

## APLICAÇÕES SINTÉTICAS DE LIPASES IMOBILIZADAS EM POLÍMEROS

**Roberto Dalla-Vecchia**

Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, 88302-202 Itajaí - SC

**Maria da Graça Nascimento\* e Valdir Soldi**

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 6154, 88040-900 Florianópolis - SC

Recebido em 19/5/03; aceito em 21/11/03; publicado na web em 27/05/04

SYNTHETIC APPLICATIONS OF IMMOBILIZED LIPASES IN POLYMERS. The application of biocatalysis is a promising field related to new technologies for organic synthesis. The development of immobilization techniques is very important due to the multiple or repetitive use of a single batch of enzymes and the ability to stop the reaction rapidly, at any stage, by removing the enzymes. In most cases, after immobilization, enzymes and microorganisms maintain or even increase their activity and stability. This work presents an overview of the common methods for lipase immobilization in polymers and applications of these systems to obtain compounds of synthetic interest.

Keywords: lipases; immobilization; polymers.

### INTRODUÇÃO

Muito da história da bioquímica refere-se à pesquisa em enzimas. Em 1926, James Sumner's isolou e cristalizou a primeira enzima, a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ . As enzimas desempenham a função de catalisar as reações nos organismos. Com exceção de alguns RNAs (ribozimas) que são catalisadores durante seu próprio processamento, todas as enzimas são proteínas, as quais aumentam a velocidade de uma reação por um fator de  $10^{14}$  vezes mais do que uma reação não catalisada<sup>1</sup>.

O termo biotransformação pode ser aplicado para modificações específicas ou interconversões na estrutura química, realizadas por enzimas presentes nas células ou na forma isolada. A biotransformação difere da fermentação, na qual o substrato é convertido a produtos através de um caminho metabólico bastante complexo na célula.

As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos. Entretanto, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato ou quando ocorrem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas.

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica<sup>2</sup>.

Atualmente, mais de 3.000 diferentes enzimas têm sido identificadas e muitas isoladas em sua forma pura. Várias têm sido obtidas na forma cristalina e a seqüência de aminoácidos, bem como a estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-2D<sup>3</sup>.

A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, e ao fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastante suaves.

A utilização de enzimas como catalisadores em reações sintéticas em meio orgânico não é recente; as primeiras são do início do século XX. Entretanto, o interesse por estes sistemas ressurgiu após

a publicação dos trabalhos de Zaks e Klibanov, no início dos anos 80<sup>4,7</sup>. As enzimas apresentavam pouca utilidade em síntese orgânica devido, principalmente, à idéia pré-concebida de que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação estrutural cataliticamente ativa. Entretanto, sabe-se atualmente que muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas, ou em certos casos até superior. Acredita-se que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque permanecem na sua forma original, e não se desdobram em meio não-aquoso. Esta característica deve-se, em parte, ao aumento das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos e à baixa constante dielétrica da maioria deles e, também, ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares<sup>8</sup>.

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização<sup>9</sup>.

A utilização destas técnicas tem sido crescente nos últimos vinte anos e, com isso, novas informações teóricas e aplicações práticas estão surgindo<sup>9</sup>. O uso de biocatalisadores imobilizados também é crescente em escala industrial, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, entre outras<sup>10-12</sup>.

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulasas, amilases e lipases) são as mais freqüentemente usadas na química orgânica. Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode-se citar ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade de uso porque não necessitam cofatores e ampla especificidade para substratos<sup>2</sup>. Aplicações analíticas também têm se beneficiado das reações enzimáticas em meio orgânico. Lima e Angnes<sup>13</sup> mostraram várias aplicações envolvendo reações enzimáticas com biossensores amperométricos, os quais são empregados para a resolução de problemas analíticos em diversas áreas, como clínica, na análise de alimentos e de amostras ambientais<sup>13</sup>.

\*e-mail: gracia@qmc.ufsc.br

O presente artigo descreve os principais métodos de imobilização de lipases, evidenciando o uso de polímeros como materiais de suporte e exemplos de aplicações destes sistemas na química orgânica sintética.

## LIPASES

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases<sup>14</sup>. A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis<sup>15</sup>.

Entretanto, a diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água<sup>16</sup>.

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais com os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, por leveduras de *Tulopsis* sp e *Candida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Do ponto de vista econômico e industrial, os microrganismos são preferíveis do que as lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento<sup>17</sup>.

Entre as lipases, as de *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*<sup>18</sup>, *Geotrichum candidum*<sup>19,20</sup>, *Mucor miehei*<sup>21,22</sup>, *Pseudomonas glumae*<sup>23</sup>, *Candida rugosa* (anteriormente denominada *Candida cylindracea*)<sup>24,25</sup>, *Candida antarctica*<sup>26</sup>, *Chromobacterium viscosum*<sup>27</sup>, lipase pancreática de cavalo<sup>28</sup>, lipase pancreática humana<sup>29</sup> e lipase pancreática bovina<sup>30</sup> têm sua estrutura determinada. A massa molecular destas enzimas varia de 20-75 kDa. Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente acídicas, com pI entre 4 e 5<sup>31,32</sup>.

O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases<sup>21</sup>. Estudos de raio-X realizados por Uppenberg et al.<sup>33</sup> com a lipase da *Candida antarctica* revelou a existência de uma “tampa” similar recobrando a tríade catalítica Ser-His-Asp.

Mais recentemente, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial<sup>34</sup>. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e não precisam da interface para exercer a atividade hidrolítica<sup>35</sup>.

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem a habilidade de

catalisar reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais<sup>10,36</sup>.

Nos últimos anos, com o intuito de aumentar a atividade catalítica de lipases, foram apresentados na literatura vários procedimentos de imobilização ou modificações na estrutura nativa, sendo que estes processos envolvem diferentes graus de complexidade e eficiência. Os métodos de imobilização requerem uma interação fraca ou a formação de ligações covalentes entre a lipase e o suporte<sup>2</sup>. A engenharia genética de lipases envolve a modificação do gene que codifica para a enzima. Esta tecnologia inclui a habilidade de isolar e expressar os genes de interesse e modificar algum aminoácido que ocupe um sítio importante para a atividade catalítica da enzima<sup>9,29</sup>.

## MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O desenvolvimento 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<sup>37</sup>.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo<sup>36</sup>. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização<sup>37</sup>.

Na literatura, inúmeros métodos<sup>2,9</sup> têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações. Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil<sup>2</sup>.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação 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. A Figura 1 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas<sup>38</sup>.

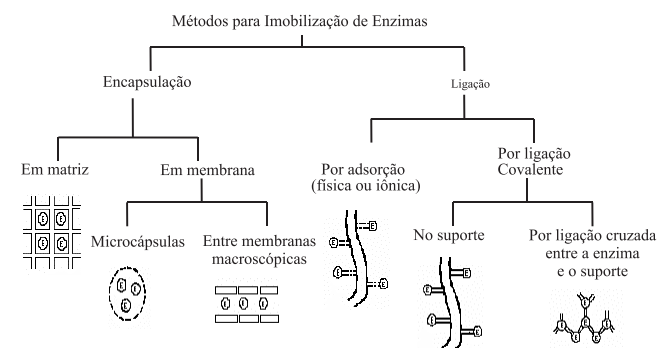
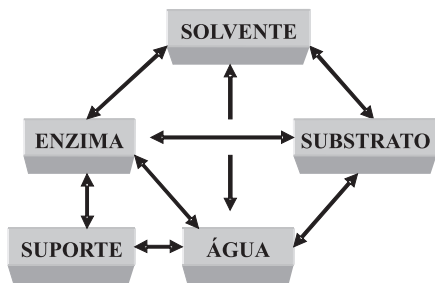


Figura 1. Métodos de imobilização de enzimas. Reproduzida da ref. 38, com permissão de H. Bungay

## PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA USO EM MEIO ORGÂNICO

A heterogeneidade do sistema biocatalítico, em meio orgânico, implica em uma relação mútua entre os diferentes componentes do sistema (Figura 2).



**Figura 2.** Relação mútua entre os vários componentes envolvidos em uma reação biocatalisada, na presença de solvente orgânico. Reproduzida da ref. 39, com permissão da Elsevier

Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionado para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliadas e otimizadas. A simples relação entre dois componentes pode levar a uma interpretação errônea<sup>39</sup>.

A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. Está bem documentado na literatura que uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a de síntese<sup>39,40</sup>.

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte<sup>7,8,41,42</sup>. A água contribui ainda para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima<sup>43</sup>.

Halling sugeriu o uso da atividade termodinâmica da água ( $a_w$ ) para definir a relação entre a água e os outros componentes do sistema reacional. O teor de água no catalisador é mais importante para manter a atividade catalítica do que a quantidade total contida no sistema. A atividade catalítica da lipase de *Rhizomucor miehei* em diferentes solventes orgânicos foi muito pequena para valores fixos de  $a_w$ <sup>44</sup>. O efeito da atividade da água em reações biocatalisadas por lipases tem sido mostrado em vários trabalhos<sup>45-52</sup>.

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos, tais como a mudança na rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína<sup>53,54</sup>. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como a variação da energia livre total, que estão associadas com diferentes energias de solvatação do solvente<sup>27,55</sup>.

Na literatura, não existe um consenso claro com referência à escolha do parâmetro para descrever quantitativamente o efeito do solvente, em reações catalisadas por enzimas. Porém, o parâmetro mais frequentemente utilizado é o  $\log P_{\text{oct}}$ , definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água<sup>56</sup>.

Segundo Laane *et al.*<sup>56</sup>, os solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}} \leq 2$  são hidrofílicos e não são adequados para a biocatálise, porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes com  $\log P_{\text{oct}}$  entre 2 e 4 são menos

hidrofílicos, perturbam fracamente a interação água-biocatalisador e afetam a sua estrutura de maneira imprevisível. Os solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}}$  superior a 4 são hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, deixando o biocatalisador no seu estado ativo.

Parâmetros como constante dielétrica ( $\epsilon$ )<sup>54,55</sup>, polarizabilidade<sup>57</sup>, bem como o parâmetro de solubilidade de Hildebrand ( $\delta$ )<sup>58</sup> e o de solubilidade tridimensional<sup>59</sup> – uma derivação do parâmetro de Hildebrand – são propostos para verificar a influência do solvente nas reações catalisadas por enzimas imobilizadas ou não.

Costa *et al.*<sup>60</sup> discutiram os principais aspectos relacionados com a influência do solvente sobre a enantiosseletividade de hidrolases, principalmente as lipases. O efeito do solvente nas reações biocatalisadas também foi mostrado por outros autores<sup>48,50,61-63</sup>.

O material usado como suporte para a imobilização afeta a quantidade de água total nas proximidades da enzima, e a partição dos reagentes e/ou produtos na mistura reacional<sup>64</sup>. Gray *et al.* verificaram que a atividade da lipase de *Candida cylindracea*, ligada ou não covalentemente em um suporte, diminuiu quando a quantidade de água era reduzida no sistema<sup>65</sup>.

A imobilização em suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade enzimática, devido a mudanças conformacionais. Os materiais hidrofílicos podem reduzir a solubilidade de substratos hidrofóbicos em regiões hidrofílicas, e o acesso dos substratos ao sítio ativo. Em alguns casos a matriz pode impor uma barreira estérea, resultando em rigidez na estrutura da enzima<sup>66</sup>.

Para ser efetivo na imobilização o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática.

## APLICAÇÕES DE LIPASES IMOBILIZADAS

### Imobilização via ligação: adsorção

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo<sup>9</sup>.

Balcão *et al.*<sup>67</sup>, em 1996, publicaram uma compilação de métodos de imobilização, mostrando que vários materiais podem ser utilizados, tais como polietileno, polipropileno, celite, resina sintética, celulose, sefadex, entre outros.

Paiva *et al.*<sup>68</sup>, recentemente, apresentaram uma revisão enfocando os aspectos cinéticos dos diversos métodos de imobilização de lipases, especialmente o desempenho catalítico dos derivados imobilizados em reatores.

