens adicionais importantes. A imobilização evita a agregação enzimática e aumenta a flexibilidade. O aumento da

estabilidade da estrutura tridimensional da enzima imobilizada pode ser obtida ao promover um aumento na rigidez da estrutura da macromolécula. Isso pode ser alcançado se forem obtidas várias ligações entre a enzima e o suporte. A imobilização covalente multipontual requer a interação de vários resíduos de uma mesma enzima com grupos ativos do suporte. Utilizar os grupos aldeídos no suporte e grupos amina na enzima são uma boa escolha para fazer a ligação multiponto e, portanto, obter derivados de enzimas altamente estáveis. Os grupos amina terminais em resíduos de aminoácidos são muito reativos e abundantes na superfície da enzima, podendo formar bases de Schiff com os grupos aldeídos do suporte⁷.

A imobilização de enzimas pode ser útil em diversos ramos de pesquisa, não somente na síntese de novos compostos. Um exemplo disso foi relatado em pesquisa onde a enzima lacase foi imobilizada em quitosana modificada, com intuito de remover poluentes da água. Entre eles: bisfenol A, indol e antraceno. Para alcançar esse objetivo, a enzima foi imobilizada em nanopartículas magnéticas de quitosana modificadas com líquido iônico aminofuncionalizado, o derivado apresentou capacidade de imobilização relativamente alta, atividade aumentada (1,7 vezes em relação a da lacase livre), maior estabilidade térmica, maior estabilidade de armazenamento e adaptabilidade melhorada de pH e temperatura⁹.

A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada, por pesquisadores, em grânulos de quitosana ativando seus grupos hidroxila com carbodiimida, seguido de reticulação aos grupos amino com glutaraldeído. Tal método de imobilização rendeu uma atividade de 13,8 U/g-suporte e alta carga de proteína de 287,2 g/g-quitosana. O derivado apresentou, inclusive, estabilidade térmica melhorada e tolerância a variação de pH. A lipase bifuncionalizada manteve 67% de sua atividade após 7 dias de armazenamento e 74% de atividade residual, após dez ciclos de hidrólise³⁴.

Em pesquisa desenvolvida utilizando um novo suporte heterofuncional de quitosana com divinil sulfona-DVS. Avaliou-se a ativação da quitosana com DVS e com glutaraldeído, realizando o estudo utilizando os pHs 10,0, 12,5 e 14,0. Após a imobilização, os biocatalisadores foram mantidos em tampão alcalino e, dessa maneira, facilitando a ligação covalente multiponto. Após a imobilização o suporte seguiu incubado em etilenodiamina (EDA) visando bloquear os demais grupos reativos. Com isso, os resultados mostraram que a imobilização de CALB em quitosana ativada com DVS utilizando o pH 10,0 se destacou como um protocolo muito eficiente, uma vez que o biocatalisador foi muito mais estável, apresentando maior tempo de meia-vida ($t_{1/2} = 24$

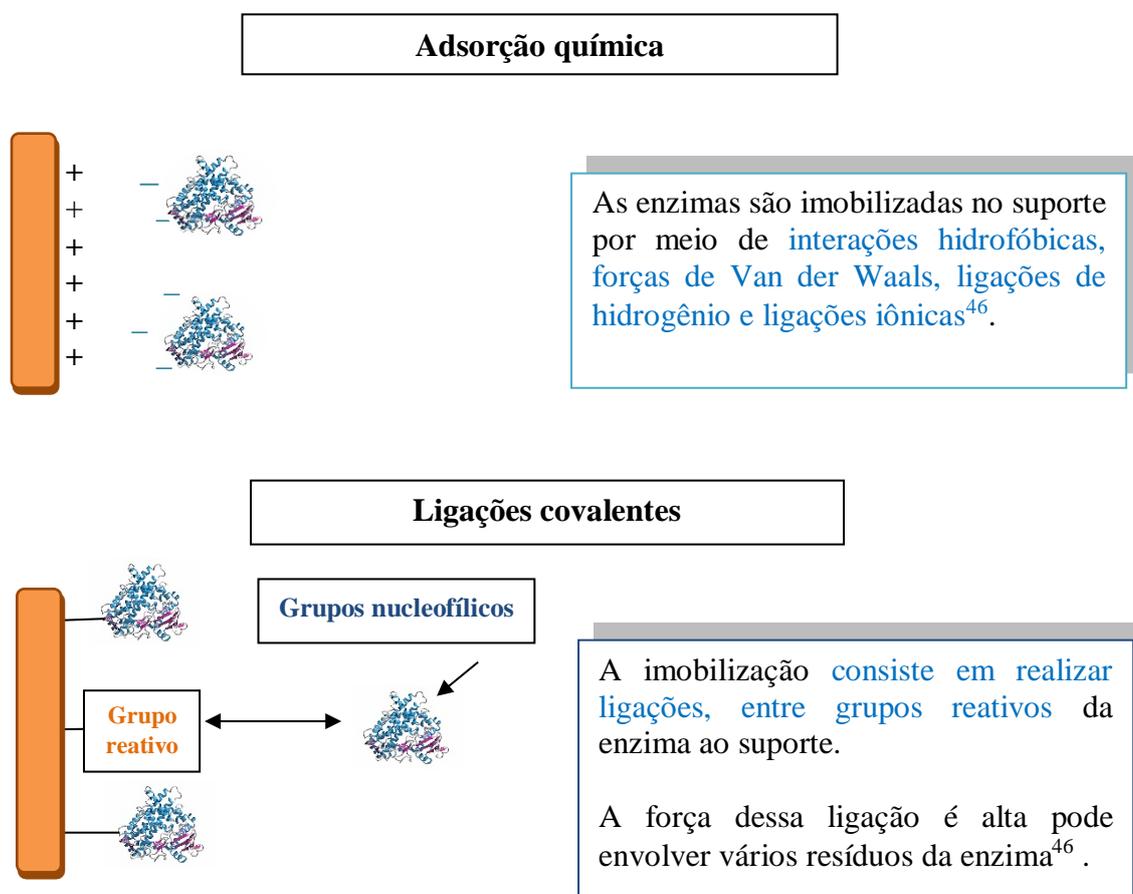
horas) do que quando a imobilização foi realizada em quitosana ativada com glutaraldeído ($t_{1/2} = 74,16$ minutos)³⁵.

2.4.1 Métodos de imobilização enzimática

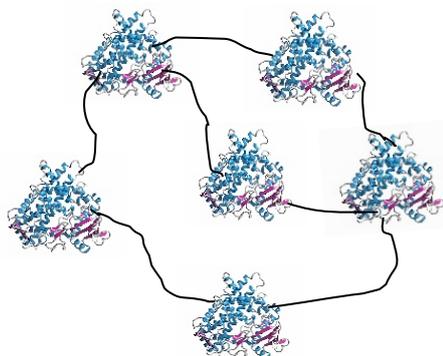
O estudo de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. Em alguns casos, inclusive, resultando em rendimentos maiores aos da enzima livre^{19,25}.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação covalente da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica.¹⁹ O Esquema 4 ilustra alguns dos principais métodos utilizados para imobilização de enzimas.

Esquema 4. Tipos de imobilização de enzimas aos suportes.



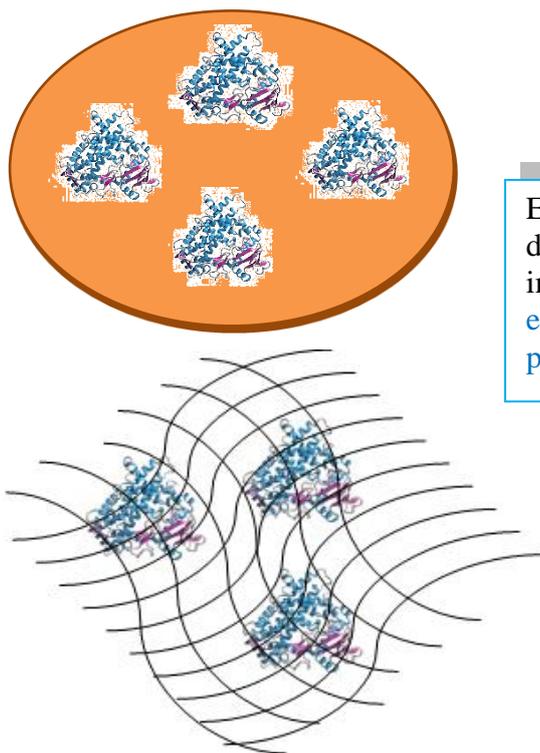
Ligações Cruzadas (crosslinking)



Nessa abordagem os derivados imobilizados são diretamente preparados a partir da reação para formação de ligações cruzadas entre um agente reticulante.

O agente de reticulação é uma molécula que tem pelo menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos na superfície da enzima⁴⁶.

Encapsulação / confinamento



Esse método envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno da enzima a ser imobilizada. Nesse processo, a enzima é encapsulada ou incorporada na estrutura polimérica⁴⁶.

Fonte: Adaptado de SOUZA, L.T de A. ⁴⁶

Nesse sentido, cada método possui suas vantagens e desvantagens. Por exemplo, a técnica de imobilização por ligação covalente proporciona vantagem, quando comparada a técnica de adsorção por não apresentar o fenômeno de dessorção. Nesta imobilização o intuito, é realizar o ataque aos aminoácidos da enzima que não fazem

parte do sítio catalítico. Isso pode ser um desafio a atingir e, usualmente, enzimas imobilizadas com essa técnica perdem um pouco de sua atividade inicial. Porque a enzima pode ser distorcida, principalmente quando ocorrem interações múltiplas com o suporte, ou até mesmo o sítio ativo pode ser bloqueado⁴⁶.

