

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

TESE DE DOUTORADO

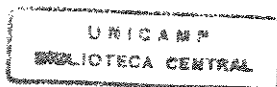
**Produção de Lipases e Sua Aplicação na
Eliminação de Resinas em Lignocelulósicos**

Candidata: Maria Silvania Marques Rodrigues ~

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Campinas

1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	7/Unicamp
R.618 p.	
V. E.	
TEMPO b.	30379
PROG.	281197
C ☐ D ☒	
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/05/97
N.º CPD	

CM-00098338-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

R618p

Rodrigues, Maria Silvânia Marques Rodrigues

Produção de lipases e sua aplicação na eliminação de resinas em lignocelulósicos / Maria Silvânia Marques Rodrigues. -- Campinas, [Sp : s.n.], 1997.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Madeira. 2. Enzimas. I. Durán Caballero, Nelson Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título

*A Deus, essa energia criadora,
infinitamente misericordiosa.*

*Ao meu marido Thales, e ao meu filho, Gabriel,
pelo amor, compreensão, paciência e apoio
durante esta fase da minha vida.*

Aos meus pais, Antônio e Escolástica, e aos meus irmãos: Silvia, Silvineide, Silvio Silvineire e Simone, por serem uma família maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nelson Durán Caballero não somente por seu dinamismo profissional, colaboração e apoio, mas por “estar sempre aberto ao novo”.

Ao Prof. José Luiz de Lima Filho, por sua Co-orientação, apoio e colaboração durante a minha estadia na UFPE.

Ao Prof. Miguel Cunha Filho da UFCe pelo carinho e incentivo desde a graduação.

Ao Prof. Edilberto Silveira da UFCe pela amizade, apoio e colaboração desde a Iniciação Científica.

Aos Professores Maria do Carmo de Barros Pimentel e Eduardo Henrique Magalhães Melo pelo apoio e colaboração.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, pelo inestimável carinho com que me receberam.

A todos os colegas da UNICAMP, em especial a Mariângela Fontes Santiago, pela amizade e apoio durante a minha estadia em Campinas.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a chegar aonde estou.

As instituições de suporte financeiro CAPES, FINEPE, JIKA e CNPq.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1.1. Substâncias Macromoleculares.....	7
1.1.2. Substâncias de Baixo Peso Molecular.....	9
1.1.3. Problemas Causados por “Pitch”.....	11
1.2. ENZIMAS.....	14
1.2.1. Lipases.....	16
1.2.1.1. Esterificação, Transesterificação e Acilação....	19
1.2.1.2. Esterificação.....	20
1.2.1.3. Transesterificação e Acilação.....	20
1.2.2. Fármacos.....	22
1.2.2.1. Síntese de Triglicerídeos Homogêneos A partir dos Ácidos EPP e DHA	24
1.2.2.2. Síntese do α - Naftil Trifluormetil Carbinol.....	25
1.2.2.3. Síntese do Cilazapril.....	25
1.2.2.4. Resolução Catalisada por Lipase de Hidantoínas Dissubstituídas.....	25

1.2.3. Detergentes.....	30
1.2.4. Indústria Papeleira.....	30
1.2.5. Efluentes.....	30
1.2.6. <i>Penicillium citrinum</i>	31
1.3. IMOBILIZAÇÃO.....	32
1.3.1. Imobilização de Lipases.....	38
1.3.2. Suportes Magnetizados.....	39
1.3.2.1. Dacron.....	40
1.4. RESINAS (“PITCH”).....	41
2. OBJETIVOS.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1. MATERIAIS.....	46
3.1.1. Reagentes.....	46
3.1.2. Equipamentos.....	46
3.1.1. Microrganismo.....	47
3.1.4. Rejeito / “Pitch” e Polpa.....	47
3.1.5. Enzimas.....	47
3.2. MÉTODOS.....	47
3.2.1. Meios de Cultura.....	47
3.2.1.1. Meio de Manutenção dos Fungos.....	47
3.2.1.2. Meio Líquido com Extrato de Leveduras.....	47
3.2.1.3. Meio Líquido com Sulfato de Amônio.....	48
3.2.2. Manutenção da Cultura e Produção do Inóculo.....	48
3.2.3. Condições de Cultivo.....	48
3.2.4. Extrato Parcialmente Purificado.....	49

3.2.5. Determinação da Atividade Enzimática.....	50
3.2.6. Determinação de Proteínas.....	51
3.2.7. Hidrazinólise do Polietilenotereftalato (Dacron).....	52
3.2.8. Eliminação de Partículas Pequenas (Fines).....	52
3.2.9. Magnetização.....	52
3.2.10. Conversão dos Grupamentos Hidrazida em Azida	53
3.2.11. Imobilização Covalente da Proteína.....	53
3.2.12. Efeito da Temperatura Sobre Atividade da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no EPP e DEI	54
3.2.13. Efeito da Estabilidade Térmica Sobre Atividade da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no EPP e DEI	54
3.2.14. pH Ótimo no EPP e DEI	54
3.2.15. Efeito da Concentração do Substrato Sobre Atividade da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no EPP e DEI	54
3.2.16. Efeito do Solvente Sobre Atividade da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no EPP e DEI	54
3.2.17. Reutilização do DEI	55
3.2.18. Armazenamento do EPP e DEI	55
3.2.19. Extração dos Ácidos Graxos Livres no Rejeito / “Pitch”.....	55
3.2.20. Método do Cobre.....	56
3.2.21. Hidrólise de Triglicerídeos.....	57
3.2.22. Cromatografia em Camada Fina (TLC).....	58
3.2.23. Análise dos Triglicerídeos.....	59
3.2.24. Efeito da Agitação sobre a Atividade Enzimática da Lipase de <i>Candida rugosa</i>	59
3.2.25. Identificação de Extrativos Lipofílicos e Hidrofílicos	59
3.2.26. Metilação de Ácidos Graxos.....	62
3.2.27. Cromatografia Gasosa Acoplada ao Massa.....	63
3.2.28. Polpas.....	64

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
4.1. RESULTADOS E DISCUSSÕES DE ENZIMAS.....	65
4.1.1. Produção.....	65
4.1.2. Concentração de Proteínas e Armazenamento.....	68
4.1.3. Propriedades do Extrato Parcialmente Purificado (EPP) do MSA da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i>	71
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES DE IMOBILIZAÇÃO.....	73
4.2.1. Características do Dacron Magnetizado.....	73
4.2.2. Imobilização.....	75
4.2.3. Algumas Propriedades Cinéticas da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no Extrato Parcialmente Purificado (EPP) e no Derivado Enzimático Imobilizado (DEI).....	76
4.2.3.1. Temperatura Ótima e Estabilidade Térmica.....	76
4.2.3.2. Efeito do pH sobre o DEI.....	80
4.2.3.3. Efeito da Concentração do Substrato e do Solvente sobre a Atividade da Enzima Solúvel e Imobilizada.....	81
4.2.3.4. Reutilização e Armazenamento.....	90
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES DE RESINAS.....	93
4.3.1. Estudo sobre "Pitch".....	93
4.3.1.1. Ácidos Graxos Livres.....	93
4.3.1.2. Hidrólise de Triglicerídeos.....	98
4.3.2. Extrativos Hidrofílicos e Lipofílicos.....	101
4.3.2.1. Espectros de Infravermelho.....	101
4.3.2.2. Cromatografia Gasosa.....	104
4.3.3. Polpas.....	107

5. CONCLUSÕES.....	108
6. PERSPECTIVAS.....	112
7. BIBLIOGRAFIA.....	113
APÊNDICES.....	121
APÊNDICE I - Espectros de Infravermelho Obtidos a Partir dos Extrativos Hidrofílicos e Lipofílicos Provenientes das Amostras de Rejeito / “Pitch”. Condições Experimentais Vide 3.2.21 e 3.2.25...	122
APÊNDICE II - Espectros de Infravermelho Obtidos a Partir do Padrão Ácido Oleico, das Amostras de Rejeito / “ Pitch “ Lavadas Com Diferentes Concentrações de NaOH (0,1; 0,5 e 2,0 N) e do Filtrado Após Lavagem Com NaOH 0,1 N. Condições Experimentais Vide 3.2.21 e 3.2.25.....	129
APÊNDICE III - Espectros De Infravermelho Obtidos Das Amostras De Rejeito / “ Pitch “ Submetidas A Uma Extração Seletiva Com Solventes . Condições Experimentais Vide 3.2.21e 3.2.25.....	135
APÊNDICE IV - Espectros de Infravermelho das Amostras de Rejeito / “ Pitch “ Submetidas à Reação Enzimática Com a Lipase de <i>Candida Rugosa</i> . Condições Experimentais Vide 3.2.26.....	141
APÊNDICE V - Cromatograma Com Seus Respective Espectros de Massa Obtido da Amostra de Rejeito / “ Pitch “ Submetida a Lavagem Com NaOH 0,1 N. Condições Experimentais Vide 3.2.27 e 3.2.28.....	148

APÊNDICE VI - Cromatograma Com Seus Respectivos Espectros de Massa Obtido da Amostra de Rejeito / “ Pitch “ Submetida a Lavagem Com NaOH 0,1 N. Condições Experimentais Vide 3.2.27 e 3.2.28..... 155

APÊNDICE VII - Cromatograma Com Seus Respectivos Espectros de Massa Obtido da Amostra de Rejeito / “ Pitch “ Submetida a Extração com Diclorometano. Condições Experimentais Vide 3.2.21 e 3.2.25..... 162

APÊNDICE VIII - Cromatograma Com Seus Respectivos Espectros de Massa Obtido da Amostra de Rejeito / “ Pitch “ Submetida a Reação Enzimática (1 H , 45 °c) Com a Lipase de *Candida Rugosa*. Condições Experimentais Vide 3.2.27 e 3.2.28..... 171