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, depende de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros<sup>9</sup>.

O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação. Este processo, em geral, é realizado à temperatura constante e isotermas de adsorção são obtidas, as quais seguem as equações de Langmuir ou Freundlich<sup>37</sup>.

Na literatura existe um grande número de publicações com aplicações de lipases imobilizadas por adsorção física. Por exemplo, Carta

*et al.*<sup>42</sup> estudaram a imobilização da lipase de *Candida cylindracea* (atualmente denominada de *Candida rugosa*) em Nylon 6, que é muito simples e facilmente reproduzida. Os autores mostraram que este sistema pode ser usado para catalisar a síntese de ésteres derivados do ácido propiônico em n-hexano, com rendimentos elevados.

O uso de aditivos ou solventes durante o processo de imobilização, com o intuito de melhorar a eficiência, tem sido descrito na literatura<sup>69</sup>. Por exemplo, a resina de troca iônica, Dowex 66, foi utilizada para imobilizar a lipase de *Pseudomonas fluorescens*. Quando a imobilização foi realizada sem um pré-tratamento do suporte, a adsorção foi muito baixa. Porém, quando se adicionou 50% de um solvente polar, tal como etanol ou iso-propanol, a adsorção aumentou para 96-97%.

O mesmo efeito foi observado por Montero *et al.*<sup>70</sup>, pois o pré-tratamento do suporte com o solvente afetou a adsorção da proteína e a atividade após imobilização na hidrólise do óleo de oliva. Os autores sugeriram que o solvente polar “absorve” as moléculas de água do suporte, favorecendo a adsorção da proteína.

Basri *et al.*<sup>71</sup> imobilizaram a lipase da *Candida rugosa* em três suportes diferentes, Amberlite XAD7, poli(metilmetacrilato)(PMMA) e celite. A adsorção da proteína nestes suportes e nas condições testadas ocorreu em aproximadamente 30 min com 60, 30 e 20% de adsorção, respectivamente. A atividade da enzima imobilizada nos suportes foi testada na reação de esterificação do ácido oleico com n-butanol. Parâmetros como razão molar, efeito de solvente, variação do doador acila, bem como diferentes álcoois, foram analisados.

Bosley e Peilow<sup>72</sup> estudaram o efeito da massa das lipases de *Rhizomucor miehei*, *Humicola* sp, *Rhizopus niveus* e *Candida antarctica* B suportadas em poli(propileno). Foi observada uma pequena diminuição na eficiência da esterificação do ácido oleico com octanol para a lipase de *Humicola* sp, quando comparada com a de *Rhizomucor miehei*, após imobilização. Segundo os autores, podem ter ocorrido distorções na conformação da enzima, devido à alta afinidade com a superfície do suporte. Com a lipase de *Candida antarctica* B, a eficiência foi elevada utilizando-se pequenas quantidades do biocatalisador.

Mougard e Legov<sup>73</sup> estudaram a esterificação do retinol (vitamina A) com succinato de metila utilizando lipases de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica, *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina aniônica Duolite 568N, e pancreática de porco (LPP), *Candida rugosa* e *Rhizopus arrizus* na forma livre. Segundo esses autores, a reação foi dependente do solvente, sendo o primeiro processo descrito para a síntese de um derivado do retinol. O produto obtido é um carreador de ácido láctico (Esquema 1).

Abbas e Comeau<sup>74</sup> verificaram a habilidade catalítica da lipase da *Mucor* sp imobilizada em Amberlite IRC50 na síntese de ésteres aromáticos em cicloexano a 30 °C. Os ácidos propiônico, butírico e capríco, e os álcoois metanol, etanol, alílico, butanol, isoamílico, geraniol, citrionelol e farnesol foram utilizados em quantidades equimolares. Os rendimentos foram diferenciados dependendo da afinidade da lipase em relação à cadeia do ácido e/ou do álcool. Con-

versões rápidas e com altos rendimentos, 92 e 98%, foram observadas para o caprato de metila e caprato de etila, respectivamente, após 4 h de reação. Rendimentos de 95, 100 e 93% foram obtidos para o butirato de butila, caprato de butila e caprato de alila, respectivamente, após 24 h de reação.

Outros estudos descritos na literatura incluem lipases imobilizadas em poli(propileno)<sup>70</sup>, poli(metil-metacrilato)<sup>71</sup>, poli(estireno)<sup>75</sup>, poli(cloroeto de vinila)<sup>76</sup>, quitosana<sup>77</sup> e quitina<sup>77</sup> e poli(vinil acetato (VAC)-divinilbenzeno(DVB))<sup>78</sup>.

### Modificação por ligação covalente no suporte ou por ligação cruzada

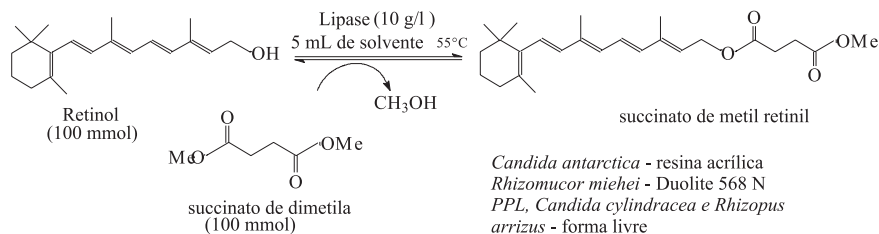
A utilização de proteínas modificadas quimicamente teve início no final da década de 50, sendo que a técnica foi originalmente desenvolvida para auxiliar na elucidação da estrutura de proteínas. Desde o final da década de 70, muitos trabalhos de modificação de proteínas para uso em síntese têm sido apresentados com o objetivo de alterar e melhorar as propriedades da lipase nativa<sup>79</sup>.

O procedimento envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido, através da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima em matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais.

O poli(etilenoglicol) (PEG) tem sido extensivamente utilizado como um modificador de proteínas. As proteínas podem ainda ser alteradas com derivados de poli(etilenoglicol) ativado, os quais são usualmente sintetizados a partir do monometóxi-poli(etilenoglicol) com um grupo hidróxi no final da cadeia.