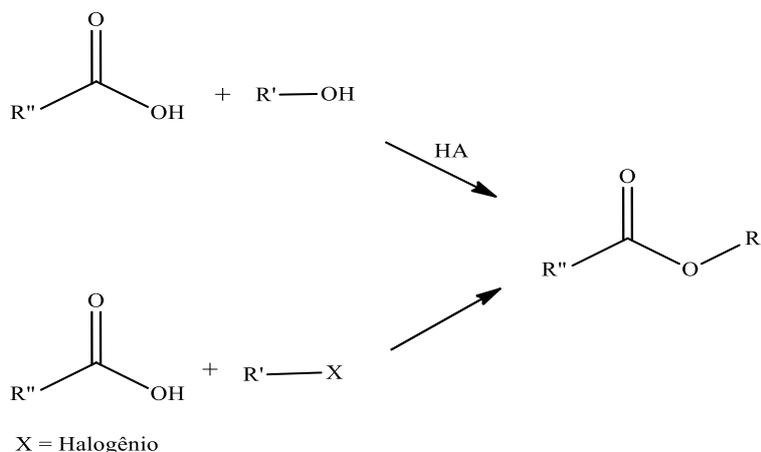
Contudo enzimas imobilizadas covalentemente são comumente muito estáveis e resistentes em condições extremas de pH e temperatura¹⁷. Muitos suportes minerais ou orgânicos, podem ser usados para imobilização por ligação covalente, mas antes de realizá-la o suporte deve ser ativado. Essa ativação corresponde à incorporação de grupos químicos capazes de reagir com as cadeias laterais da proteína. Um dos métodos mais comuns de ativação, é o que utiliza glutaraldeído. Esse composto polimeriza facilmente formando polímeros contendo aldeídos, os quais podem reagir com os grupos amino do suporte^{24,26}.

2.5 Reação de esterificação

As reações de obtenção de ésteres mais conhecidas são as catalisadas por base ou ácido (esterificação de Fischer). De modo geral, quando tratados com uma base forte seguida por um haleto de alquila, os ácidos carboxílicos são convertidos em ésteres. O ácido é desprotonado primeiro, formando um íon carboxilato que, em seguida, se comporta como um nucleófilo e ataca o carbono do haleto de alquila, em um processo de Substituição Nucleofílica bimolecular^{27,28}.

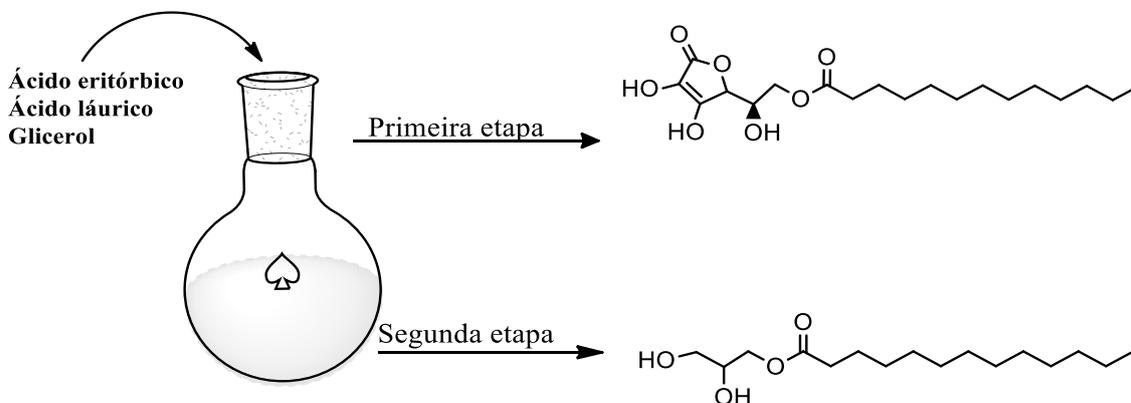
Outra reação de esterificação muito utilizada é a catalisada por ácidos ou, como é conhecida, esterificação de Fischer. Onde ácidos carboxílicos são convertidos em ésteres, quando tratados com um álcool na presença de um catalisador ácido. A esterificação de Fischer é reversível e pode ser controlada através da exploração do princípio de Le Châtelier, utilizando excesso do álcool²⁷. O esquema 5 ilustra as estruturas presentes nessas reações citadas.

Esquema 5. Representação esquemática das reações de esterificação via catálise ácida e por substituição nucleofílica.



Uma alternativa às reações onde o catalisador pode ser tóxico ou perigoso é a reação de esterificação por catálise enzimática, que tem se mostrado eficaz e segura, visto que não utiliza ácidos fortes. Em estudo recente, foi realizada a síntese de ésteres mistos de ácido láurico produzidos por meio de esterificação em duas etapas catalisada por lipase, usando sistema livre de solvente e sem purificação. No sistema de reação sem solvente, o laurato de eritorbila foi produzido na primeira reação. Em seguida, na segunda reação, o ácido láurico residual foi convertido em laurato de glicerila (Esquema 6). A esterificação sucessiva em duas etapas, sem purificação, produziu ésteres de ácido láurico mistos, compostos principalmente de laurato de eritorbila e laurato de glicerila com pequenas quantidades de substratos residuais (ácido eritórbito, ácido láurico e glicerol), reduzindo a necessidade de purificação. Além disso, os ésteres produzidos apresentaram atividades antibacteriana e antioxidante²⁸.

Esquema 6: Etapas de esterificação da mistura de ésteres de ácido láurico.



Outro fator importante a se analisar em reações orgânicas refere-se ao uso de solventes, que muitas vezes são derivados de petróleo. Dessa forma, em estudo usando etanol como nucleófilo e *Candida antarctica* lipase tipo B (CAL-B) como biocatalisador, foi analisado o papel que o solvente desempenha na produção de cinamato de etila. Para isso, solventes orgânicos voláteis e misturas eutéticas profundas foram empregados para encontrar as condições ideais de reação. Ao utilizar o hexano e heptano como o solvente, os rendimentos se mostraram ótimos, porém faz-se necessário o desenvolvimento de processos mais verdes e sem uso de solventes oriundos do petróleo. Uma alternativa estudada foram os solventes eutéticos profundos, que em combinação com água, foram alcançadas conversões significativas, proporcionando a possibilidade de esterificação de compostos altamente insolúveis²

Conhecendo a ampla possibilidade de aplicação das enzimas surgiu a necessidade de melhoramento do processo de catálise enzimática. Utilizando métodos de imobilização, que tornam as enzimas mais estáveis, resistentes e, principalmente, mais viáveis. Nesse sentido, o desenvolvimento de suportes e o estudo de novos métodos é bem vindo. Os polímeros naturais funcionalizados têm se mostrado eficientes suportes, entregando versatilidade e estabilidade aos derivados. Em alguns casos, inclusive, aumentando a atividade catalítica da enzima. Dessa maneira, o presente estudo propõe o uso dos suportes de quitosana funcionalizados com EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) e bifuncionalizados com glutaraldeído, em processos de síntese orgânica, como forma de promover maior atividade da lipase de *Burkholderia cepacia*, aplicando estes em reações de hidrólise e esterificação.

Capítulo 3

OBJETIVOS

Capítulo 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo imobilizar a lipase microbiana comercial, obtida de *Burkholderia cepacia*, em suportes de quitosana funcionalizada com EDTA e bifuncionalizada com glutaraldeído. Bem como, investigar sua atividade catalítica frente reações de esterificação e hidrólise.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Imobilizar a enzima lipase de *Burkholderia cepacia* na superfície Quitosana-EDTA e Quitosana-EDTA também ativada com glutaraldeído;
- ❖ Caracterizar os suportes quanto a atividade enzimática, rendimento de imobilização, reciclo e estabilidade frente a reação de hidrólise do éster *p*-nitropalmitato;
- ❖ Realizar a aplicação do suporte em reações de esterificação envolvendo ácidos graxos com diferentes alcoóis.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

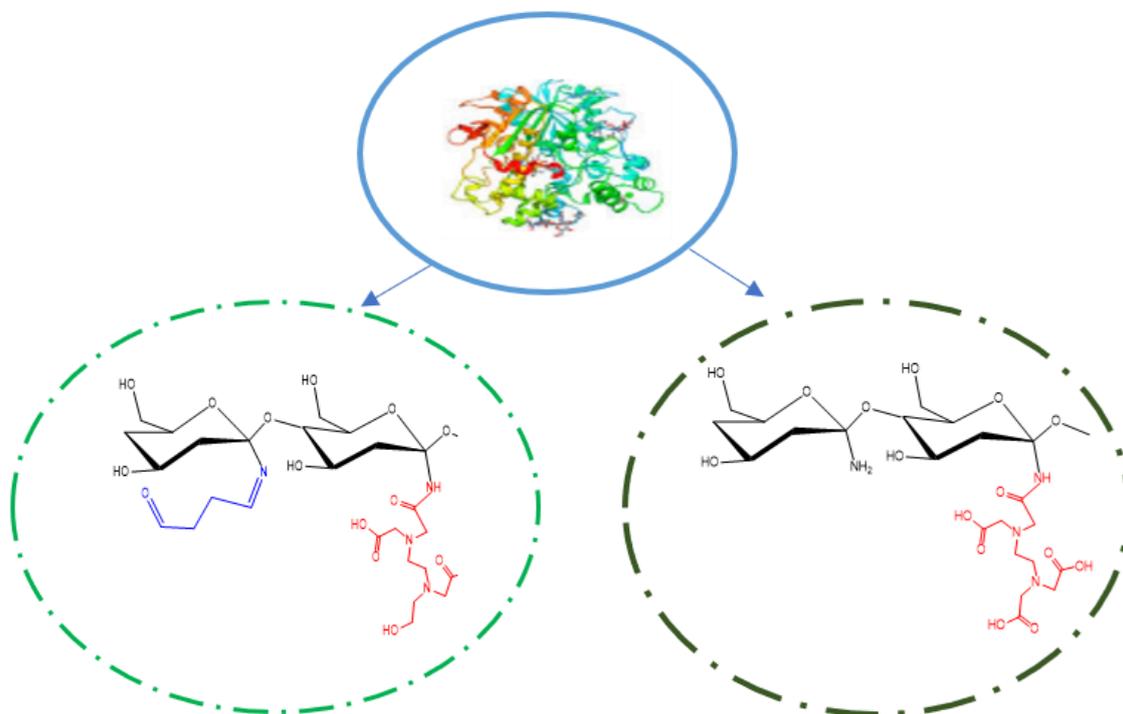
CAPITULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da imobilização de lipase em quitosana funcionalizada

A imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* foi realizada em suportes de quitosana funcionalizada com EDTA (Qui-EDTA), estes sintetizados anteriormente no grupo de pesquisa³⁶, e Qui-EDTA ativada com glutaraldeído (Qui-EDTA-Glu). A imobilização da enzima no suporte foi feita no intuito de que estes realizassem ligações covalentes, entre os grupos amino da enzima e os grupos aldeído do glutaraldeído ou aos grupos ácidos do EDTA. O suporte Qui-EDTA possui grupos amino remanescentes que também podem se ligar aos grupos ácidos dos aminoácidos da enzima. O Esquema 7 ilustra representativamente os dois suportes utilizados na presente pesquisa.

Esquema 7. Suportes utilizados na multifuncionalização da quitosana.



A enzima utilizada foi mantida em tampão fosfato de pH 7,5, o mesmo tampão também foi escolhido para o processo de imobilização dos suportes. O efeito do pH é importante, visto que enzimas apresentam melhor atividade a uma faixa de pH e isso se deve às variações do estado de ionização de seus componentes. Dessa forma, foi levado

em consideração também o pH ótimo sugerido pelo fabricante da enzima utilizada, o pH 7,0.

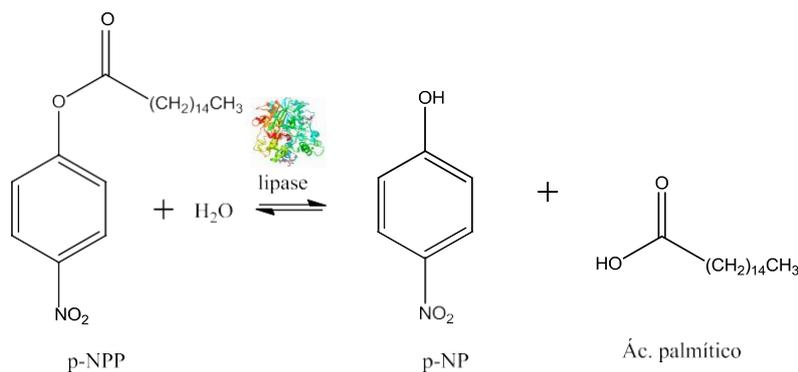
Reforçando a necessidade do uso de tampões com pHs entre 7 e 8 para a enzima em questão, um estudo realizado com a lipase de *Burkholderia cepacia*, em que o efeito do pH (avaliado entre 3 - 11) foi estudado sobre a hidrólise de azeite de oliva. Aproximadamente 80% da atividade foi mantida nos pHs 5 a 7, mas obtendo maior atividade utilizando tampão fosfato no pH 8. Pequenas variações na atividade da enzima foram encontradas em pHs mais ácidos, entretanto em meio alcalino observou-se maior sensibilidade da lipase. Inclusive, notando perda de 80% de atividade da enzima em pH 11. O mesmo estudo sugere que a lipase de *Burkholderia cepacia* é alcalina e análoga à lipase de *Pseudomonas fluorescens 2D*⁴⁴.

Na etapa de imobilização da enzima no suporte de Qui-EDTA foram utilizados 10mL da solução enzimática com concentração de 2mg de enzima/ mL de tampão fosfato. Nesta solução, foram adicionados 150 mg do suporte de Qui-EDTA, a dispersão foi mantida sob agitação magnética por 24 horas, em temperatura ambiente. A imobilização do suporte funcionalizado com o glutaraldeído foi feita em 2 horas, também sob agitação magnética. Foram adicionados 3 mL da solução enzimática citada anteriormente, em uma mistura de 10 mL de água destilada, 0,6 mL de glutaraldeído 25% e 100 mg de suporte de Qui-EDTA.

Após a imobilização, o sobrenadante foi retirado e armazenado para a análise de quantidade de proteína, bem como a água destilada usada para lavar os derivados. Os dois derivados foram lavados, posteriormente, secos a vácuo e armazenados em refrigerador a temperatura de 9°C.

4.1.1. Determinação da atividade enzimática e quantidade de proteína

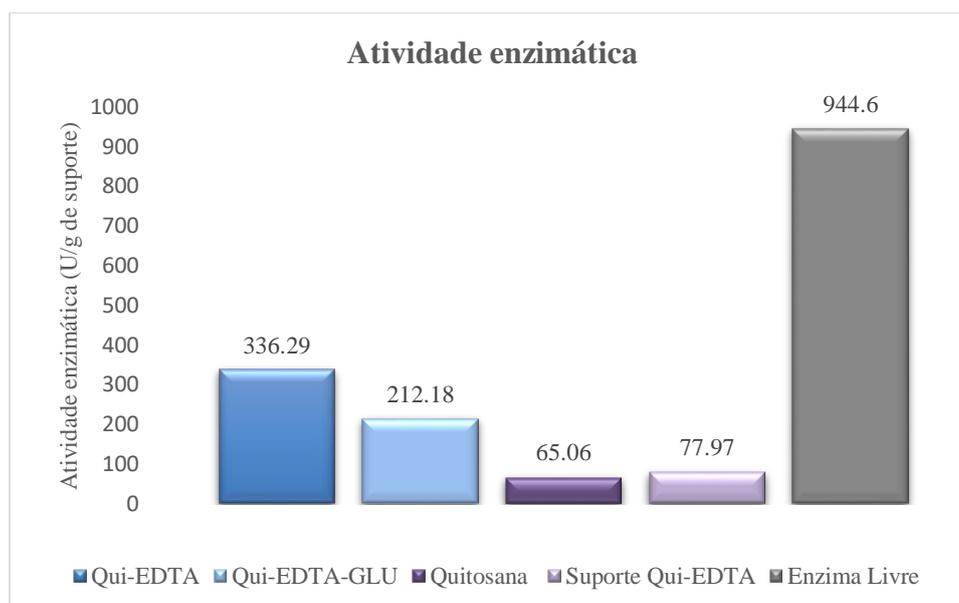
A reação de hidrólise de *p*-nitrofenol (*p*-NP), mostrada na Figura 7, é uma forma eficiente e simples de determinar a atividade catalítica de lipases. A determinação da concentração de *p*-NP, produzido na reação, é realizada por espectrofotometria no UV/VIS. Sabe-se que a lipase pode catalisar reações, onde um éster de *p*-nitrofenila é hidrolisado levando a formação do *p*-nitrofenol(*p*-NP), o qual em meio alcalino está em equilíbrio com o íon *p*-nitrofenolato e pode ser determinado espectrofotometricamente por medidas de absorvância em 410 nm⁹. A Figura 3 desmonstra a reação de hidrólise descrita.

Figura 3. Reação de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato catalisada por lipase.

Fonte: Adaptado de SILVA, A.L. P.¹⁸

Neste trabalho, a atividade enzimática (1U) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de p-NP por minuto a 25 °C. A partir da concentração de *p*-nitrofenol foi então convertida em $\mu\text{mol}/\text{min}$. Para os valores de atividade do derivado, foi usado a unidade U/g de suporte utilizado na imobilização.

As estratégias de imobilização, descritas anteriormente, foram estudadas para a imobilização de lipase em quitosana com o objetivo de se obter um derivado com alta atividade, boa estabilidade operacional, e resistência à estocagem (9 °C). A Figura 4 mostra os resultados obtidos de atividade enzimática para os derivados e os suportes sem a enzima.

Figura 4. Valores de atividade enzimática (U / g de suporte) obtidos com suportes e derivados.

As reações de hidrólise são conhecidas por sua espontaneidade. Dessa forma, foi importante analisar a capacidade catalítica dos suportes sem a enzima, e com isso, eliminar a possibilidade de mascarar os resultados referente aos derivados. Na figura 4 é possível comparar a atividade enzimática dos derivados e inferir a maior capacidade destes em relação a do suporte de quitosana funcionalizada com EDTA (Suporte Qui-EDTA), a quitosana funcionalizada com EDTA e ativada com glutaraldeído (Qui-EDTA-GLU) e a da quitosana pura. O derivado de quitosana funcionalizado com EDTA (Qui-EDTA) obteve valores até 5x maior em relação a atividade do suporte de quitosana funcionalizado com EDTA(Suporte Qui-EDTA).