APÊNDICE IX - Cromatograma Com Seus Respectivos Espectros de Massa Obtido da Amostra Padrão de Ácido Oleico. Condições Experimentais Vide 3.2.27 e 3.2.28..... 178

ABREVIATURAS

Ácido Eicosapentaenóico - **EPA**

Ácido Docosaheptaenóico - **DHA**

Ácido Oleico - **AO**

Batata, Dextrose e Ágar - **BDA**

Cromatografia em Camada Fina - **TLC**

Derivado Enzimático Imobilizado - **DEI**

Extrato Parcialmente Purificado - **EPP**

Meio Líquido com Extrato de Leveduras - **MEL**

Meio Líquido com Sulfato de Amônio - **MSA**

p - Nitrofenilpalmitato - **pNPP**

p - Nitrofenol - **pNP**

Triglicerídeos - **TG**

Trioleína - **TA**

LISTA DE TABELAS

TABELA I	- Classificação das Fibras.....	2
TABELA II	- Composição das Coníferas e Folhosas.....	3
TABELA III	- Alguns Suportes Utilizados em Imobilização de Enzimas.....	35
TABELA IV	- Resíduos Reativos das Proteínas.....	36
TABELA V	- Alguns Grupamentos Reativos do Suporte que Podem Reagir Diretamente com a Enzima.....	37
TABELA VI	- Atividade Específica da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no MSA e MEL	66
TABELA VII	- Atividade Específica do MSA após Purificação Parcial com Sulfato de Amônio e com Membranas de Ultrafiltros.....	69
TABELA VIII	- Atividade Relativa do Extrato Parcialmente Purificado (EPP) e do Filtrado após Purificação com Ultrafiltros.....	70
TABELA IX	- Armazenamento da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no Extrato Parcialmente Purificado EPP à 6 °C.....	70
TABELA X	- Dados da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no EPP e DEI	76
TABELA XI	- Variação da Concentração do pNPP na Solução A usada no Método PNPP.....	85
TABELA XII	- Variação dos Componentes das Soluções A e B usadas no Método pNPP.....	89
TABELA XIII	- Ácidos Graxos Livres Após Extração com Acetona.....	95
TABELA XIV	- Razão Obtida A partir das Análises das Áreas dos Cromatogramas (HPLC) provenientes dos Produtos Formados Após Ensaio com Amostras Rejeito/ "Pitch".....	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Tipos de Células.....	5
FIGURA 2 - Planos de Orientação da Madeira.....	6
FIGURA 3 - Estrutura da Parede Celular.....	8
FIGURA 4 - Estrutura Básica de Alguns Terpenos.....	12
FIGURA 5 - Estruturas de Alguns Compostos Presentes nos Extrativos.....	13
FIGURA 6 - Reações Catalisadas pelas Lipases.....	18
FIGURA 7 - Esterificação Enantioseletiva do Butano-2,3-diol Catalisada por Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ...	21
FIGURA 8 - Síntese para Obtenção do (1R, 2S) - 3 A partir do Diol (1RS, 2SR) - 1	22
FIGURA 9 - Síntese de Triglicerídeos Homogêneos A partir dos Ácidos Eicosapentaenóico e Docasahexaenóico...	26
FIGURA 10 - Síntese do α -Naftil Trifluórmethyl Carbinol.....	27
FIGURA 11 - Síntese do Cilazapril.....	28
FIGURA 12 - Resolução Catalisada por Lipase de Hidantoínas Dissubstituídas.....	29
FIGURA 13 - Esquema para Obtenção do EPP Utilizando-se de Membranas de Ultrafiltros da Millipore.....	49
FIGURA 14 - Fluxograma de Extração dos Ácidos Graxos.....	57
FIGURA 15 - Fluxograma de Extrativos Hidrofílicos e Lipofílicos a partir de amostras Rejeito / "Pitch".....	61
FIGURA 16 - Extração do "Pitch" na Polpa de Eucalyptus.....	64
FIGURA 17 - Morfologia do <i>Penicillium citrinum</i> Após Fermentação....	67
FIGURA 18 - Curva de pH da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no EPP	72
FIGURA 19 - Esquema de Ativação do Dacron-Hidrazida Magnetizado nas formas Azidas (A) e Hidrazona (B) e Possíveis Ligações destes Derivados com a Proteína Imobilizada.....	74

FIGURA 20 - Temperatura Ótima do Extrato Parcialmente Purificado (EPP) e do Derivado Imobilizado (DEI).....	78
FIGURA 21 - Estabilidade Térmica do Extrato Parcialmente Purificado (EPP) e do Derivado Enzimático Imobilizado (DEI).....	79
FIGURA 22 - Curva de pH da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no DEI	81
FIGURA 23 - Efeito da Concentração do pNPP sobre a Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no EPP (Solúvel).....	83
FIGURA 24 - Efeito da Concentração do pNPP sobre a Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no DEI (Imobilizada).....	84
FIGURA 25 - Efeito do Isopropanol sobre a Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no EPP (Solúvel).....	86
FIGURA 26 - Efeito do Isopropanol sobre a Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no DEI (Imobilizada).....	87
FIGURA 27 - Reutilização e Armazenamento da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no DEI	91
FIGURA 28 - Armazenamento da Lipase do <i>Penicillium citrinum</i> no DEI	92
FIGURA 29 - Efeito da Agitação sobre a Atividade da Lipase de <i>Candida rugosa</i>	96
FIGURA 30 - Cromatograma (TLC) dos Ácidos Graxos Livres Após Extração com Acetona.....	97
FIGURA 31 - Áreas Relativas Obtidas através das Análises dos Cromatogramas (HPLC) provenientes da Reação Enzimática de Rejeito / "Pitch com <i>Candida rugosa</i> às Temperaturas de 30 °C e 45 °C nos Tempos 0; 1; 6 e 12 horas.....	99

RESUMO

Lipases produzidas a partir do *Penicillium citrinum* no Meio de Extrato de Levedura (**MEL**) e no Meio de Sulfato de Amônio (**MSA**), mantiveram temperatura ótima de 37 °C e pH entre 8,0 - 8,5, sendo que seus pH's no máximo de produção da atividade lipolítica extracelular ficou em torno de 2,2 - 3,0 (meio **MSA**), e 6,5 - 7,8 (meio **MEL**). Observou-se que ao manter-se a lipase no extrato parcialmente purificado a 6°C, não ocorreu alterações na sua atividade lipolítica após 60 dias armazenada. Através de uma hidrazinólise, transformou-se o polietilenotereftalato (dacron) da forma em filme para pó, obtendo-se dacron-hidrazida magnetizado com sucesso a partir de reações entre os íons férricos e ferrosos em pH alcalino. Lipases do *Penicillium citrinum* produzidas no meio **MSA** foram fixadas a esse suporte, dacron-hidrazida magnetizado.

Os resultados mostraram que 19 mg do Extrato Parcialmente Purificado (**EPP**) foram imobilizados por grama de suporte após 3 horas de incubação, mostrando uma atividade específica em torno de 73% da enzima solúvel. A enzima imobilizada também manteve sua temperatura ótima em 37 °C e pH em torno de 8,5. Entretanto mostrou-se mais termoestável do que a enzima solúvel, permanecendo com 60 % de sua atividade enzimática após incubada por 1 hora à 50°C. Usando p-nitrofenilpalmitato (**pNPP**) como substrato (37 °C, pH 7,2), a enzima solúvel e imobilizada apresentou uma cinética segundo Michaelis-Menten. A lipase solúvel mostrou um Km aparente de 235 µM e Vmáx 0,99 UI/mg de proteína, enquanto a lipase imobilizada mostrou um Km de 281 µM e Vmáx 0,56 UI/mg de proteína.

Após extração com acetona, o "pitch", líquido viscoso e marrom, presente no rejeito, ficou em torno de 9%. Todos os ensaios com polpas apresentaram ácidos graxos. Entretanto, quando adicionou-se lipase, houve um aumento significativo dos ácidos graxos totais, indicando um valor de ácidos totais de 0,357 µg de ácidos graxos livres pela hidrólise enzimática. Espectros de infravermelho dos extrativos hidrofílicos e lipofílicos presentes no "pitch", indicaram que lavagens preliminares das polpas, sob agitação, principalmente com água, liberam substâncias que poderiam se acumular nos equipamentos. Como também, que não há diferenças significativas na eliminação dos ácidos graxos livres quando as polpas são lavadas com concentrações diferenciadas de NaOH. Resultados obtidos a partir dos dados GC-MS indicam que a maioria dos compostos presentes no "pitch" em estudo são hidrocarbonetos de cadeias longas e ácidos monosaturados.

ABSTRACT

Lipases produced from *Penicillium citrinum* in the Yeast Extract Medium **MEL** and Ammonium Sulfate Medium **MSA** have maintained an optimum temperature of 30 °C and pH between 8,0 - 8,5. Their pH's were around 2,2 - 3,0 (**MSA** medium), and 6,5 - 7,8 (**MEL** medium) in the maximum production of extracellular lipolytic activity. It was observed that, maintaining the lipase in the extract partially purified at 6 °C, no alterations happened in its lipolytic activity after 60 days of storage. Polyethileneterephtalate (dacron) was transformed through hydrazinolysis, from its film its form into powder. Dacron - Hydrazide magnetized was obtained successfully from reactions between ferric and ferrous ions in alkaline pH. The *Penicillium citrinum* lipases produced in **MSA** medium were fixed to this support, dacron - hydrazide magnetized.