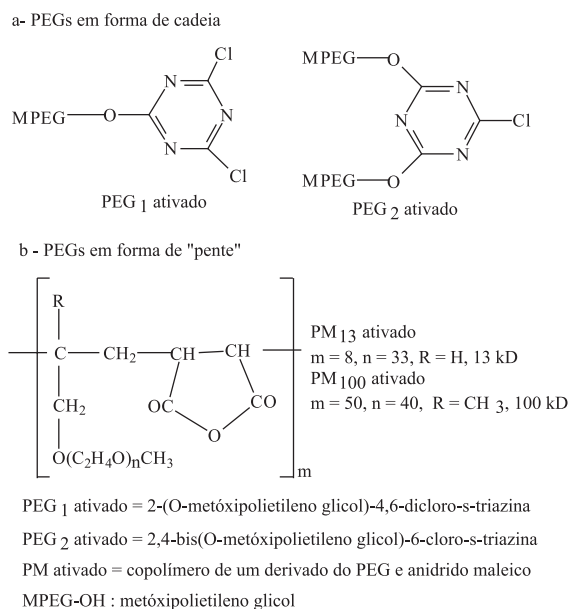
A Figura 3 mostra dois tipos de modificadores para a preparação de PEG-proteína usados em biotecnologia e em aplicações biomédicas, um em forma de cadeia, PEG<sub>2</sub>, e outro em forma de “pente” obtido pela combinação do anidrido maleico e monometóxi-poli(etilenoglicol), PM. Os modificadores reagem com o grupo amino do resíduo de lisina e/ou com o grupo amino terminal na molécula de proteína. O uso de PEG<sub>2</sub> na resolução de álcoois e síntese de lactonas é mostrado no Esquema 2<sup>79</sup>.

Palomo *et al.*<sup>80</sup> imobilizaram a lipase de *Mucor miehei* (LMM) em diferentes resinas epoxi funcionalizadas com diferentes grupos (epoxi-iminodiacético-Sepabeads, IDA, epoxi-etilenodiamina-Sepabeads, EDA, e quelatos epoxi-cobre-Sepabeads, IDA-Cu<sup>2+</sup>) e adsorvida via ativação interfacial em suporte octadecil-Sepabeads. A enzima imobilizada nos diversos suportes foi utilizada na resolução do ácido (*R,S*)-2-butiril-2-fenilacético, em diferentes condições de temperatura e pH. As propriedades catalíticas, atividade, especificidade e enantiosseletividade foram dependentes do tipo de suporte utilizado. A lipase imobilizada em octadecil-Sepabeads reagiu predominantemente com o enantiômero *R* e, nos demais suportes, IDA-Cu<sup>2+</sup>, IDA e EDA com o *S*<sup>80</sup>. Os valores de ee e E, foram dependentes da temperatura e pH (Esquema 3).

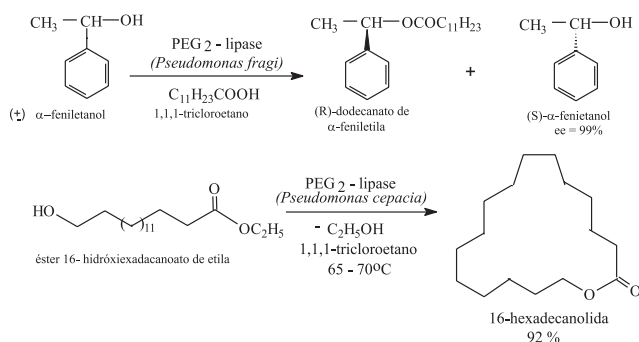


Esquema 1. Reação de esterificação do retinol com succinato de dimetila catalisada por lipases. Reproduzida da ref. 73, com permissão da Elsevier

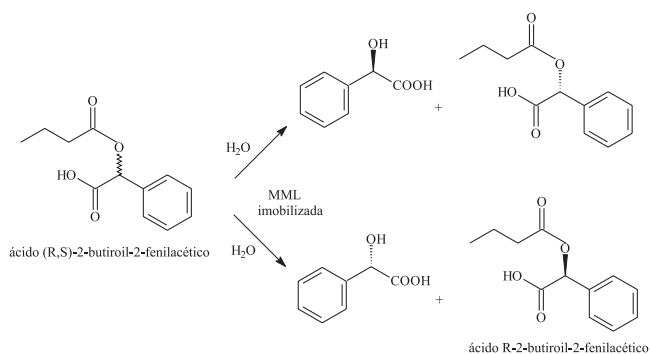




**Figura 3.** Dois tipos de modificadores: (a) em forma de cadeia PEG<sub>1</sub> e PEG<sub>2</sub>; (b) em forma de "pente" PM<sub>13</sub> e PM<sub>100</sub>. Reproduzida da ref. 79, com permissão da Elsevier



**Esquema 2.** Resolução de álcoois e síntese de lactonas com lipases modificadas. Reproduzida da ref. 79, com permissão da Elsevier



**Esquema 3.** Resolução do ácido (R,S)-2-butiroil-2-fenilacético catalisada por lipase de *Mucor miehei* imobilizada em diferentes resinas epóxi. Reproduzida da ref. 80, com permissão da Elsevier

Kilinc *et al.*<sup>81</sup> imobilizaram a lipase pancreática de porco (LPP) em matriz obtida por ligações cruzadas entre o álcool poli-vinílico (PVA) e o dicloreto de adipofila e utilizaram este sistema no estudo da reação de hidrólise da tributirina. Foram avaliados parâmetros

como atividade da enzima (em diferentes valores de pH e temperaturas) e estabilidade (térmica, operacional e estocagem). Foi verificado que a atividade específica original da lipase foi mantida em 63%. Porém, o pH ótimo foi modificado de 8,5 para 9,0 e a temperatura de 30 para 37 °C após a imobilização.