A Figura 4 mostra também que a atividade enzimática da enzima livre foi mais pronunciada em relação a da imobilizada, isso é esperado pela literatura². A enzima em meio heterogêneo, pode se comportar de modo diferente daquela em sistemas heterogêneos. Com isso, é necessário ponderar que as moléculas de enzima são imobilizadas aleatoriamente, e isso pode ocasionar uma falta de homogeneidade na orientação das enzimas, o que resultaria em menores rendimentos de imobilização dos derivados. Isto é reforçado pela natureza química dos aminoácidos na superfície das enzimas, uma vez que as moléculas dos resíduos de aminoácidos próximos ao centro ativo, podem reagir com a superfície ativa do suporte⁹.

Em estudo utilizando lipase *Candida antactica* tipo B, pesquisadores obtiveram atividades enzimáticas de 330 U/g para suporte de agarose-glutaraldeído e para o suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 402 U/g, estas foram imobilizadas em pH 10, por 5 horas. O procedimento de obtenção da atividade enzimática possui condições semelhantes ao presente estudo. Em imobilização por 24 horas os derivados apresentaram atividades de 295U/g para o suporte de quitosana-glutaraldeído e 300U/g para o suporte de agarose-glutaraldeído, após 72 horas de imobilização as atividades enzimáticas foram menores. No entanto, os derivados que passaram por imobilizações mais longas foram os mais estáveis termicamente²⁷.

Um parâmetro importante a se analisar na imobilização de enzimas é a concentração de enzimas que fica retida no suporte. Para alcançar os valores que estão expressos na tabela 1, foram determinadas as concentrações das enzimas presentes nas soluções de lavagem e subtraídas da concentração inicial da enzima disponível para a imobilização, conforme a equação 1.

$$p = \frac{C_i V_i - (C_s V_s + C_l V_l)}{ms} \quad (1)$$

Nesta equação, p representa a quantidade de proteína ligada (mg/g suporte), C_i é a concentração inicial de proteína (mg/mL), V_i (mL) é o volume de proteína introduzido no meio, C_s é a concentração de proteína (mg/mL) presente nas soluções filtradas, V_s (mL) é o volume da solução sobrenadante, C_l (mg/mL) é a concentração de proteínas lixiviadas, V_l é o volume (mL) da solução de lavagem do suporte e ms é a massa do suporte em gramas.

Ao analisar a retenção de enzimas de cada suporte (Tabela 1), pode-se verificar que não houve diferença significativa entre eles. No entanto, suporte de Quitosana funcionalizada com EDTA e ativada com glutaraldeído apresentou uma maior eficácia dentre as amostras estudadas.

Tabela 1: Valores de quantidade de proteína (mg de enzima/ g de suporte) obtido na imobilização dos suportes

Suporte	Quantidade de proteína (mg de enzima/ g de suporte)	Percentual de proteína imobilizada
Quia – EDTA	119,0	89%
Qui – EDTA-GLU	39,8	66%

A tabela 2 apresenta os valores referentes ao rendimento de imobilização e da atividade recuperada. O rendimento foi calculado de acordo com a fórmula explanada anteriormente no tópico 5.2.2.1. Este foi obtido a partir do cálculo da atividade da solução de enzima livre determinada no início da imobilização e no final da imobilização pela atividade do derivado. Já a atividade recuperada é a quantidade de enzimas teoricamente imobilizadas, que estão ativas após o processo (calculada usando equação 3 do tópico 5.2.2.2).

Avaliando a Tabela 2, nota-se que o suporte de quitosana funcionalizado com EDTA apresentou um rendimento de 35%, enquanto que o suporte ativado com glutaraldeído obteve apenas 22% de rendimento de imobilização. Esses valores baixos indicam que a atividade catalítica da enzima no suporte foi afetada. Ao analisar a porcentagem de enzimas que estão ativas no suporte (atividade recuperada), é possível notar que esse parâmetro também foi afetado na imobilização, visto que os dois suportes

apresentam valores aproximados de 45%. Vários fatores podem justificar esses dados, um deles é a imobilização da enzima com a conformação comprometida.

Tabela 2: Parâmetros de imobilização da lipase em quitosana ativada com EDTA e quitosana ativada com EDTA e GLU atividade recuperada (Atr) e rendimento de imobilização.

Estratégia de imobilização	Atividade recuperada (Atr)	Rendimento de imobilização
Quitosana-EDTA	45%	36%
Qui-EDTA-GLU	45%	22%

Um desafio na imobilização de enzimas é que geralmente leva a alguma perda de atividade durante o processo, muitas vezes devido à interação da conformação errada com o transportador. Por se tratar de um catalisador heterogêneo, a perda de atividade também pode proceder de limitações de difusão, sobretudo com substratos macromoleculares, e dependentes do tamanho das partículas. A perda de atividade também pode resultar da abrasão das partículas sólidas, causadas pela agitação mecânica. No entanto, mesmo havendo perdas esses fatores são compensados pela capacidade de reutilizar a enzima imobilizada⁹.

Outro fator que pode influenciar na imobilização são grupos reativos no agente químico usado para ativar a quitosana, como glutaraldeído ou etilenodiamina, e também por amino e hidroxila. Até mesmo grupos amina presentes na própria quitosana influenciam na imobilização. Esses grupos funcionais presentes no suporte podem causar ligação não específica da enzima ao suporte, o que pode acarretar em perda da atividade enzimática. Em determinados casos, pode ser necessário bloquear os demais grupos reativos no suporte. Da mesma forma, os grupos reativos presentes na quitosana podem reagir com substratos ou produtos da reação, dependendo das condições de reação usadas. Por exemplo, os grupos amino podem reagir com as carbonilas de aldeído e cetonas, formando bases de Schiff que afetam a solubilidade do polímero³⁰.

Diversos fatores são levados em consideração durante a análise da atividade enzimática. Tais como, a orientação das moléculas das enzimas, ou até mesmo a possibilidade de estarem desnaturadas na superfície do suporte, devido às modificações conformacionais do sítio ativo durante o processo de imobilização. Essas particularidades resultam em menor retenção de atividade enzimática, mesmo que os sistemas

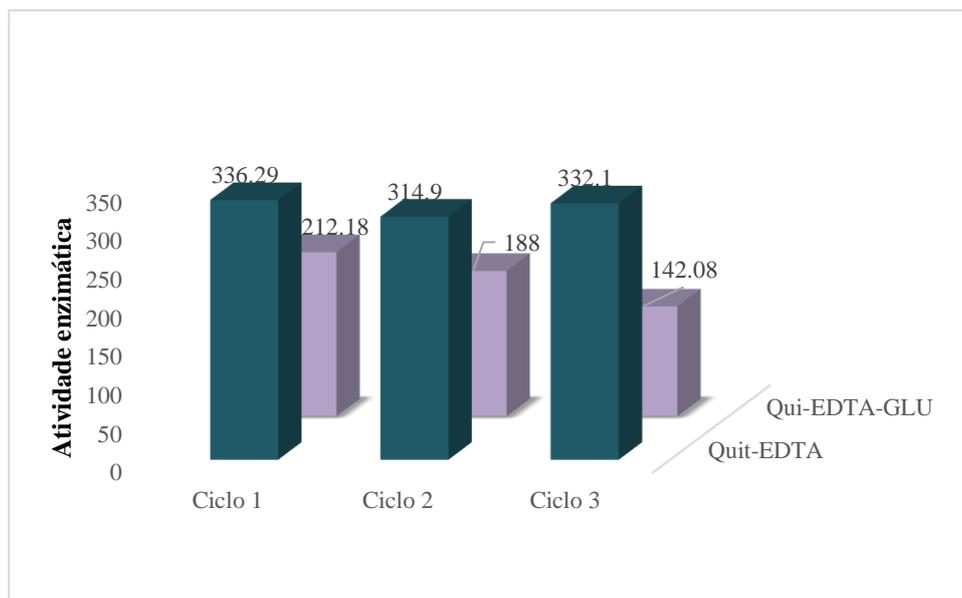
imobilizados apresentem alta carga de enzima imobilizada.

Uma possível explicação para perda da atividade enzimática, mesmo em elevadas cargas de enzimas, foi levantada na literatura. Em estudo utilizando suporte de agarose ativada com glicidol, com quantidades diferentes de enzimas (5 e 10mg de proteína/g de suporte) a menor carga enzimática resultou em uma atividade de 300U/g. Enquanto que a quantidade maior de enzima gerou uma atividade de 279U/g, mesmo a quantidade de proteína imobilizada sendo duas vezes maior. A explicação para isso é que o extrato enzimático bruto pode conter impurezas, que competem com os grupos reativos do suporte. Após verificar a presença de enzimas menores no extrato bruto e separar estas, obteve-se atividades enzimáticas de 845U/g em concentrações de 60mg de proteína/g de suporte. Dessa forma, mostrando que a pureza do extrato enzimático é importante, visto que a imobilização não é seletiva a proteínas e peptídeos menores³¹. Esses valores corroboram com os de atividade enzimática obtidos no presente trabalho. Pode-se justificar o baixo rendimento na imobilização, ainda que possuindo alta carga enzimática nos suportes.

4.2 Estabilidade operacional de derivados na reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP)

As lipases imobilizadas foram avaliadas quanto a sua estabilidade operacional, com intuito de verificar sua capacidade catalítica em termos de potencial de reciclo. Os derivados foram testados na reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) em *p*-nitrofenol, onde foi possível obter a atividade enzimática em cada ciclo reacional. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5. Estes mostram que após três ciclos realizados apenas o derivado de quitosana ativado com glutaraldeído sofreu decaimento significativo, visto que sua atividade enzimática decresceu em 34% em relação ao primeiro ciclo.