The results shown that 19 mg semipurified extract (**EPP**) were immobilized per gramme of the support after 3 - hour incubation, showing a specific activity around 73 % of the soluble enzyme. The immobilized enzyme also maintained its optimum temperature at 37 °C and optimum pH at 8,5. However, it showed itself more thermostable than the soluble enzyme, keeping 60 % of its enzymatic activity after being incubed for 1 hour at 50 °C. Using p-nitrophenylpalmitate (**pNPP**) as substrate (37 °C, pH 7,2), the soluble and immobilized enzyme showed a Michaelis - Menten behaviour. The soluble lipase showed an apparent Km of 235 µM and Vmáx 0,991 IU/mg of protein, while the immobilized lipase showed a Km of 281 µM and Vmáx 0,56 IU/mg of protein.

After extraction with acetone, the "pitch", a viscous and brown liquid, present in the reject, was around 9 %. All tests with pulps showed free fatty acids. However, when lipase added, there was a significant increase of total fatty acids, indicating a value of 0,357 µM of free fatty acids through enzymatic hydrolysis. Infrared spectrum from hidrophilic and lipophilic extractives present in the "pitch", have indicated that preliminary pulp washes, under agitation, liberate substances which could accumulate in the equipments. Also, there are no significant differences in the elimination of free fatty acids, when the pulps are washed with different concentrations of NaOH. Results obtained from the GC data have indicated that the majority of the compounds present in the "pitch" in study, are hydrocarbons of long chains and monosaturated acids.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS (IPT, 1988; Fengel e Wegener, 1984; Sidaway, 1988; Bamber, 1985; Barreto e col., 1993)

No geral, as fibras utilizadas para a fabricação de pastas celulósicas e papel (**TABELA I**) provêm principalmente do tronco das árvores (parte lenhosa), das folhas e dos frutos, podendo ser usadas isoladamente ou em conjunto com as de origem vegetal, mineral, animal e sintética.

Embora as fibras de vegetais não lenhosos constituam somente 5% do total das fibras usadas para a fabricação do papel, estas representam uma das maiores fontes atuais e potenciais de fibras para muitos países em desenvolvimento e industrializados, destacando-se as fibras de bambu, bagaço de cana, juta, sisal, palhas de cereais (trigo, aveia, centeio, cevada, arroz e milho) e tronco da bananeira.

As madeiras podem ser classificadas em dois grandes grupos: madeiras duras (*hardwood*) e madeiras moles (*softwood*). As madeiras duras são provenientes de árvores do grupo das folhosas (*Angiospermae*) e, as moles, árvores do tipo das coníferas (*Gymnospermae*). O teor, a proporção e às vezes a composição química dos diferentes componentes da madeira, variam segundo a espécie vegetal, idade, local e do tipo de amostragem (**TABELA II**).

TABELA I - Classificação das Fibras (IPT, 1988)

FIBRA	QUANTO À ORIGEM	EXEMPLOS
VEGETAL: • FIBRAS DO FRUTO • FIBRAS DO CAULE	_____ Fibras de Madeira: ⇒ Coníferas ⇒ Folhosas Fibras Liberianas ou Floemáticas Feixes Vasculares de Monocotiledôneas	Algodão Pinus, Cedro, Cipreste Eucalyptus, Bétula e Nogueira Linho, Juta
• FIBRAS DA FOLHA	_____	Palha de cereais, Bambu, Bagaço de cana Sisal
ANIMAL	_____	Lã e Seda
SINTÉTICA	_____	Celulose regenerada, Poliéster e Poliamida

TABELA II - Composição das Coníferas e Folhosas (IPT, 1988)

COMPONENTES	CONÍFERAS (%)	FOLHOSAS (%)
CELULOSE	40 - 45	40 - 45
HEMICELULOSE	20 - 30	20 - 40
LIGNINA	25 - 35	15 - 25
EXTRATIVOS	2 - 10	1 - 5
MINERAIS	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0

A observação de suas características macroscópicas não só indicam diferenças entre softwoods e hardwoods, condições de crescimento e propriedades físicas, como também diferenças dentro de uma mesma espécie ou de uma mesma amostragem. Ou seja, como o tecido da madeira foi construído levando em consideração as necessidades naturais da árvore e, como as células dispostas nesse tecido podem ser classificadas. No geral, as células da madeira são responsáveis pela condução de água, suporte mecânico e armazenamento de alimentos (**FIGURA 1**). Seus arranjos podem ser reconhecidos em relação aos três principais planos que caracterizam a madeira: plano transversal, plano tangencial e plano radial (**FIGURA 2**).

Os elementos condutores de água, vasos, são compostos por células individuais interligadas umas as outras pelas extremidades (Elementos de Vasos), e sobrepostas umas sobre as outras. Na superfície de algumas madeiras, os vasos são claramente visíveis a olho nú como pequenos buracos ou POROS.

As células responsáveis pelo suporte mecânico da árvore são as fibras. As fibras são células que não possuem aberturas ou poros, são axialmente alongadas, com pequenos diâmetros que fecham-se nas extremidades, tornando-se pontiagudas.

As células parenquimáticas (**FIGURA 1**) são células curtas e compactas com extremidades grossas. São agrupadas horizontalmente na direção radial e estão relacionadas com o armazenamento e a distribuição dos carboidratos. Estão localizadas no plano transversal, sendo o número de células parenquimáticas nas madeiras duras maior do que nas madeiras moles.

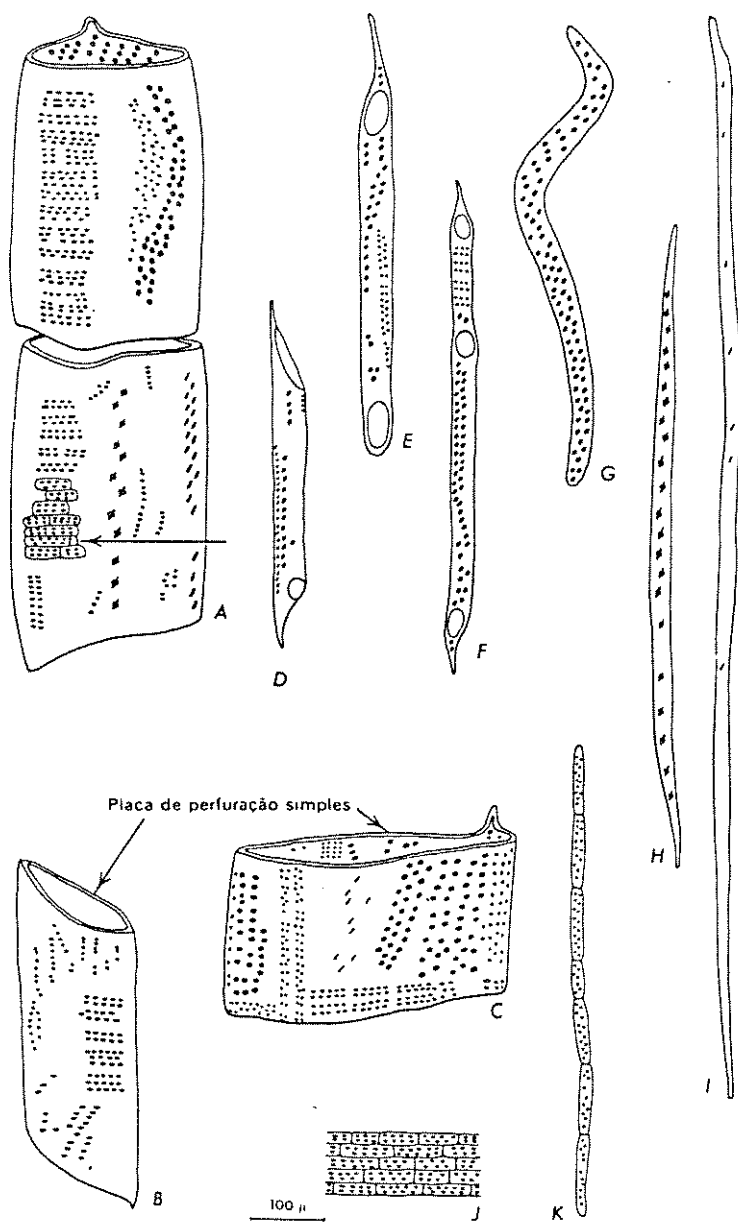


FIGURA 1 - Tipos de Células (Esau, 1974)

A - C - elementos de vaso amplo; **D - F** - elementos de vaso estreito;
G - traqueídeo; **H** - fibrotraqueídeo; **I** - fibra libriforme; **J** - célula
 parenquimática do raio; **K** - feixe parenquimático axial.

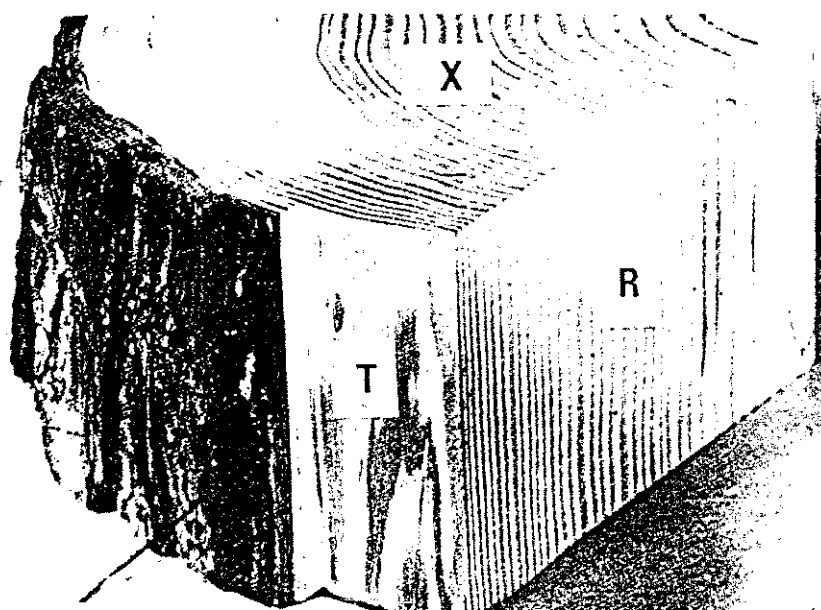


FIGURA 2 - Planos de Orientação da Madeira (IPT, 1988)

X - Plano Transversal

R - Plano Radial

T - Plano Tangencial

1.1.1. SUBSTÂNCIAS MACROMOLECULARES (Fengel e Wegener, 1984; Hoga, 1988; Esau, 1965)

Os materiais lignocelulósicos são compostos basicamente por celulose, hemicelulose, lignina (que estão presentes em todos os tipos de madeira) e pequenas quantidades de extrativos e sais minerais (que podem ou não estar presentes dependendo do tipo de madeira), apresentando-se como um material complexo.