Tan *et al.*<sup>82</sup> obtiveram monoglicerídeos (MG) por hidrólise do óleo de palma utilizando lipases imobilizadas em membranas de quitosana (QTS), álcool poli-vinílico (PVA) e QTS/PVA, utilizando glutaraldeído ou epícloridrina como agente "de ligação cruzada". A lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada na membrana QTS/PVA foi mais ativa na reação de hidrólise, quando comparada com as de QTS e PVA. Os rendimentos de MG foram de 35-52%.

Zacchima *et al.*<sup>83</sup> modificaram a lipase da *Candida rugosa* com metóxi(poli(etileno glicol))-p-nitrofenil carbonato (NPC-mPEG). A lipase modificada reteve em 98% a atividade hidrolítica, em comparação com a não modificada. Com este sistema, o laurato de benzila foi obtido com 100% de rendimento, após 6 h em tolueno.

Amorim *et al.*<sup>84</sup> imobilizaram a lipase da *Candida cylindracea* em filmes de quitosana de diferentes fontes, *Syncephalastrum racemosum* e de crustáceos, utilizando glutaraldeído como agente multifuncional. A lipase imobilizada reteve em 47 e 42%, respectivamente, a sua atividade catalítica inicial, após quatro ciclos reacionais na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP), a 37 °C.

### Confinamento em matriz polimérica ou em cápsulas

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em "confinar" uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem.

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador<sup>9</sup>.

Filmes de polissulfonato de sódio (PSS), poli(óxido de etileno) (PEO) e blendas PSS/PEO com diversas composições foram utilizados para a imobilização de lipases de diferentes fontes e procedências. Estes sistemas foram usados como catalisadores na esterificação do ácido láurico com n-pentanol, em hexano.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na obtenção de laurato de n-pentila com lipases imobilizadas na blenda PSS/PEO 80:20. Rendimentos elevados foram obtidos com as lipases de *Mucor miehei* e de *Rhizopus oryzae* (Amano F-AP 15), 80 e 98%, respectivamente. Com as outras lipases foram obtidos rendimentos inferiores a 50%, e este resultado pode estar relacionado com a atividade diferenciada de cada lipase, bem como com a interação entre enzima e suporte<sup>85</sup>.

A lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP 15) foi imobilizada em blendas de PSS/PEO com diferentes composições, utilizadas na obtenção do laurato de n-pentila (Tabela 2).

A lipase F-AP 15 imobilizada na blenda PSS/PEO 100:0, foi pouco efetiva como biocatalisador para esta reação. Este resultado, segundo os autores, pode estar associado às interações entre enzima e suporte, as quais provocaram mudanças conformacionais na estru-

**Tabela 1.** Valores de percentagem de conversão (c,%) em ésteres obtidos com lipases de diferentes fontes imobilizadas na blenda PSS/PEO (80:20)<sup>85</sup>

| Enzimas                                     | Sigla   | Conversão (%) <sup>a</sup> |
|---|---------|----------------------------|
| <i>Mucor javanicus</i> <sup>b</sup>         | M       | 6                          |
| <i>Candida rugosa</i> <sup>b</sup>          | AY      | 9                          |
| <i>Pseudomonas sp</i> <sup>b</sup>          | LPS     | 13                         |
| <i>Candida rugosa</i> <sup>c</sup>          | LCR     | 22                         |
| Pancreatica de porco <sup>c</sup>           | LPP     | 25                         |
| <i>Aspergillus niger</i> <sup>b</sup>       | A       | 28                         |
| Greasex <sup>TM</sup>                       |         | 28                         |
| <i>Rhizomucor miehei</i> <sup>d</sup>       | LIZ     | 38                         |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> <sup>d</sup> | LIL     | 38                         |
| <i>Mucor miehei</i> <sup>d</sup>            | PAL     | 80                         |
| <i>Rhizopus oryzae</i> <sup>b</sup>         | F-AP 15 | 98                         |

(a) obtida por RMN<sup>1</sup>H, [enzima]: 50 mg/g suporte, tempo de reação: 24 h, solvente: n-hexano; (b) Amano; (c) Sigma e (d) Novozymes

tura nativa, ou devido a interações entre o PSS com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Na presença de 2% de PEO, a conversão em éster foi de 85%, indicando que interações de caráter mais hidrofóbico tipo “enzima-polímero” devem predominar neste sistema. A partir da composição da blenda PSS/PEO 80:20, os produtos foram obtidos com rendimentos elevados (98%), evidenciando que a lipase manteve sua atividade catalítica. Análises de TGA da blenda PSS/PEO 80:20 com a lipase de *Rhizopus oryzae* mostraram que o sistema é estável até a temperatura de 190 °C, considerando que não foi observada nenhuma perda de massa até esta temperatura<sup>85</sup>.

Arica *et al.*<sup>86</sup> prepararam membranas de poli(2-hidróxiethylmetacrilato-co-metacrilamido-fenilalanina (poli(HEMA-MAPA). Estas,

**Tabela 2.** Valores de percentagem de conversão (c,%) em ésteres obtidos com a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em blends de PSS/PEO<sup>85</sup>

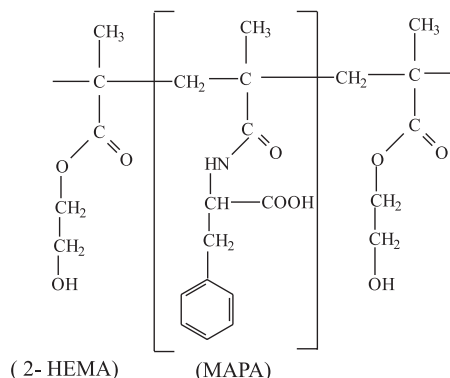
| PSS/PEO (% m/m) | Conversão (%) <sup>a</sup> |
|-----------------|----------------------------|
| 100:0           | 57                         |
| 98:2            | 85                         |
| 95:5            | 89                         |
| 90:10           | 96                         |
| 80:20           | 98                         |
| 70:30           | 98                         |
| 50:50           | 98                         |
| 40:60           | 98                         |
| 20:80           | 98                         |
| 0:100           | 98                         |