Figura 5. Atividade enzimática dos derivados durante reciclo.



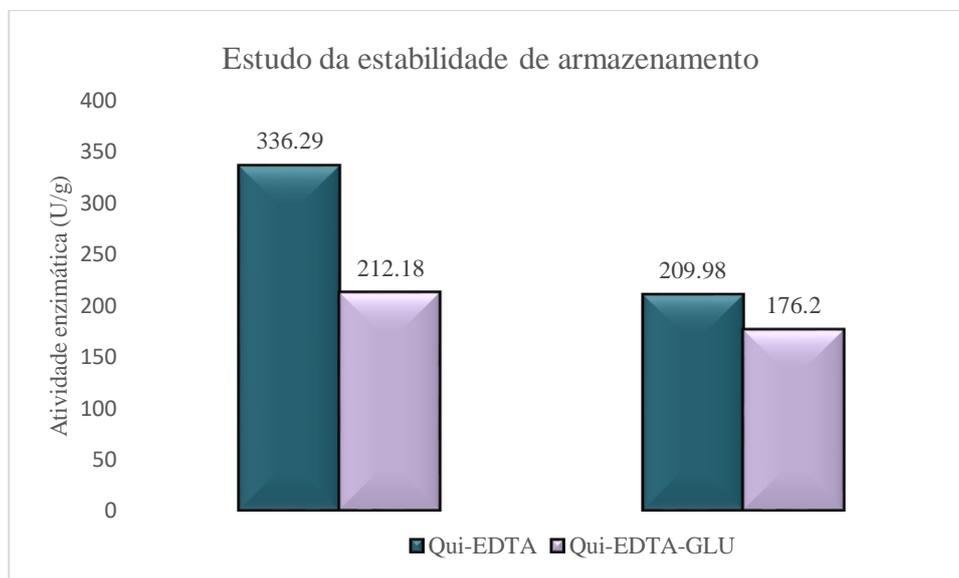
Entre as vantagens de utilizar enzimas imobilizadas está a possibilidade de fazer mais de uma reação com o mesmo derivado. Uma vez que a enzima livre não tem essa possibilidade. O efeito da imobilização sobre a estabilidade operacional das lipases pode compensar a perda de atividade, já que a enzima pode permanecer mais estavelmente ligada ao suporte. A figura 5 mostra que as lipases apresentaram perda de atividade após cada ciclo reacional, sendo que a enzima imobilizada no suporte de Qui-EDTA mostrou-se mais estável em relação ao suporte de Qui-EDTA-GLU, permanecendo com valores próximos de atividade durante seus ciclos. Além de conservar maior atividade de hidrólise nas condições do ensaio. Perdas de atividade enzimática são esperadas, porque a cada ciclo de reação as enzimas imobilizadas podem sofrer dessorção depois de submetidas à lavagem com o tampão de imobilização, o que pode causar menor retenção da atividade enzimática.

Analisando a menor tendência de perda de atividade do suporte Qui-EDTA, pode-se inferir que neste sistema as moléculas de enzimas desenvolveram ligações mais eficazes com a superfície ativa do suporte. Isso pode ser devido ao fato de que a ligação covalente da enzima é favorecida no material contendo apenas o EDTA como ativador. A presença de um ativador na superfície do suporte pode diminuir interações não favoráveis com sítios ativos, o que confere maior flexibilidade da enzima no processo catalítico^{9,10}.

4.3 Estabilidade de armazenamento

Analisando a estabilidade de armazenamento é possível determinar a vida útil de uma enzima imobilizada, após um período de estocagem a que ela é submetida. No presente trabalho, as enzimas imobilizadas foram estocadas por 30 dias a temperatura de 9 °C, e completado este período, os sistemas foram submetidos a reações de hidrólise de *p*-NPP. A partir dos resultados estão exibidos na figura 6, é possível inferir um declínio de 37,5% na atividade enzimática pós armazenamento do derivado de quitosana funcionalizado com EDTA e 16% para o derivado de quitosana funcionalizado com EDTA e ativado com glutaraldeído. De tal modo, os resultados podem expressar que as condições de armazenamento das lipases imobilizadas podem ter prejudicado a manutenção da atividade catalítica das enzimas. Com isso, infere-se que o armazenamento em grandes intervalos de tempo pode causar decréscimo na atividade enzimática.

Figura 6. Valores da atividade enzimática pré e pós armazenamento



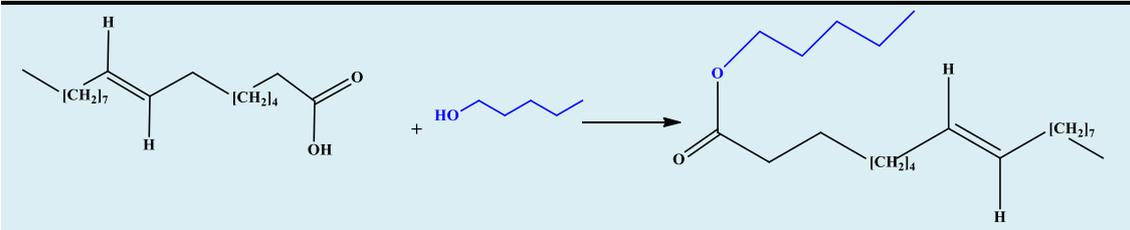
4.4 Desempenho da lipase imobilizada em quitosana na síntese de ésteres

As lipases de *Burkholderia cepacia* imobilizadas nos suportes de Qui – EDTA e Qui-EDTA ativado com glutaraldeído foram testadas nas reações de esterificação com o

objetivo de analisar a eficiência catalítica da lipase na reação de esterificação dos ácidos oléico e palmítico, com os alcoóis pentanol e isobutanol, em hexano, por 24 horas e a temperatura ambiente. Na tabela 3, são indicadas as conversões alcançadas para os ésteres pentílicos derivados dos ácidos oléico e na tabela 4 encontram-se os dados de conversão referentes a esterificação do ácido oléico com o isobutanol. A conversão dos ésteres foi alcançada a partir de titulação do ácido remanescente na reação com solução padrão de NaOH.

Foi retirada uma alíquota de 3mL do produto de esterificação, diluído em 10 mL etanol e, em seguida, titulado utilizando solução padronizada de NaOH a 0,012mol/L. Com isso, foi possível calcular a concentração de ácidos graxos remanescentes após reação. Utilizando a equação 4 explanada no item 5.3, foi obtido o valor da conversão do ácido em éster. A tabela 3 traz as conversões de oleato de pentila utilizando os dois derivados durante dois ciclos. Analisando a tabela nota-se linearidade entre os ciclos, dos biocatalisadores e valores de conversões próximos. A exemplo do Qui-EDTA que obteve 44% da conversão na primeira reação e 48% de conversão do éster na segunda reação.

Tabela 3. Conversão do ácido oléico em ésteres usando o pentanol, catalisadas por lipases imobilizadas.

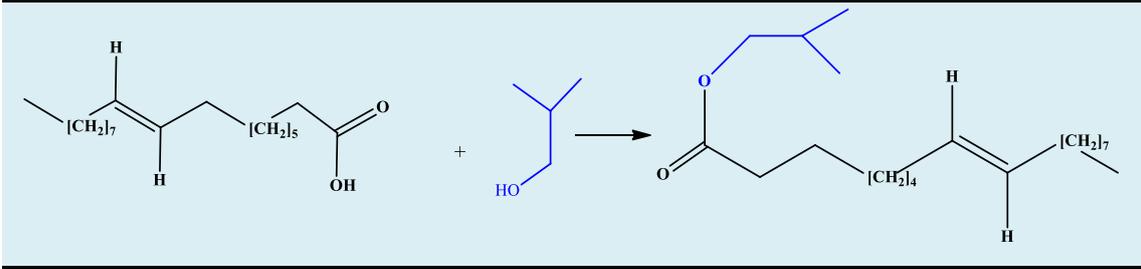


Conversão (%) Oleato de pentila	
Suporte	Titulação
1ª reação do suporte de Qui-EDTA	44%
2ª reação do suporte de Qui-EDTA	48%
Suporte	Titulação
1ª reação do suporte de Qui-EDTA-GLU	46%
2ª reação do suporte de Qui-EDTA-GLU	48%

A tabela 4 apresenta os dados relativos à conversão do oleato de isobutila. Analisando os valores de conversão, nota-se que o suporte de Qui-EDTA foi mais

eficiente convertendo 48% na primeira reação, enquanto que o derivado Qui-EDTA-GLU converteu 42%. Nesta reação não foi possível fazer o reuso do derivado bifuncionalizado, pois parte do catalisador se perdeu durante o processo de reaproveitamento.

Tabela 4. Conversão do ácido oléico em ésteres usando o isobutanol, catalisadas por lipases imobilizadas



Conversão (%) Oleato de isobutila

Suporte	Titulação
1ª reação do suporte de Qui-EDTA	48%
2ª reação do suporte de Qui-EDTA	34%
Suporte	Titulação
1ª reação do suporte de Qui-EDTA-GLU	42%

Em pesquisa utilizando a lipase de *Cândida antarctica* para esterificação de ácido oléico com vários álcoois alifáticos, foram obtidos rendimentos consideráveis. Aplicou-se a lipase em reações de 24 horas, estas geraram rendimentos de 90.8%, 96.5%, 95.1% e 91.0% ao utilizar os álcoois metanol, etanol, propanol e butanol, respectivamente. Na reciclagem foi notada a desativação da enzima pelo metanol. No entanto, para todos os outros álcoois durante os 10 ciclos de reação, os rendimentos não mudaram significativamente (95,8, 94,2 e 90,1 para etanol, n-propanol e n-butanol, respectivamente), mostrando que a enzima pode ser reutilizada para a preparação de ésteres ³¹.