I. Celulose

É um polímero linear formado exclusivamente por cadeias de moléculas de glicose unidas através de ligações β - 1,4 - glicosídicas, ou seja, é constituído por um único tipo de açúcar. Estas cadeias são agrupadas em feixes, formando micelas (**FIGURA 3**). A celulose contida na parede celular apresenta regiões cristalinas e amorfas que dependem do acesso de moléculas de água aos grupos hidroxílicos da celulose. Por suas propriedades físicas e químicas, assim como por sua estrutura, pode ser considerada como o principal componente estrutural da parede celular das fibras.

II. Hemicelulose

É um polímero ramificado não celulósico de baixo peso molecular quando comparado à celulose. Seus principais constituintes são os açúcares glicose, manose, galactose (hexose), xilose e arabinose (pentose), podendo também apresentar quantidades de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira.

III. Lignina

A lignina é uma macromolécula de composição química complexa, que confere firmeza e rigidez ao conjunto de fibras da celulose. Na parede celular, a lignina está associada à hemicelulose através de interações físicas e ligações covalentes formando uma matriz ou complexo polissacarídeo-lignina. Junto com a celulose, contribui com a maior proporção pela variabilidade das propriedades da madeira.

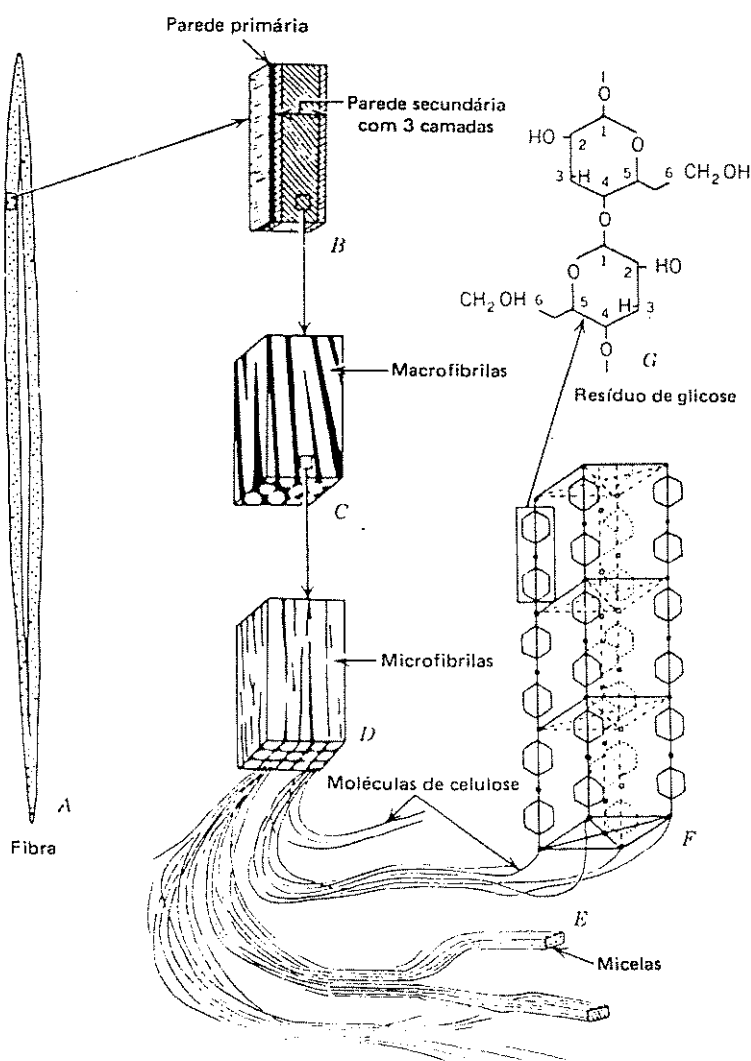


FIGURA 3 - Estrutura da Parede Celular (Esau, 1965)

1.1.2. SUBSTÂNCIAS DE BAIXO PESO MOLECULAR (Fengel e Wegener, 1984; IPT, 1988; Kantelinem e col., 1995; Fischer e Messner, 1992a; 1992b; Fischer e col., 1993).

Os constituintes menores incluem compostos orgânicos de diversas funções químicas e, em menor quantidade, de compostos inorgânicos. Uma parte dessas substâncias são denominadas de resinas, um termo que não caracteriza certos compostos químicos mas uma condição física. A resina se caracteriza por ser uma mistura de diferentes compostos que mutuamente inibem a cristalização. Numa definição rigorosa, extrativos são compostos que são solúveis em solventes orgânicos. Entretanto, carboidratos e compostos inorgânicos solúveis em água também podem pertencer a classe de substâncias extraíveis. Os terpenos, flavonóides e outros aromáticos, podem ser classificados como resina.

Esses constituintes não residem na parede celular, dividindo-se basicamente em duas classes: os extrativos , extraíveis com água e solventes orgânicos, e os não extrativos , compostos inorgânicos, proteínas e substâncias pécticas.

I. Extrativos

Mesmo representando uma pequena fração da madeira, os extrativos apresentam uma grande variedade de compostos químicos. O isolamento desses extrativos pode ser feito por extração com diferentes solventes tais como éter, acetona, benzeno, diclorometano, etanol, etc. Os ácidos graxos, ácidos resinosos, graxas, taninos e corantes, são as substâncias extraíveis mais importantes pelos solventes. O índice e a composição desses extrativos variam entre espécies de madeira, localização geográfica e com as estações do ano. Algumas madeiras contêm substâncias extraíveis tóxicas para bactérias, fungos e cupins. Outras, dão cor e odor as madeiras.

Os extrativos podem ser divididos em várias classes de compostos, dependendo das suas características estruturais. Terpenos, ligninas, flavonóides, gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides e hidrocarbonetos, entre outros, podem estar presentes nesses extrativos (**FIGURAS 4 e 5**).

Os principais componentes da madeira solúveis em água são os carboidratos, proteínas e sais inorgânicos. As técnicas convencionais para isolamento, determinação e identificação desses extrativos são cristalização, destilação fracionada, saponificação, métodos espectoscópicos (UV, IR) e métodos cromatográficos. Métodos mais modernos como Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Gasosa com detector de Massa (CG-MS), estão cada vez mais se tornando necessários para separação e identificação desses extrativos.

Grandes quantidades de extrativos são encontrados em certas madeiras tropicais e subtropicais. Os extrativos estão concentrados principalmente nas células parenquimáticas, embora possam ser encontrados nas fibras. O índice e a composição dos extrativos variam dependendo da espécie da madeira, idade da planta e localização geográfica.

II. Não-Extrativos

Os não-extrativos dividem-se em compostos inorgânicos e substâncias pécticas.

Os compostos inorgânicos encontrados na madeira são sulfatos, fosfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio. A maioria estão combinadas com substâncias orgânicas, que por exercerem funções fisiológicas, exercem um papel importante no metabolismo da planta.

As substâncias pécticas são polímeros de ácido galacturônico não extraíveis em solventes orgânicos neutros.

1.1.3. PROBLEMAS CAUSADOS POR RESINAS (“PITCH”)

As resinas, que normalmente são uma mistura de ácidos resinosos, ácidos graxos livres e combinados, compostos insaponificáveis e componentes apolares, quando dispersas em água tendem a causar problemas de “pitch” (Vide item **1.4**).

O “pitch” pode se acumular em partes críticas dos equipamentos da indústria papaleira, causando manchas e buracos na folha, o que prejudica seriamente a qualidade do papel, como também pode agravar problemas ambientais causados pelos efluentes liberados pela indústria papaleira.

Isolar, identificar e tentar compreender a formação desses compostos presentes no “pitch”, assim como buscar métodos biotecnológicos (enzimáticos) que minimizem os problemas causados pelo mesmo, justificam a elaboração do presente trabalho.