(a) obtida por RMN<sup>1</sup>H, [enzima]: 50 mg/g suporte, tempo de reação: 24 h, solvente: n-hexano, temperatura: 35 °C

**Tabela 3.** Influência de diferentes composições de membranas poli(HEMA/MAPA) na atividade da lipase de *Candida rugosa* na reação de hidrólise do óleo de oliva, a 35 °C. Reproduzida da ref. 86, com permissão da Elsevier

| Tipo de membrana  | Razão molar HEMA/MAPA | Densidade de fenilalanina (μmol g <sup>-1</sup> de membrana) | Quantidade de enzima adsorvida (μg cm <sup>-2</sup> ) | Atividade enzimática U cm <sup>-2</sup> de membrana | Retenção de atividade (%) |
|-------------------|-----------------------|--|---|---|---------------------------|
| Poli(HEMA/MAPA-1) | 77                    | 104  | 74  | 549   | 78                        |
| Poli(HEMA/MAPA-2) | 39                    | 208  | 103   | 815   | 83                        |
| Poli(HEMA/MAPA-3) | 26                    | 312  | 135   | 1040  | 81                        |

com diferentes proporções, foram obtidas pela fotopolimerização entre 2-hidróxiethyl metacrilato (HEMA) e 2-metacrilamido-fenilalanina (MAPA) na presença de α,α'-azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador. A incorporação do MAPA resultou em aumento da hidrofobicidade da membrana (Figura 4).



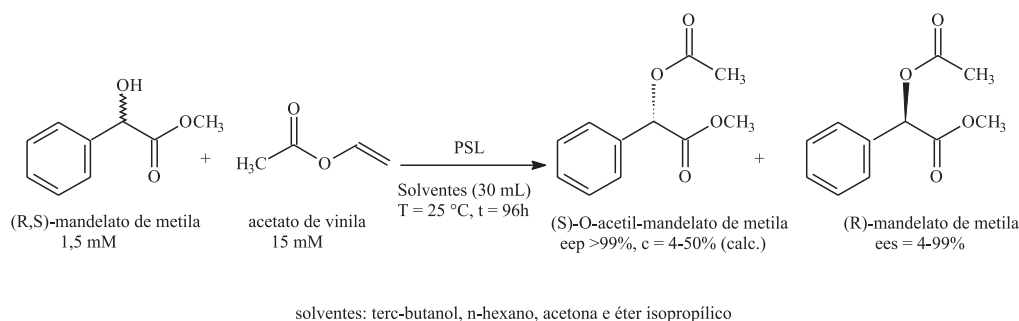
**Figura 4.** Estrutura da membrana poli(HEMA-MAPA). Reproduzida da ref. 86, com permissão da Elsevier

As membranas foram utilizadas para a imobilização da lipase de *Candida rugosa* e foi determinada a atividade na hidrólise do óleo de oliva. Foram analisados parâmetros como a concentração de grupos hidrofóbicos no suporte relacionado com a capacidade de adsorção da enzima, condições de adsorção em função do pH, temperatura e reutilização do sistema. O efeito da razão molar HEMA/MAPA na capacidade de imobilização e na atividade enzimática é mostrado na Tabela 3.

Com o aumento da densidade de fenilalanina, a capacidade de adsorção foi de 74 para 135 μg de lipase/cm<sup>2</sup> de membrana. O sistema com 312 μmol de fenilalanina/g de membrana de poli(HEMA/MAPA-3) apresentou uma densidade máxima de grupos hidrofóbicos e resultou em grande capacidade de adsorção, com pequena redução na atividade da enzima<sup>86</sup>.

Queiroz e Nascimento<sup>87</sup> imobilizaram a lipase de *Pseudomonas sp* (LPS) em dois polímeros, poli(óxido de etileno) (PEO) e em gel de ágar. Estes sistemas foram utilizados na resolução do *R,S*-mandelato de metila com acetato de vinila como agente acilante, em vários solventes orgânicos. O método foi bastante efetivo usando a lipase imobilizada em filme de PEO. O grau de conversão foi aproximadamente de 50% e ambos os enantiômeros foram obtidos com pureza óptica >99% (Esquema 4).

A lipase da *Chromobacterium viscosum* (LCV) foi imobilizada em organo-gel de gelatina formado com microemulsão água-óleo (MBGs)<sup>88</sup>, que é uma matriz predominantemente hidrofóbica. A atividade do derivado imobilizado determinada na reação de esterificação do ácido decanoico com n-octanol foi dependente da composição do organo-gel. As mudanças mais significativas foram ob-



**Esquema 4.** Acilação enzimática do R,S-mandelato de metila. Reproduzida da ref. 87, com permissão da Elsevier

servadas com a alteração dos valores de R ( $R=[H_2O] / [surfactante]$ ). Valores entre 60-80 foram os mais adequados, por apresentarem maior estabilidade física e atividade para a LCV. Os solventes utilizados para a formação do organo-gel e no meio reacional também influenciaram na atividade da enzima. Outros trabalhos na literatura utilizaram este sistema em reações biocatalisadas por lipases<sup>89-93</sup>.

O uso de agentes gelificantes naturais, como gelatina, agarose e k-carragenanas, tem sido testado para a formação de organo-gel de microemulsão, bem como hidrogéis (sem surfactante e óleo). Stamakis e Xanakis<sup>94</sup> utilizaram estes géis como matrizes para imobilização de lipases. A lipase da *Pseudomonas cepacia* manteve sua atividade catalítica quando confinada nestes sistemas, na esterificação do ácido láurico com propanol. Neste estudo, foram avaliados parâmetros como natureza e concentração do agente gelificante, concentração do biocatalisador e concentração do substrato, que influenciam a atividade catalítica. Foram obtidos rendimentos elevados para o laurato de propila (80%) com o organo-gel de agarose e k-carragenana. Os sistemas puderam ser reutilizados por cinco vezes e a atividade foi dependente do biopolímero utilizado na formação do organo-gel.