Os derivados foram utilizados em reações de esterificação com o ácido graxo saturado (ácido palmítico) e os alcoóis citados nas primeiras reações. Com isso, foram obtidos os valores das conversões que estão apresentadas nas tabelas 5 e 6. As conversões referente à formação do palmitato de pentila (Tabela 5), catalisadas pelo derivado Qui-EDTA, foram maiores a dos demais ésteres mostrados anteriormente, chegando a valores

Capítulo 5

Seção experimental

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Ácido oléico (Sinth)

Pentanol

Isobutanol

Hexano

Hidróxido de sódio (Vetec)

Albumina bovina (Sigma-Aldrich)

Lipase *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich)

Reagente de biureto (Pro-pure)

4-nitrofenol(Vetec)

Para-nitrofenolpalmitato (Sigma-Aldrich)

Glutaraldeído

Dioxalato de sódio (Sigma-Aldrich)

Goma arábica (Sigma-Aldrich)

Clorofórmio deuterado CDCl_3 e DMSO-D (Sigma-Aldrich)

O suporte de Quit-EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) foi desenvolvido em pesquisa³⁷ anterior e gentilmente cedido. As análises de espectroscopia de ultravermelho foram realizadas no Laboratório de Compostos de Coordenação e Química de Superfície (LCCQS-UFPB). Os experimentos de caracterização, imobilização e aplicação foram realizados no Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LASOB). Os espectros de RMN foram feitos no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA-UFPB)

Métodos

5.1 Imobilização da lipase

5.1.1 Preparo da solução enzimática

Foram pesadas 200mg da proteína de Amano comercial lipase de *Burkholderia cepacia* (Sigma Aldrich) foi pesada e dissolvida em 100 mL de tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$), 50 mM (pH 7,5). Posteriormente, a solução enzimática foi sujeita a agitação lenta por 20 min a 25 °C e, em seguida, centrifugada a 1000 rpm durante 1 h. A solução resultante foi filtrada e armazenada a 4 °C. A concentração final da solução enzimática foi de 2 mg/mL de proteína³⁸.

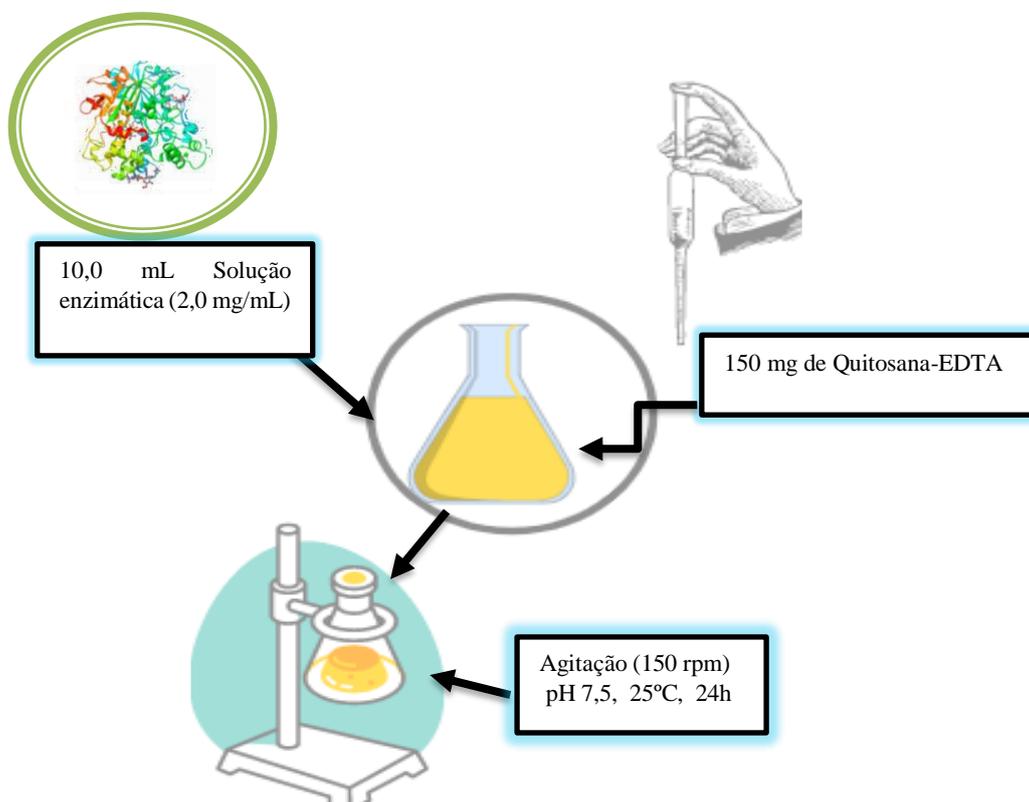
5.1.2 Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (BC lipase) em quitosana-EDTA

A enzima lipolítica de *Burkholderia cepacia* (BC lipase) foi utilizada para reagir, pelo método da imobilização covalente, com a superfície do polímero de quitosana quimicamente modificado com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Nesse processo, investigou-se a quantidade de proteína imobilizada por grama de suporte e a atividade enzimática.

As soluções enzimáticas ($2,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram preparadas a partir da dissolução da lipase em tampão fosfato, como descrito no item 5.1.1. Em seguida, uma alíquota de 10,0 mL da solução enzimática foi adicionada em frascos erlenmeyer contendo 150,0 mg do suporte funcionalizado de Quit - EDTA, sendo a mistura reacional mecanicamente agitada por 24 h, em temperatura ambiente (25°C). Após a reação, o disperso foi filtrado e os sólidos obtidos foram lavados com solução tampão de imobilização pH 7,5 e armazenados em refrigerador a 4 °C.

A solução sobrenadante foi usada para determinar a concentração de proteínas remanescentes após a reação de imobilização e comparada com a solução de enzima livre. Através de leituras em espectrofotômetro UV (UV-1800/ Shimadzu), realizadas no Laboratório de Compostos de Coordenação e Química de Superfície (LCCQS-UFPB), a partir da curva de calibração da albumina como padrão protéico, a partir do método de Biureto⁴¹. O Esquema 8 ilustra o resumo dos ensaios de imobilização da BC lipase no material funcionalizado.

Esquema 8. Resumo esquemático da reação de imobilização da BC lipase no suporte de Qui-EDTA. A atividade da enzima (4.000 U/g do suporte) disponível no meio de imobilização foi baseada na atividade da BC lipase (30.000 U/g de proteína) dada pelo fabricante.

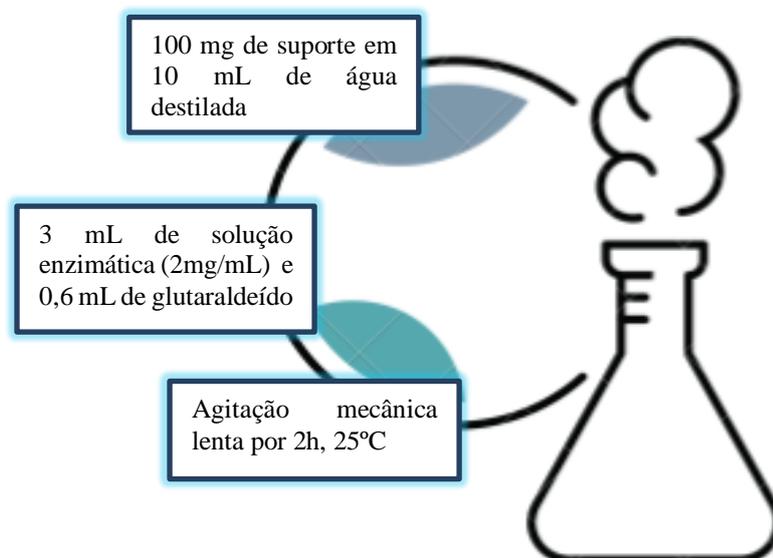


5.1.3 Imobilização da BC lipase em Quit-EDTA com glutaraldeído

A lipase foi imobilizada no suporte de Quit-EDTA, através da reação usando glutaraldeído como reagente transversal. No esquema 9 estão representados os passos seguidos na imobilização. Inicialmente, foram pesados 100 mg de Quit-EDTA e misturados com 10 mL de água destilada. A dispersão de polímero foi adicionada a 3,0 mL de solução de lipase (2,0 mg/mL), preparada anteriormente em tampão fosfato (50 mM, pH 7,5), junto com 0,6 mL de glutaraldeído (25 %, w/v). A mistura foi agitada suavemente por duas horas em temperatura ambiente. O precipitado resultante foi recuperado por filtração a vácuo. O excesso de glutaraldeído foi retirado por lavagem, com tampão fosfato de imobilização. O sobrenadante, assim como a água das lavagens,

foram coletados para a quantificação de proteína remanescente^{39,40}.

Esquema 9. Resumo esquemático da reação de imobilização da BC lipase no suporte de Quit-EDTA com glutaraldeído.



5.2 Caracterização dos suportes

5.2.1. Determinação da quantidade de proteína imobilizada

As concentrações protéicas foram determinadas pelo método proposto por Biureto⁴¹, com albumina de soro bovino como padrão proteína. A quantidade de proteína imobilizada ao suporte foi diretamente calculada a partir da diferença entre a quantidade de proteína usada para imobilização, a quantidade de proteína presente no filtrado e nas soluções de lavagem após imobilização.