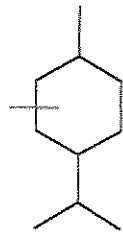
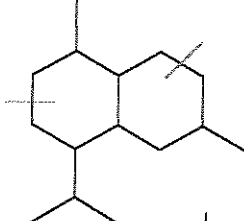
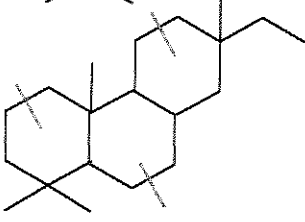
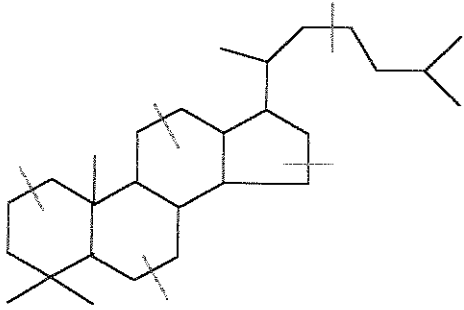
NOME	NÚMERO DE 5C-UNIDADES	ESTRUTURA
Isopreno (unidade básica)	1 x 5C	
Monoterpenos	2 x 5C	
Sesquiterpenos	3 x 5C	
Diterpenos	4 x 5C	
Triterpenos	6 x 5C	

FIGURA 4 - Estruturas Básicas de Alguns Terpeno

($\rightarrow$) indica a repetição da unidade do isopreno

(Fengel e Wegener, 1984)

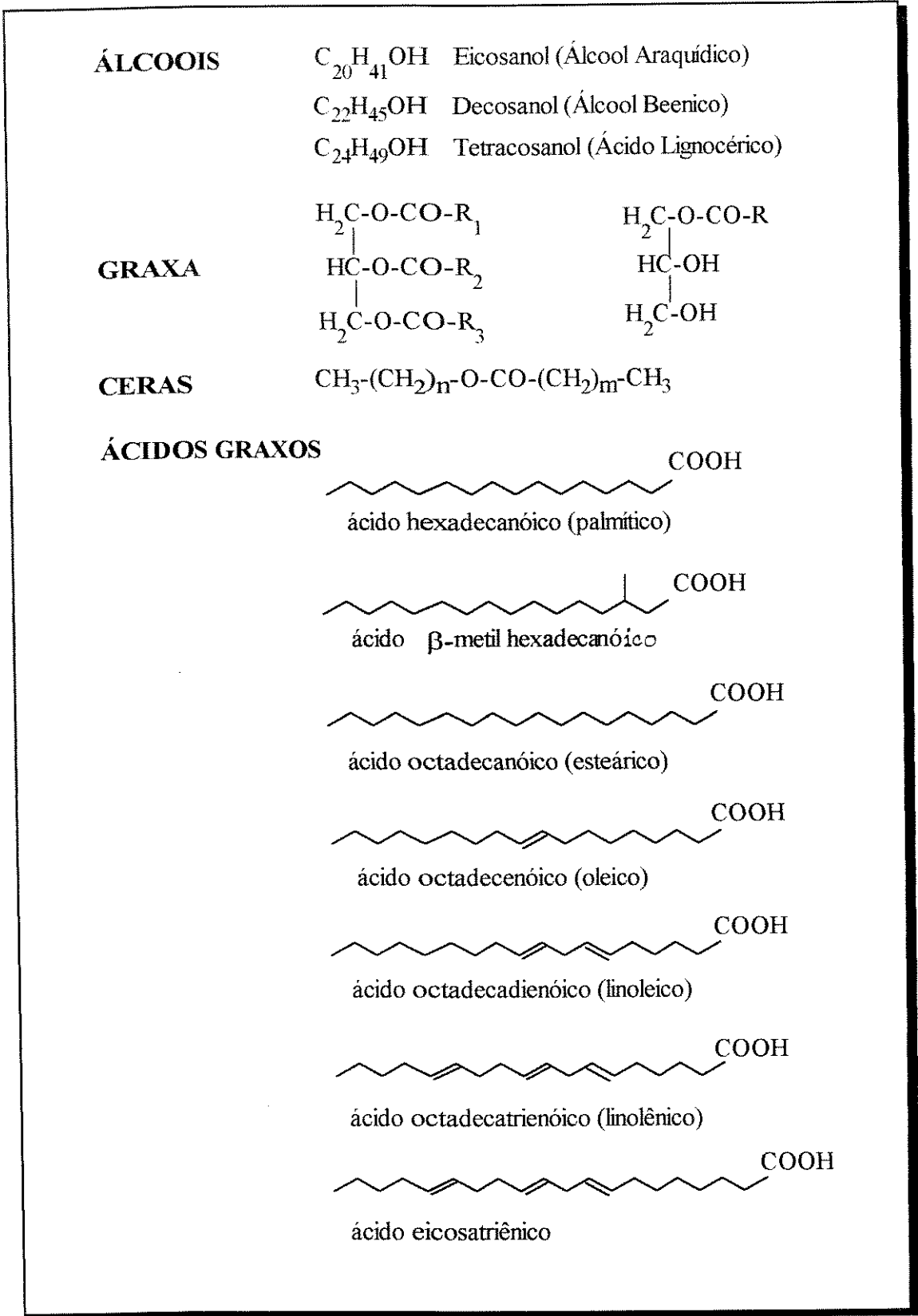


FIGURA 5 - Estruturas de Alguns Compostos Presentes nos Extrativos
(Fengel e Wegener, 1984)

1.2. ENZIMAS

Os maiores eventos bioquímicos ocorrem em organismos governados por enzimas (Faber, 1992), com todos os processos químicos requerendo energia obtida a partir de reações químicas realizadas dentro da célula. Enzimas são proteínas complexas, produzidas por células vivas que comandam reações químicas nos processos metabólicos. Uma vez sintetizada por alguma célula, a enzima poderá atuar independentemente, se condições ideais forem mantidas (Santiago, 1993). Como a maioria são altamente seletivas frente a quiralidade de um substrato, elas atuam sobre um número limitado de compostos, podendo não ter efeito nenhum sobre outros.

Reações catalisadas por enzimas ocorrem sob condições brandas, geralmente à temperatura ambiente, pressão atmosférica (1 atm), próximas a pH neutros e são processadas no sítio ativo da enzima (Dugas, 1989). A conformação e a composição desse sítio, determinam a especificidade da catálise enzimática (Rawn, 1989).

As reações enzimáticas obedecem os mesmos princípios de qualquer reação química, ou seja, os substratos (reagentes) devem colidir, a colisão molecular deve ocorrer com uma orientação correta e os substratos devem ter suficientemente energia (energia de ativação) (Rawn, 1989; Voet e Voet, 1995). A enzima baixa a energia de ativação, devido a formação do complexo enzima-substrato que é mais estável do que ambos isoladamente. Essa estabilidade é devida as forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações iônicas que ocorrem entre a enzima e o substrato (Voet e Voet, 1995).

Muitas enzimas podem catalisar transformações com alta regio e quimioseletividade sob condições moderadas de reação (Patel e col., 1995). Essa poderosa combinação é amplamente usada em sínteses

orgânicas, sendo especialmente importante na modificação de drogas quirais. Uma de suas principais características é a habilidade para discriminar entre enantiômeros de substratos racêmicos. Outra grande vantagem das enzimas com alta seletividade enantiomérica é a sua capacidade de produzir os dois enantiômeros de uma droga quiral. Essa característica é de extrema importância durante os estágios iniciais de um fármaco, quando ambos enantiômeros são necessários para testes comparativos. O enantiômero indesejado poderá ser racemizado, invertido ou outras sínteses assimétricas poderão ser abordadas.

Contudo, uma das formas de se aumentar o rendimento de compostos opticamente puros é o uso de substratos pró-quirais por catálise enzimática (Ebüke e Achiwa, 1994). Dessa forma substratos aquirais poderão ser totalmente convertidos em substratos quirais desejados.

Caso a enantioseletividade de uma enzima seja insuficiente para que ocorra um processo sintético, pode-se aumentá-la com o uso de técnicas como a introdução de aditivos (Triton x-100 ou Dextrometorfano), alterar as condições de reação (solventes, temperatura, pH, etc.) ou mudar o substrato pela introdução de grupos que podem ser facilmente removidos ou substituídos após a síntese (Colton e col., 1995; Hansen e col., 1995).

A técnica enzimática torna possível a preparação de antibióticos sem uso de grupos protetores caros, assim como substituir por uma única etapa, várias etapas de proteção e desproteção pelo método químico.

Mesmo não sendo economicamente favoráveis, muitas reações enzimáticas foram desenvolvidas com sucesso para processos industriais (Bezborodov, 1995), porque podem atuar em baixas concentrações, altas velocidades de reação ($10^3 - 10^6$) (Okahata e col., 1995), não são

tóxicas e produzem resíduos (biomassa) biodegradáveis, que não causam problemas ambientais (Margolin, 1993).

As enzimas de aplicação industrial são obtidas de vegetais, animais e microrganismos. As enzimas provenientes de vegetais requerem o cultivo de um número grande de plantas para uma pequena produção. As de origem animal são produzidas a partir de subprodutos de indústrias cárneas, que em virtude das condições desses subprodutos, possui suprimento limitado. As enzimas microbianas são produzidas através da fermentação de microrganismos em grande escala, o que as tornam mais viáveis a nível industrial (Santiago, 1993).

O uso de enzimas na tecnologia da produção de celulose e papel era insignificante até o final da década de 80. A partir de então, várias utilizações começaram a ser sugeridas na literatura especializada, em geral, voltadas para minimização dos impactos ambientais (Durán e col., 1995). As enzimas mais utilizadas nas indústrias papeleiras são as celulasas, ligninases e lipases, pois conduzem a uma considerável melhoria na produtividade, qualidade do papel final e nas técnicas usadas para tratamentos de efluentes (Björkling e col., 1991; Ratto e col., 1993).

1.2.1. LIPASES

As lipases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) são produzidas por microrganismos procedentes do solo e resíduos oleosos (Sztajer e Maliszewska, 1988). Embora produzidas por células animais, vegetais e por vários microrganismos, os fungos têm sido a principal fonte de lipases. Entre os gêneros produtores de lipase encontram-se os fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Pycnopus*, etc), as leveduras (*Candida*, *Brettanomyces*, *Kloeckera*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, etc.) e as bactérias (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Xanthomonas*, etc.) (Rapp e Backhauss, 1992).