As microcápsulas podem também ser utilizadas para diversas finalidades, como imobilização por encapsulação de culturas de células, de agentes bioquímicos, e para a liberação controlada de fármacos e aromatizantes<sup>95</sup>. O procedimento mais comum utilizado para a encapsulação envolve a união de dois ou mais polímeros, em especial polissacarídeos, como alginatos e carragenanas que são encontrados em algas marinhas. Estes formam géis em contato com cloreto de cálcio e potássio e são muito utilizados para inclusão de proteínas<sup>96</sup>.

A quitosana, um biopolímero de elevada massa molecular usualmente preparado pela purificação e desacetilação da quitina, apresenta grande possibilidade de formar filmes, fibras e membranas de microcápsulas<sup>97</sup>. A associação da quitosana com alginato de cálcio leva à formação de cápsulas, que são utilizadas para encapsulação de enzimas<sup>77</sup>.

A lipase de *Rhizomucor miehei* foi imobilizada em cápsulas de quitosana/alginato/glutaraldeído<sup>98</sup> e utilizada na esterificação do ácido láurico com álcoois de C2 a C12. A presença de ramificações próximas ao centro nucleofílico do álcool também foi analisada. As conversões mais elevadas foram obtidas com álcoois lineares de C3 a C6 com conversões entre 84-90% e C8-C12 entre 23-50%. Com os álcoois ramificados terc-butanol, 1-metil-butanol não foi observada formação de produtos. Com o 3-metil-butanol, a conversão foi de 80%<sup>98</sup>.

O método de confinamento e microencapsulação de enzimas na catálise de diferentes reações tem sido mostrado por vários autores<sup>99-101</sup>.

## CONCLUSÕES

As lipases são biocatalisadores muito importantes que vêm sendo

utilizados para catalisar uma série de reações de grande valor sintético. A imobilização por adsorção, ligação covalente e/ou multifuncional, em matrizes poliméricas ou por encapsulação, apresenta-se como técnica importante para a utilização em meio orgânico e, muitas vezes, com aumento na atividade e estabilidade. Embora cada método apresente vantagens e desvantagens, a escolha da estratégia deverá considerar as relações entre suporte-enzima-substrato-solvente orgânico-água, para a manutenção das propriedades catalíticas e da estrutura tridimensional das lipases. Estes sistemas têm sido utilizados com sucesso para a síntese de lactonas, obtenção de monoglicérides, resolução de amins, ácidos e álcoois racêmicos, e na síntese de ésteres de cadeias curtas, médias e longas, e aromáticos.

Mesmo considerando como significativos os avanços científicos nesta área, novas metodologias para imobilização de lipases e de outros biocatalisadores e as possíveis aplicações em síntese orgânica ainda poderão ser mais exploradas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFSC, UNIVALI, à CAPES-PICDT (R. Dalla-Vecchia) e CNPq (M. G. Nascimento e V. Soldi) pelo apoio financeiro e à Amano e Novozymes, pela doação das lipases.

## REFERÊNCIAS

- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fundamentos de Bioquímica*, Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, cap. 4.
- Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag: Berlin, 1997.
- <http://www.pasteur.fr>, acessada em Agosto 2002.
- Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Science* **1984**, 224, 1249.
- Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, 82, 3192.
- Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.* **1988**, 17, 8017.
- Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 3194.
- Klibanov, A. M.; *Nature* **2001**, 409, 241.
- Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Hoss, M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 9, 113.
- Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigan, P.; Krieger, N.; Soccol, V. T.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, 29, 119.
- Salunkhe, M. M.; Nair, R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 10, 535.
- [www.novozymes.com/biotimes](http://www.novozymes.com/biotimes), acessada em Outubro 2003.
- Lima, A. W. O.; Angnes, L.; *Quim. Nova* **1999**, 22, 229.
- Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, 53, 315.
- Alvarez-Macarie, E.; Augier-Magro, V.; Guzzo, J.; Baratti, J.; *Biotechnol. Lett.* **1999**, 21, 313.
- Sarda, L.; Desnuelle, P.; *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, 30, 513.
- Castro, H. F.; Anderson, W. A.; *Quim. Nova* **1995**, 18, 544.
- Derewenda, U.; Swenson, L.; Wei, Y.; *J. Lipid Res.* **1994**, 35, 524.
- Schrag, J. D.; Li, Y.; Wu, S.; *Nature* **1991**, 351, 761.
- Schrag, J. D.; Cygler, M.; *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 575.
- Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; *Nature* **1990**, 343, 767.
- Derewenda, Z. S.; Derewenda, U.; Dodson, G. G.; *J. Biol. Chem.* **1993**, 227, 818.