5.2.1.1 Cálculo da determinação da concentração de proteína

A quantidade de proteína presente nas soluções sobrenadantes (após imobilização) e nas soluções com as enzimas lixiviadas (após lavagem do suporte) foi determinada espectrofotometricamente, de acordo com o método de Biureto⁴¹. A absorbância das amostras contendo as enzimas foi lida em 540 nm, contra um branco contendo água destilada e reagente de Biureto. A quantidade de proteína ligada ao suporte foi calculada pela diferença entre a quantidade de proteína introduzida no meio de imobilização e a

quantidade de proteína presente nas soluções filtradas e de lavagem do suporte. Desse modo, a massa de proteína retida por grama de suporte foi calculada pela equação 1 (Tópico 4.1.1) ^{18,39}.

5.2.2 Determinação da atividade Enzimática

A atividade enzimática das amostras de lipase livre e imobilizada foi determinada espectrofotometricamente. O procedimento consistiu em provocar a hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP, massa molecular = 377,5 g/mol, Sigma) na presença da solução de enzima livre (2,0 mg mL⁻¹), e também com a enzima imobilizada. As amostras foram lidas contra um branco feito nas mesmas condições reacionais utilizando o tampão fosfato pH 8.

Inicialmente, preparou-se uma emulsão contendo 207,0 mg de dioxalato de sódio (Sigma) e 100,0 mg de goma arábica (Sigma) que foram dissolvidos em 90,0 mL de tampão fosfato pH 8,0, a qual foi chamada solução trabalho. Foi retirado 9,0 mL desta solução trabalho e adicionou-se lentamente, gota a gota, 1,0 mL do substrato *p*-NPP dissolvido em isopropanol (3,0 mg/mL). Então, 0,3 mL da lipase livre ou 30 mg da lipase imobilizada ou 0,3 mL do tampão fosfato pH 8 (no caso do branco) foi adicionada em 2,7 da mistura contendo o substrato. Os sistemas reacionais foram incubados em tubos de ensaio que permaneceram em um banho pré-aquecido em 37°C durante 15 minutos. A reação libera o composto amarelo *p*-nitrofenol (*p*-NP) que apresenta absorvância em 410 nm.

5.2.2.1 Cálculo do rendimento da imobilização

O rendimento de imobilização ($R_{\text{imob}} (\%)$) foi calculado a partir da atividade da solução de enzima (sobrenadante) determinada no início ($Ativ_i$) e no final da imobilização ($Ativ_f$), utilizando a seguinte equação^{39,42}:

$$R_{\text{imob}} (\%) = \frac{Ativ_i - Ativ_f}{Ativ_i} \times 100 \quad (2)$$

5.2.2.2 Cálculo da atividade recuperada

O cálculo da atividade recuperada ($At_{\text{recuperada}}$), bem como o rendimento da

imobilização (sessão 5.2.2.1), foram estudados no intuito de avaliar o processo de imobilização. A atividade recuperada é a quantidade de enzimas teoricamente imobilizadas que estão ativas (equação 3) após o processo. A avaliação desses processos é fundamental para indicar quais melhores condições de imobilização⁴².

$$\text{At recuperada (\%)} = \frac{\text{At}_d}{\text{At}_0/\text{Ms} * \text{R}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

At_d é a atividade enzimática medida no derivado (U/g-suporte);

At_0 é a atividade enzimática medida na solução inicial da enzima (U);

Ms é a massa de suporte (g);

R é o rendimento da imobilização (%).

5.2.3 Estudo da estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos derivados selecionados foi realizada submetendo o catalisador a três ciclos subsequentes de reação de hidrólise de *p*-NPP. A reação foi realizada em batelada, mantido a 37 °C, (ver seção 5.2.2). Entre um ciclo e outro, o derivado foi lavado com tampão fosfato 1 mol/L, pH 8.0, para a remoção de produtos e substratos, e posteriormente, filtrado a vácuo e pesado em balança analítica^{18,39}.

5.2.4 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade de estocagem foi estudada para avaliar o tempo de vida útil dos biocatalisadores imobilizados através da determinação da atividade enzimática residual nas condições reacionais estabelecidas no item 5.2.2. Os derivados imobilizados foram armazenados por 30 dias na geladeira a 4°C, sem tampão ou qualquer solvente. Após esse período de armazenamento, as enzimas imobilizadas foram submetidas a reações de hidrólise do *p*-NPP^{18,39}.

5.3 Desempenho da lipase imobilizada em quitosana na síntese de ésteres

O potencial de aplicação da lipase imobilizada nos suportes Quit-EDTA e Quit-EDTA-GLU na síntese de ésteres foi verificada a partir de diferentes álcoois e ácidos, sendo selecionado um sistema para estudo. As reações de esterificação foram conduzidas

em erlenmeyers de 100 mL, os substratos em quantidades adequadas de álcool e ácido foram diluídos em 20 mL de hexano. As dispersões foram incubadas com lipase imobilizada em proporções adequadas. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente, sob agitação mecânica constante de 150 rpm, durante 24 horas.

As sínteses foram conduzidas em enleymeyers de 100 mL contendo 0,05 mol/L isobutanol ou pentanol e 0,05 mol/L dos ácidos testados (ácido oléico e ácido palmítico) em 20 mL de hexano. As reações foram feitas utilizando 30mg de Quit-EDTA e 15 mg de Quit-EDTA-GLU imobilizados com a lipase imobilizada (massa seca), sob condições de agitação de 150 rpm, em temperatura ambiente durante 24 horas^{42,43}.

Foram analisadas amostras referentes ao final de cada reação efetuada. A partir de titulação usando solução de NaOH 0,012 M, padronizada com bftalato de potássio. Ao final de cada ensaio foi retirado uma aliquota de 3mL da reação e solubilizada com 10 mL de etanol. Posteriormente, foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína 0,1%, e seguida a titulação para determinação da concentração de ácido remasnecente da síntese.

Dessa maneira, a conversão molar nas reações foi calculada, com base no consumo de ácido graxo obtidas na titulação, conforme equação 4.

$$\text{Conversão molar (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (4)$$

C_0 = concentração inicial do reagente (g/L)

C = concentração final do reagente ao final da reação (g/L)

Capítulo 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Considerações finais

As lipases de *Burkholderia cepacia* na superfície quitosana-EDTA e quitosana-EDTA também ativada com glutaraldeído foram analisadas quanto a suas atividades enzimáticas catalisando reações de hidrólise do p-nitropalmitato. O derivado de Qui-EDTA possui atividade de 336U/g, enquanto que o derivado de Qui-EDTA-GLU apresenta atividade de 212,18U/g.

O rendimento da imobilização foi calculado também a partir da atividade catalítica desses suportes. O derivado de maior rendimento foi o de quitosana-EDTA com 35% de rendimento. O suporte de quitosana funcionalizado com glutaraldeído obteve rendimento de 22%.

Outro parâmetro analisado foi a estabilidade frente a 3 ciclos de reação, onde o derivado de quitosana-EDTA foi o mais estável. Visto que o suporte de quitosana-EDTA-GLU decresceu em 34% entre os ciclos.

A estabilidade de armazenamento, durante 30 dias, também foi estudada. O suporte de Qui-EDTA-GLU foi o que se mostrou mais estável nas condições de armazenamento oferecidas.

A reação de esterificação foi bem sucedida para todos os ésteres estudados. No entanto, o derivado de Qui-EDTA alcançou os maiores rendimentos e obteve até 80% de rendimento.

Os suportes de quitosana funcionalizados são uma alternativa eficiente de imobilizadores, mostrando atividades catalíticas e altos rendimentos. Contudo, o derivado do suporte funcionalizado apenas com o EDTA mostrou resultados mais satisfatórios.

Perspectivas

- ❖ Realizar estudos de atividade enzimática em diferentes pHs e temperaturas;
- ❖ Otimizar o processo de imobilização em quitosana-EDTA;
- ❖ Investigar a aplicação do derivado em reações à temperaturas mais elevadas.

REFERÊNCIAS

- [1] CAVALCANTE, F.T.T. *et al.* Current Status and Future Perspectives of Supports and Protocols for Enzyme Immobilization. **Catalysts**, v.11, n.10, p. 1222. 2021. Disponível em <https://www.mdpi.com/2073-4344/11/10/1222>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- [2] HOMAELI, A.A., SARIRI, R., VIANELLO, F., STEVANATO, R., Enzyme immobilization: an update. **J. Chem. Biol.**, v. 6, p. 185-205. 2013.
- [3] COSTA, B. Z. da. Versatilidade Enzimática : Triagem , Promiscuidade e Inibição de Enzimas. 2011. 173f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP.
- [4] SHELDON, R.A., BASSOC, A., BRADY, D., New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Royal Society**. v. 10, n. 50, p. 5850-5862. 2021. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/cs/d1cs00015b>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- [5] R. SHARMA, R., CHISTI, Y., Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol.** v 19. p. 627-662. 2001.
- [6] BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, p. 392-416, 1996.
- [7] RODRIGUES, D. S., *et al.*, Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** . v. 51 , n. 3-4, p. 100–109. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117707002548>. Acesso em: 22 mar. 2022.
- [8] LIU, T., *et al.* Improving catalytic performance of Burkholderia cepacia lipase immobilized on macroporous resin NKA. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, v. 71, p. 45–50. 2011.
- [9] QIUA, X., *et al.* Co-immobilization of laccase and ABTS onto amino-functionalized ionic liquid-modified magnetic chitosan nanoparticles for pollutants removal. **Journal of Hazardous Materials**. v. 401, p.123353. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438942031342X>. Acesso em: 08 dec. 2021.
- [10] HUGHES, G., LEWIS, J. C. Introduction: Biocatalysis in Industry. **Chem. Rev.** v.118, n. 1, p. 1–3. 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.7b00741>. Acesso em: 08 dec. de 2021.
- [11] COELHO, F. A. S. Fármacos e quiralidade. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. v3. (2001).
- [12] LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Quim. Nova**. v.20, p.657–663 (1997).