As lipases produzidas por microrganismos são excretadas como enzimas extracelulares. Quanto a especificidade, podem ser classificadas em lipases não específicas (hidrolisam completamente os triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol); lipases 1,3 - específicas (hidrolisam os ácidos graxos ligados ao C1 e C3 do glicerol, produzindo ácidos graxos e 2-monoglicerídeos); e lipases ácido graxo específicas (hidrolisam ésteres com ácidos graxos de cadeia insaturada com dupla ligação no C-9) (Santaniello e col., 1993). A maioria das lipases de fungos filamentosos são 1,3 - específicas, e muito usadas comercialmente porque se adaptam muito bem à solventes orgânicos parcialmente anidros sem requererem cofatores (Vulfson, 1993).

As lipases microbianas geralmente são proteínas acídicas, apresentando de 2 a 15 % de resíduos carboidratos. Esses resíduos podem ser D-manose, D-galactose, D-xilose ou D-arabinose (Macrae, 1983).

Devido a grande diversidade das propriedades moleculares das lipases microbianas (que dependem da fonte da enzima), elas são capazes de atuar seletivamente sobre seus substratos, tendo inclusive como substratos naturais, os triglicerídeos que são insolúveis em água. As lipases catalisam rapidamente a hidrólise das ligações acil éster dos ácidos graxos dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres, glicerídeos parciais e glicerol entre a fase orgânica (onde se encontra o substrato) e a fase aquosa (onde a enzima é solúvel) (Macrae, 1983).

A **FIGURA 6** mostra que a reação de hidrólise é reversível, ou seja, além da hidrólise, as lipases catalisam reações de síntese e transesterificação de ligações de éster de glicerídeos e fosfoglicerídeos (Macrae, 1983), bem como a síntese e hidrólise de uma variedade de ligações éster não glicerídicas (Kalaratis e col., 1990).

Essa diversidade também confere as lipases uma notável habilidade em assumir uma variedade de conformações para se acomodar aos substratos (Arroyo e Sinisterra, 1994), não exigindo cofatores para sua atividade catalítica (Santaniello e col., 1993), e serem estáveis em solventes orgânicos e à temperaturas relativamente altas. Todas essas propriedades as tornam atrativas para os químicos orgânicos, especialmente em sínteses de compostos quirais e resolução de misturas racêmicas (Stamatis e col., 1993).

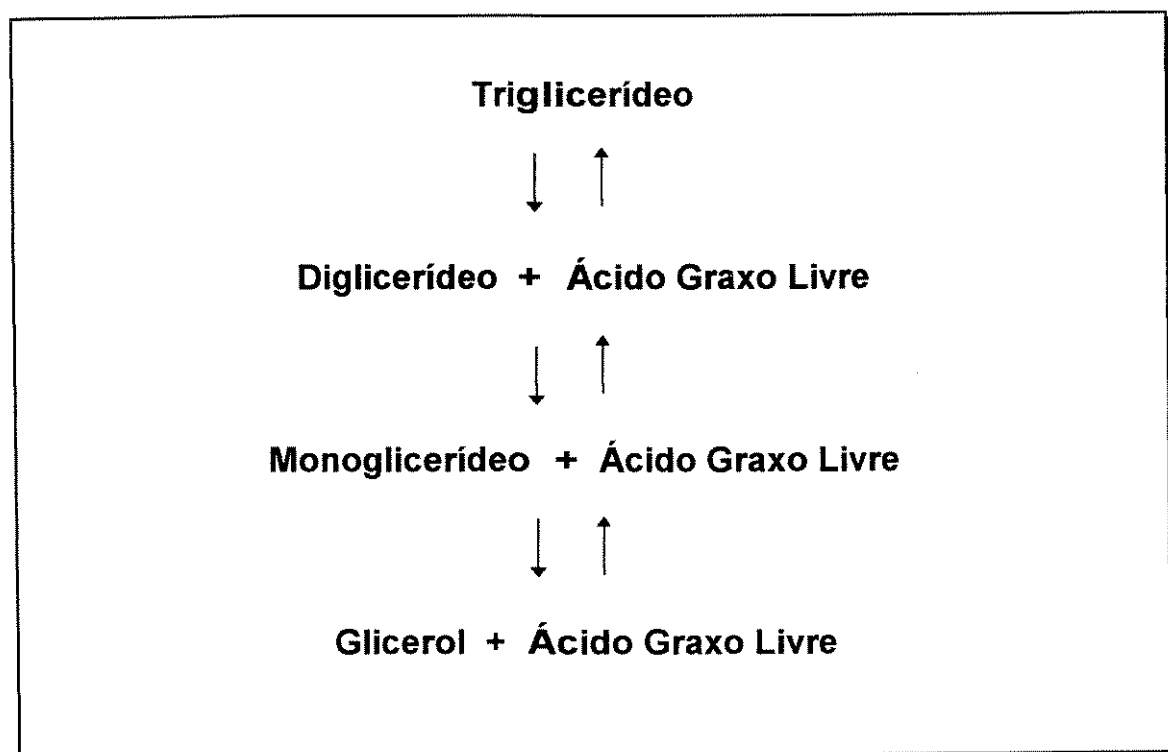


FIGURA 6 - Reações Catalisadas pelas Lipases

(Macrae, 1983)

Industrialmente elas podem modificar óleos e gorduras, melhorar aroma, cor, sabor e/ou estrutura de muitos tipos de alimentos, na produção de detergentes, cosméticos e produtos farmacêuticos (Macrae, 1983). Em processos industriais, as lipases de *Rhizopus delemar* podem degradar poliésteres visando a aplicação na biodegradação de resíduos plásticos (Walter e col., 1995), *Rhizopus javanicus* e *Mucor miehei* para remoção de ácidos graxos indesejáveis de óleos vegetais (Hartmeier e col., 1995) e *Pseudomonas fluorescens* para aplicação de lipases na hidrólise de óleo de sardinha (Kosugi e col., 1995), entre outros. Lipases de fungos filamentosos, cuja maioria são 1,3 - específicas, são utilizadas principalmente nos processos de síntese de triglicerídeos, tratamentos de efluentes e nas indústrias de papel, detergente e farmacêuticas.

1.2.1.1. Esterificação, Transesterificação e Acilação

Lipases são as enzimas mais freqüentemente usadas em síntese orgânica, devido a sua estabilidade, disponibilidade comercial (com um certo grau de pureza) e por aceitarem uma variedade de substratos (Van der Deen e col., 1994).

A obtenção de dióis enantiomericamente puros são de considerável interesse, porque podem ser usados como auxiliares quirais em síntese assimétrica (Weidner e col., 1994), na síntese de macromoléculas opticamente puras e, na síntese de catalisadores organometálicos, podendo ser produzidos através de reações de esterificação (Bisht e col., 1993) e transesterificação (Weidner e col., 1994; Baldessari e col., 1994).

1.2.1.2. Esterificação (Bisht e col., 1993)

O Butano-2,3,-diol foi convertido em (2R,3R) - diacetato **5** com 91% de rendimento e > 98% ee, através de uma esterificação com acetato de vinila catalisada por lipase de *Pseudomonas fluorescens* (**FIGURA 7**).

1.2.1.3 Transesterificação e Acilação (Weidner e col., 1994)

A resolução cinética do diol (1RS, 2SR) - **1** foi realizada através de uma transesterificação catalisada por lipase com acetato de vinila em solvente orgânico, na presença de lipase *Pseudomonas cepacia* (PS). A resolução se processou numa seqüência envolvendo duas acilações. Na primeira etapa (1RS, 2SR) - **1** é convertido regioseletivamente no monoacetato primário (1RS, 2SR) - **2**, como intermediário. A partir do monoacetato ocorre uma enantioseleção efetiva para gerar o monoacetato (1S, 2R) - **2** e o diacetato (1R, 2S) - **3** (**FIGURA 8**).