23. Cleasby, A.; Garman, E.; Egmond, M. R.; *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 281.
24. Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J. D.; *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12843.
25. Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J. D.; *Protein Sci.* **1994**, *3*, 82.
26. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; *Structure* **1994**, *2*, 293.
27. Lang, D.; Hofmann, B.; Haalck, L.; *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 704.
28. Bourne, Y.; Martinez, C.; Kerfelec, B.; *Nature* **1994**, *338*, 709.
29. Winkler, F. K.; Gubernator, K.; *Lipases - their structure, biochemistry and application*, Cambridge University Press: Cambridge, 1994.
30. Wang, X.; Wang, C. S.; Tang, J.; *Structure* **1997**, *5*, 1209.
31. Ferrer, M.; Plou, F. J.; Nuero, O. M.; Reyes, F.; Ballesteros, A.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2000**, *75*, 569.
32. Mayordomo, I.; Rande, G. F.; Prieto, J. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 105.
33. Uppenberg, J.; Patkar, S.; Bergfors, T.; *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 790.
34. Jaeger, K. E.; Reetz, M. T.; *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 396.
35. Cygler, M.; Schrag, J. D.; *Methods Enzymol.* **1997**, *284*, 3.
36. Gandhi, N. N.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 621.
37. Soares, C. M.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77*, 745.
38. <http://www.cape.canterbury.ac.nz/Archive/IMMOB/immob.htm>, acessada em Agosto 2003.
39. Rocha, J. M. S.; Gil, M. H.; Garcia, F. A. P.; *J. Biotechnol.* **1998**, *66*, 61.
40. Lortie, R.; *Biotechnol. Adv.* **1997**, *15*, 1.
41. Basheer, S.; Mogi, K.; Nakajima, M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 187.
42. Carta, G.; Gainer, J. L.; Benton, A. H.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 1004.
43. Triantafyllou, A. O.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 406.
44. Halling, P. J.; *Tibtech.* **1989**, *7*, 50.
45. Dudal, Y.; Lortie, R.; *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 129.
46. Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 59.
47. Chowdary, G. V.; Prapulla, S. G.; *Process Biochem.* **2002**, *38*, 393.
48. Rejasse, B.; Mougard, T.; Legoy, D. M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 312.
49. Sivalingam, G.; Chattopadhyay, S.; Madras, G.; *Polym. Degrad. Stab.* **2003**, *79*, 413.
50. Yadav, G. D.; Latthi, P. S.; *Biochem. Eng. J.* **2003**, *3724*, 1.
51. Virto, C.; Svensson, I.; Adlercreutz, P.; *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *24*, 651.
52. Gulati, R.; Arya, P.; Malhotra, B.; Prasad, A. K.; Saxena, R. K.; Kumar, J.; Watterson, A. C.; Parmar, V. S.; *ARKIVOC* **2003**, *iii*, 159.
53. Affleck, R.; Haynes, C. A.; Clark, D. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 5167.
54. Affleck, R.; Xu, Z. F.; Suzawa, V.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 1100.
55. Gupta, M. N.; *Eur. J. Biol. Chem.* **1992**, *203*, 25.
56. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81.
57. Valivety, R. H.; Johnston, G. A.; Suckling, C. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 1137.
58. Brink, L. E. S.; Tramper, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, *27*, 1258.
59. Schneider, L. V.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 627.
60. Costa, V. E. U.; Amorim, H. L. N.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 863.
61. Ottosson, J.; Fransson, L.; King, J. W.; Hult, K.; *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1594*, 325.
62. Hazarika, S.; Goswami, P.; Dutta, N. N.; *Chem. Eng. J.* **2003**, *94*, 1.
63. Jesus, P. C.; João, J. J.; Silva, P. L. F.; Burlin, G.; Nascimento, M. G.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 664.
64. Yahya, A. R. M.; Anderson, W. A.; Moo-Young, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 438.
65. Gray, C. J.; Narang, J. S.; Barker, S. A.; *Enzyme Microb. Technol.* **1990**, *12*, 800.
66. Macrae, A. R.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983**, *60*, 291.
67. Balcão, V. M.; Paiva, A. L.; Malcata, F. X.; *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18*, 392.
68. Paiva, A. L.; Balcão, V. M.; Malcata, F. X.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 187.
69. Kogusi, Y.; Takahashi, K.; Lopez, C.; *J. Am. Oil Chem.* **1995**, *72*, 1281.
70. Montero, S.; Blanco, A.; Virto, M. D.; *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 239.
71. Basri, M.; Yunus, W. Md. Z. W.; Yoong, W. S.; Ampon, K.; Razak, C. N.; Salleh, A. B.; *J. Chem. Biotechnol.* **1996**, *66*, 169.
72. Bosley, J.; Peilow, A. D.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 107.
73. Maugard, T.; Legoy, M. D.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *8*, 275.
74. Abbas, H.; Comeau, L.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *1*, 6267.
75. Griffiths, M.; Bosley, J. A.; *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 109.
76. Rucka, M.; Turkiewicz, B.; Zuk, J. S.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 887.
77. Muzzarelli, R. A. A.; Baraontini, G.; Rocchetti, R.; *Biotechnol. Bioeng.* **1976**, *18*, 1445.
78. Guo, Z.; Bai, S.; Sun, Y.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 776.
79. Matsushima, A.; Kodera, Y.; Hiroto, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1996**, *2*, 1.
80. Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Fernandes-Lorete, G.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 201.
81. Kiliç, A.; Önal, S.; Telefoncu, A.; *Process Biochem.* **2002**, *38*, 641.
82. Tan, T.; Wang, F.; Zhang, H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *18*, 325.
83. Zacchigna, M.; Di Luca, G.; Lassiani, L.; Varnavas, A.; Boccù, E.; *Il Farmaco* **1998**, *53*, 758.
84. Amorim, R. V. S.; Melo, E. S.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; Ledingham, W. M.; Campos-Takaki, G. M.; *Bioresour. Technol.* **2003**, *89*, 35.
85. Vecchia, R. D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Resumos do IX International Macromolecular Colloquium*, Gramado, Brasil, 2001.
86. Arica, M. Y.; Kaçar, Y.; Ergene, A.; *Process Biochem.* **2001**, *36*, 847.
87. Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5225.
88. Jenta, T. R. J.; Batts, G.; Rees, G. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *53*, 121.
89. Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 335.
90. Rees, G. D.; Nascimento, M. G.; Tuan, R. J.; Robinson, B. H.; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1073*, 493.
91. Jesus, P. C.; Rezende, M. C.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *6*, 63.
92. Zhou, G. W.; Li, G. Z.; Xu, J.; Sheng, Q.; *Colloids Surf., B* **2001**, *194*, 41.
93. Hedström, G.; Backlund, S.; Eriksson, F.; *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *239*, 190.
94. Stamatis, H.; Xenakis, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 399.
95. Daly, M. M.; Knorr, D.; *Biotechnol. Prog.* **1988**, *4*, 76.
96. Hertzberg, S.; Kvittingen, L.; Anthosen, T.; *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 42.
97. Sandford, P. A.; Hutchings, G. P. Em *Industrial polysaccharides: genetic engineering structure/property relations and applications*; Yalpani, M., ed.; Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 363-376.
98. Vecchia, R. D.; Rebelo, A. M.; Rodrigues, C. A.; *Resumos da 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.
99. Betigeri, S. S.; Neau, S. H.; *Biomaterials* **2002**, *23*, 3627.
100. Karlsson, S.; Backlund, S.; Eriksson, F.; *Colloids Surf., B* **1998**, *10*, 137.
101. Lee, K. K. B.; Poppenborg, L. H.; Stuckey, D. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 253.