- [13] VOET, D., VOET, J. G. **Bioquímica**. 4 ed. Artmed. 2013.
- [14] FERRIER, D. R., **Bioquímica ilustrada**. Tradução: Carla Dalmaz ... [et al.] – 7ed. Porto Alegre: Artmed. 2019. Título original: Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 7th Edition ISBN 9781496344496.
- [15] LIU, J., YANG, Q., LI, C., Towards efficient chemical synthesis via engineering enzyme catalysis in biomimetic nanoreactors . **Chem. Commun.**, v51, p.13731. 2015.
- [16] Dewick, P., M. **Essentials of Organic Chemistry**. England: Wiley (2006).
- [17] ALNOCH, R. C., DOS SANTOS, L. A., DE ALMEIDA, J. M., KRIEGER, N., MATEO, C., Recent Trends in Biomaterials for Immobilization of Lipases for Application in Non-Conventional Media. **Catalysts**. v10. 697p. Disponível em: doi:10.3390/catal10060697. Acesso em: 06 de dezembro de 2021. (2020).
- [18] SILVA, A.L. P., **Preparação de sílicas organofuncionalizadas para a imobilização de lipase de burkholderia cepacia**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Da Paraíba. João Pessoa-PB. 2012.
- [19] PIMENTEL, A., **Síntese de Ésteres Catalisada por Lipases Imobilizadas em Filmes de PVA**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal De Santa Catarina. Florianópolis-SC. 2006.
- [20] CRUZ JR, A. **Imobilização de Lipase de Candida antarctica B em Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal De Santa Catarina. Florianópolis-SC. 2007.
- [21] SCHMIDELL, W., LIMA, de A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotecnologia industrial**. v2. 1ed. Blucher. (2001).
- [22] FERNARDEZ-FERNANDEZ; SANROMÁN, M; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v.31 , n.8, p. 1808-1825. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S073497501200064X>. Acesso em: 22 dec. 2021.
- [23] RIBEIRO, E. S., Chitosan–based nanofibers for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 183, p. 1959-1970. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021011983>. Acesso em: 12 dec. 2021.
- [24] VILLENEUVE, P. *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113- 148, 2000.
- [25] Kou, S.G., Peters, L.M., Mucalo, M.R., Chitosan: A review of sources and preparation methods. **International Journal of Biological Macromolecules**. v 169. P 85–94. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>. Acesso

em:13 nov. 2021.

[26] KLEIN, D., **Química Orgânica**. Tradução: Oswaldo Esteves Barcia, Leandro Soter de Mariz e Miranda, Edilson Clemente da Silva. - 2. ed. - Rio de Janeiro: LTC, 2016. Título original: ORGANIC CHEMISTRY, SECOND EDITION. ISBN 978-85-216-3190-3

[27] GAMAYUROVA, V.S., *et al.* Lipases in Esterification Reactions: A Review. **Catalysis in Industry**. v. 20, n. 3. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2020-3-216-233>. Acesso em: 25 dec. 2021.

[28] YU, H., BYUN, Y., CHANG, P., Lipase-catalyzed two-step esterification for solvent-free production of mixed lauric acid esters with antibacterial and antioxidative activities. **Food Chemistry**. v 366. P. 13065. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130650>. Acesso em: 05 de mar. 2022.

[29] SUAREZ-ESCOBEDO, L., GOTOR-FERNANDEZ, V., Solvent role in the lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and derivatives. Optimization of the biotransformation conditions. **Tetrahedron**. v 81. p.131873. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131873>. Acesso em: 06 dec. 2021.

[30] ALNOCH, R.C., *et al.* Recent Trends in Biomaterials for Immobilization of Lipases for Application in Non-Conventional Media. **Catalysts**, v. 10, n. 6, p. 697, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal10060697>. Acesso em: 05 de mai. 2022.

[31] ROSSET, I.G., *et al.*, Enzymatic Esterification of Oleic Acid with Aliphatic Alcohols for the Biodiesel Production by *Candida antarctica* Lipase. **Catal Lett**. v 143. P. 863–872. 2013

[32] DIAS, M.R.G., **Síntese do oleato de etila catalisada pela lipase nativa de *Aspergillus niger* imobilizada em nanotubos de carbono**. 2015. Trabalho de conclusão de curso (BACHARELADO EM QUÍMICA) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba-PR. 2015.

[33] ZHENG, M., *et al* Lipase immobilized in ordered mesoporous silica: A powerful biocatalyst for ultrafast kinetic resolution of racemic secondary alcohols. **Process Biochemistry**. v. 53, P. 102-108. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.005>. Acesso em: 09 dec. 2021.

[34] HUNG, T., Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 26. p. 69–78. 2003.

[35] PINHEIRO, B. B., *et al.* Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 130, p. 798-809. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145>. Acesso em: 23 fev. 2022.

[36] SKOOG D., WEST, HOLLER, J., CROUCH, S., **Fundamentos de química**

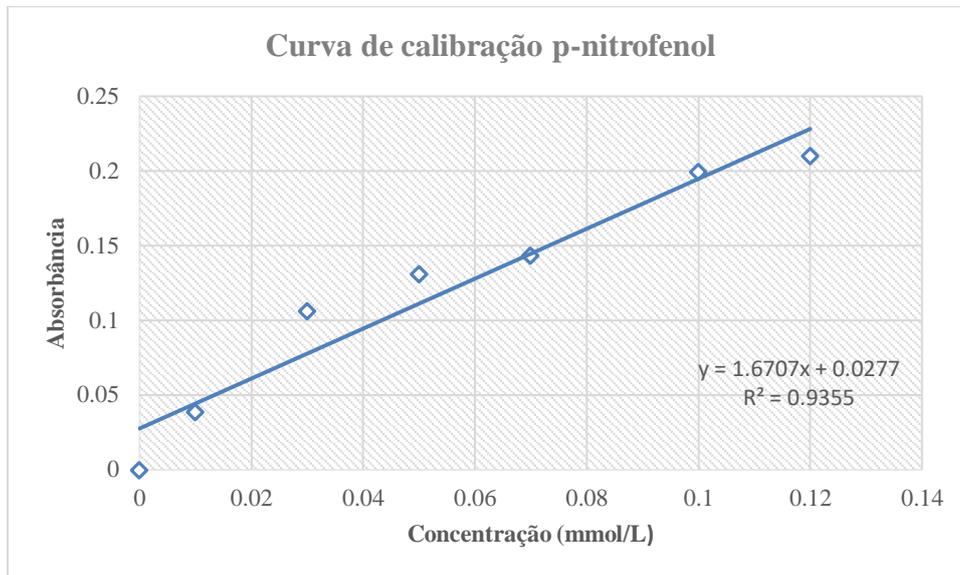
analítica. 9 ed. Cengage. 2014.

- [37] ABRANTES, P.G., **Quitosana-EDTA como catalisador heterogeneizado bifuncional para a reação de condensação de Knoevenagel**. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraíba. João Pessoa – PB. 2021.
- [38] FONSECA, T. S. *et al.* Immobilization of Amano lipase AK from *Pseudomonas fluorescens* on different types of chitosan-containing supports: use in the kinetic resolution of rac-indanol. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.44, p. 785–792, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02487-2>. Acesso em: 02 de junho de 2021.
- [39] SILVA, J. A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada para síntese de ésteres de vitamina A**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE. 2007.
- [40] He, S., *et al.* Preparation and characterization of lipase immobilized on reversibly soluble-insoluble N-(2-carboxylbenzoyl) chitosan. **J Sol-Gel. Sci Technol**. v.63, p.519–525. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10971-012-2814-7>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- [41] ITZHAKI, R. F., GILL, D. M. A Micro-Biuret Method for Estimating Proteins. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**. V.9, p.401-410. 1964.
- [42] BRÍGIDA, A. I. S., **Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra da casca de coco verde como suporte**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE. 2006.
- [43] PEREIRA, E. B., **Lipase Livre e Imobilizada em Quitosana: Caracterização e Potencial de Aplicação em Reações de Hidrólise e Síntese**. 1999. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá-SP. 1999.
- [44] PADILHA, G. da S., **Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de *Burkholderia cepacia***. 2010. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas – SP. 2010.
- [45] PDB Protein Data Bank. Disponível em: <https://www.rcsb.org/3d-view/2NW6/1> Acesso em: 05 de maio de 2022.
- [46] SOUZA, L.T de A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo : Blucher, 2009. 529 – 569p.
- [47] CIRILLO, N. A., **Cinética enzimática da produção de palmitato de cetila por esterificação em sistema livre de solvente**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR. 2018.
- [48] LANG, D.A., DIJKSTRA, B.W., Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**. v.93, n. 1-2, p. 115-122, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009308498000358#FIG2>. Acesso em: 29 jun. 2022.

[49] JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n.1, p. 315. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>. Acesso em: 25 jul 2022.

APÊNDICE

Apêndice 1. Curva de calibração do p-nitrofenol



Apêndice 2. Curva de calibração de albumina. Para determinação de proteína.