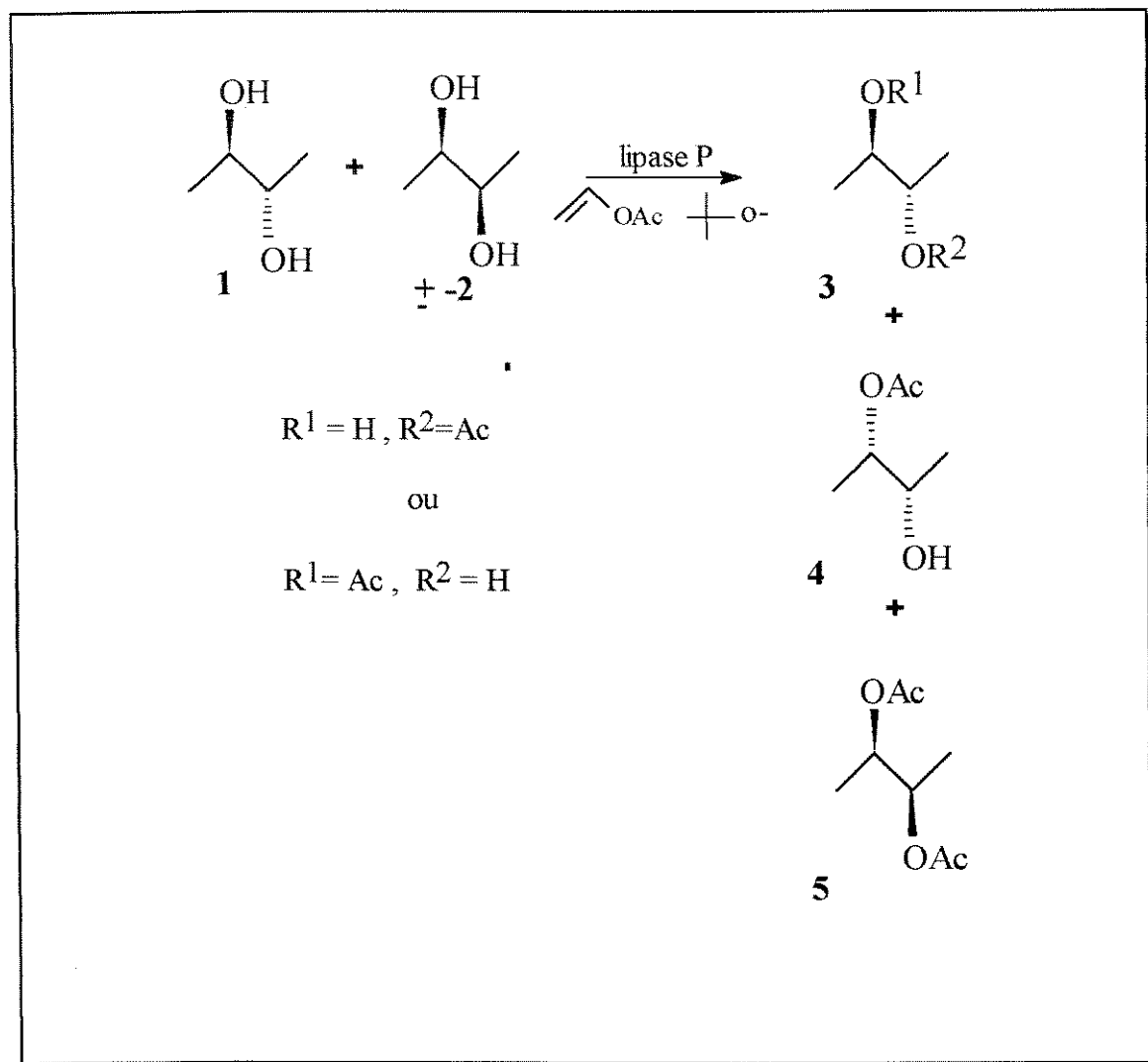


FIGURA 7 - Esterificação enantioseletiva do butano-2,3-diol catalisada por Lipase *Pseudomonas fluorescens*.
 (Bisht e col., 1993)

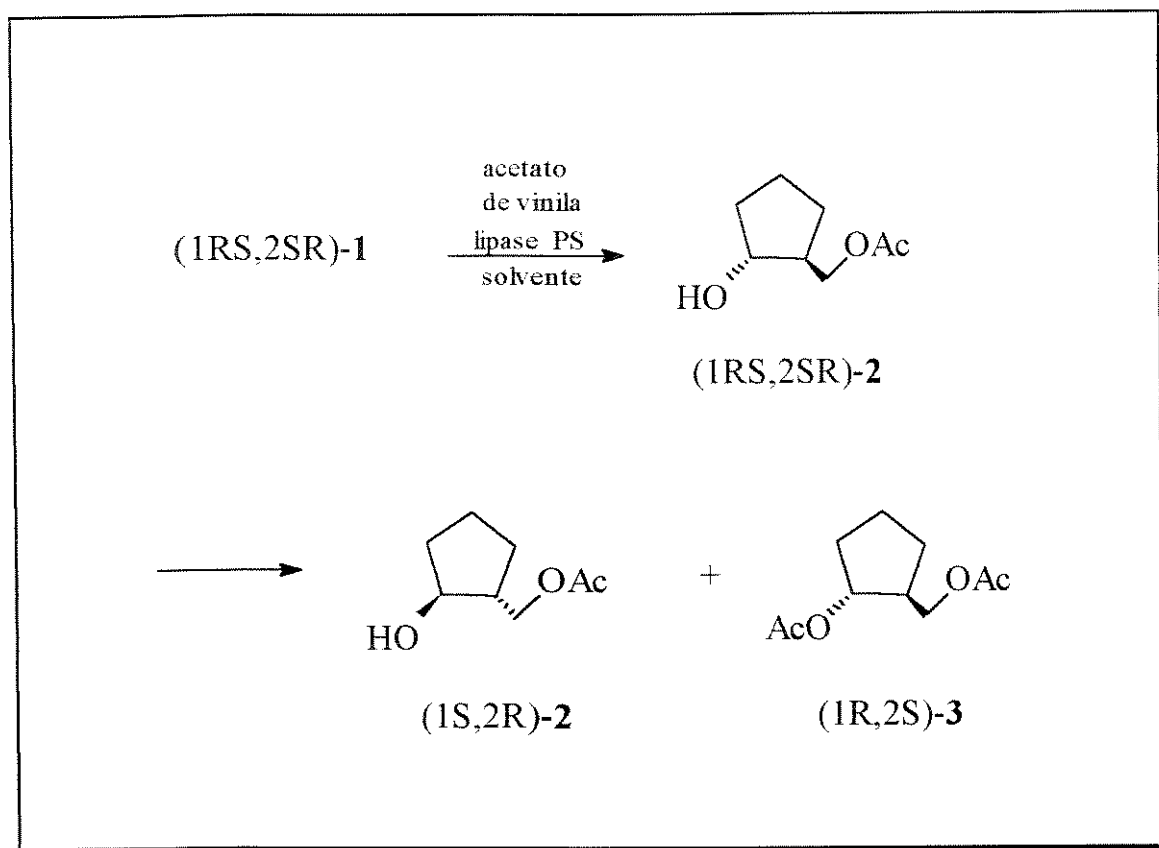


FIGURA 8 - Síntese para Obtenção do (1R, 2S) - 3
a partir do Diol (1RS, 2SR) - 1
(Weidner e col., 1994)

1.2.2. FÁRMACOS

Apesar dos fatos, até recentemente, a maioria das drogas sintéticas quirais (fármacos) eram comercializadas como racematos por razões econômicas (Quax e Brockhuizen, 1994). Em 1982, fármacos racêmicos eram produzidos numa razão de 7:1 em relação aos fármacos opticamente puros, proporção que não se alterou até 1985. Na realidade, existem mais de 500 drogas comercializadas como racematos, com

pouquíssimas informações sobre a atividade biológica dos enantiômeros individualmente (Margolin, 1993).

A atividade biológica, toxicidade, liberação da droga e metabolismo podem ser drasticamente diferentes para enantiômeros de uma mesma droga quiral. O (S)-isômero do Naproxeno é usado como antiinflamatório, enquanto o (R)-isômero produz desordens gastro-intestinais (Quax e Brockhuizen, 1994). Na Talidomida, o (S)-enantiômero provoca deformação fetal, enquanto o (R)-enantiômero possui propriedades sedativas (Stinson, 1994; Robin e col., 1995). Isso ocorre devido a existência de um ou mais centros assimétricos nos compostos biologicamente ativos, quando a atividade específica desses compostos está relacionada apenas a um dos enantiômeros. Por isso é de fundamental importância que se controle a formação de centros assimétricos durante a síntese de moléculas biologicamente ativas, ou separar os enantiômeros dos compostos racêmicos formados.

Atualmente, esta situação está se modificando devido aos recentes avanços nas sínteses químicas assimétricas, na intensificação de pesquisas para obtenção de Synthons (Van der Deen e col., 1994; Hansen e col., 1995) e na formação de compostos enantiomericamente puros através dos métodos biocatalíticos (Nicolosi e col., 1995). As lipases têm sido rotineiramente usadas para resolução de misturas racêmicas de drogas e agroquímicos, através da hidrólise enantioseletiva de ésteres racêmicos, assim como na acilação regioseletiva de grupos hidroxilas primário e secundário (Lovey e col., 1994; Ferraboschi e col., 1994; Ferraboschi e col., 1995; Hof e Kelog, 1994). Essa acilação é de fundamental importância por ocorrerem misturas de ésteres primários e secundários pelos métodos convencionais (Nair e Anilkumar, 1994).

1.2.2.1. Síntese de Triglicerídeos Homogêneos a Partir dos Ácidos Eicosapentaenoico e Docosahexaenoico (Haraldsson e col., 1995)

Atualmente, indústrias farmacêuticas estão interessadas nos óleos de peixe (anchova, arenque, sardinha de águas frias) e outras espécies marinhas, devido aos efeitos fisiológicos e terapêuticos (atuam no sistemas cardíaco, circulatório e imunológico e nos processos inflamatórios e carcinogênicos) encontrados nos ácidos graxos de cadeia longa, poliinsaturados do tipo ω -3, como os ácidos cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (**EPA**) e cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (**DHA**), presentes nesses óleos. A maior parte da produção mundial dos ácidos **EPA** e **DHA** são hidrogenados para produção de margarinas e outros produtos, destruindo praticamente suas propriedades terapêuticas. Por isso é de interesse industrial obter triglicerídeos homogêneos a partir desses ácidos, já que os triglicerídeos são encontrados nos alimentos e no organismo humano. Processos de esterificação pelos métodos químicos para a preparação de triglicerídeos não são viáveis, porque todas as ligações cis ω -3 seriam parcialmente destruídas por oxidação, isomerização ou migração de ligações duplas. Assim, síntese assimétrica catalisada por lipases foram empregadas para a produção de triglicerídeos a partir desses ácidos com um alto grau de pureza. Dois métodos foram empregados: reações de esterificação direta usando 99% dos ácidos graxos livres **EPA** e **DHA** e glicerol com 100% de rendimento após 72 horas e, interesterificação de tributirina com etil éster com rendimento 97% de rendimento após 96 horas de reação (**FIGURA 9**). Esses rendimentos foram para ambos os ácidos **EPA** e **DHA**.

1.2.2.3. Síntese do α - Naftil Trifluórmetil Carbinol (Gaspar e Guerrero,1995)

Nos últimos anos estão sendo usados compostos fluorados como intermediários nas sínteses de moléculas bioativas, devido as propriedades físicas e biológicas relacionadas principalmente ao flúor. Síntese enantioseletiva de ambos enantiômeros de α - Naftil Trifluórmetil Carbinol (R)-**1a**, (S)-**1a**, foi produzida com sucesso por acilação dos seus correspondentes alcoois racêmicos (RS)-**1a**, com acetato de vinila na presença de lipase *Pseudomonas cepacia* (PS). Numa primeira etapa a lipase produz somente o álcool (R)-**1a**, e o acetato quiral (S)-**3a**. Esse acetato posteriormente é hidrolisado quimicamente para o álcool (S)-**1a** com um bom rendimento e alta enantioseletividade (**FIGURA 10**).

1.2.2.4. Síntese do Cilazapril (Stinson, 1994)

A lipase *Pseudomonas cepacia* foi usada na síntese do Cilazapril, um regulador de pressão sanguínea, através de uma hidrólise de ésteres estereoseletiva. As lipases atuam na resolução do α -hidroxi γ -fenilbutirato pois estas hidrolisam o (S)-enantiômero preferencialmente, deixando o (R)-enantiômero intacto (**FIGURA 11**).

1.2.2.5. Resolução Catalisada por Lipase de Hidantoinas 5,5-Dissubstituída (Mizuguchi e col., 1994)

Os derivados da hidantoina possuem várias atividades biológicas, sendo muito usados na medicina e agricultura. Por possuírem um centro estereogênico na posição **5**, são comercializados como racematos. Hidantoinas 5,5-dissubstituídas, quirais, não racêmicas, foram sintetizadas por hidrólise enantioseletiva catalizada por lipases de *Pseudomonas sp*, a partir do derivado **1** em água/diisopropil éter (IPE), contendo 20% de acetona à temperatura ambiente. Essas lipases

mostraram uma alta enantioseletividade, hidrolisando o (R)-enantiômero mais rapidamente do que o (S)-enantiômero (**FIGURA 12**).

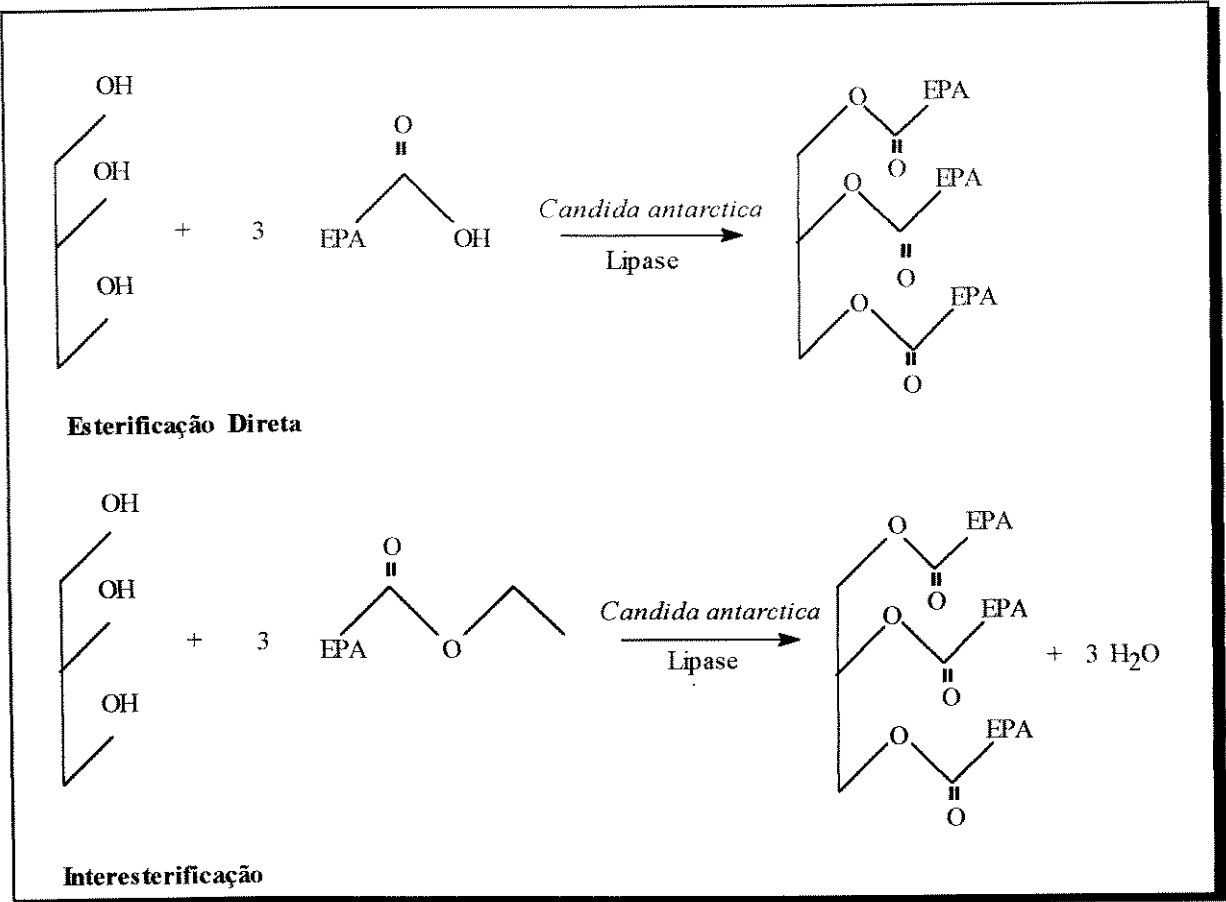


FIGURA 9 - Síntese de Triglicerídeos Homogêneos A partir dos Ácidos Eicosapentaenóico (**EPA**) e Docosahexaenóico (**DHA**)
(Haraldsson e col., 1995)

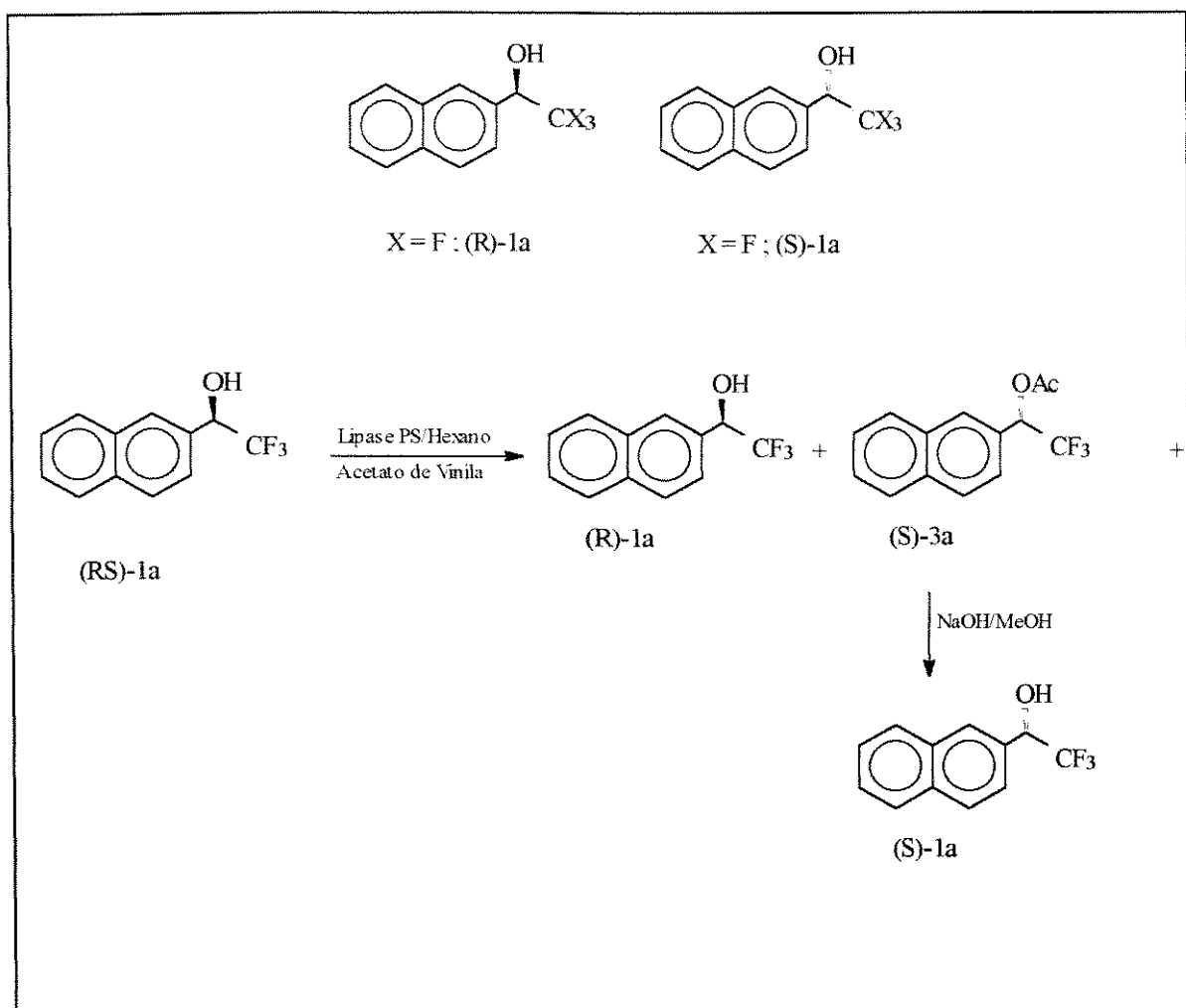


FIGURA 10 - Síntese do α - Naftil Trifluórmetil Carbinol
(Gaspar e Guerrero, 1995)

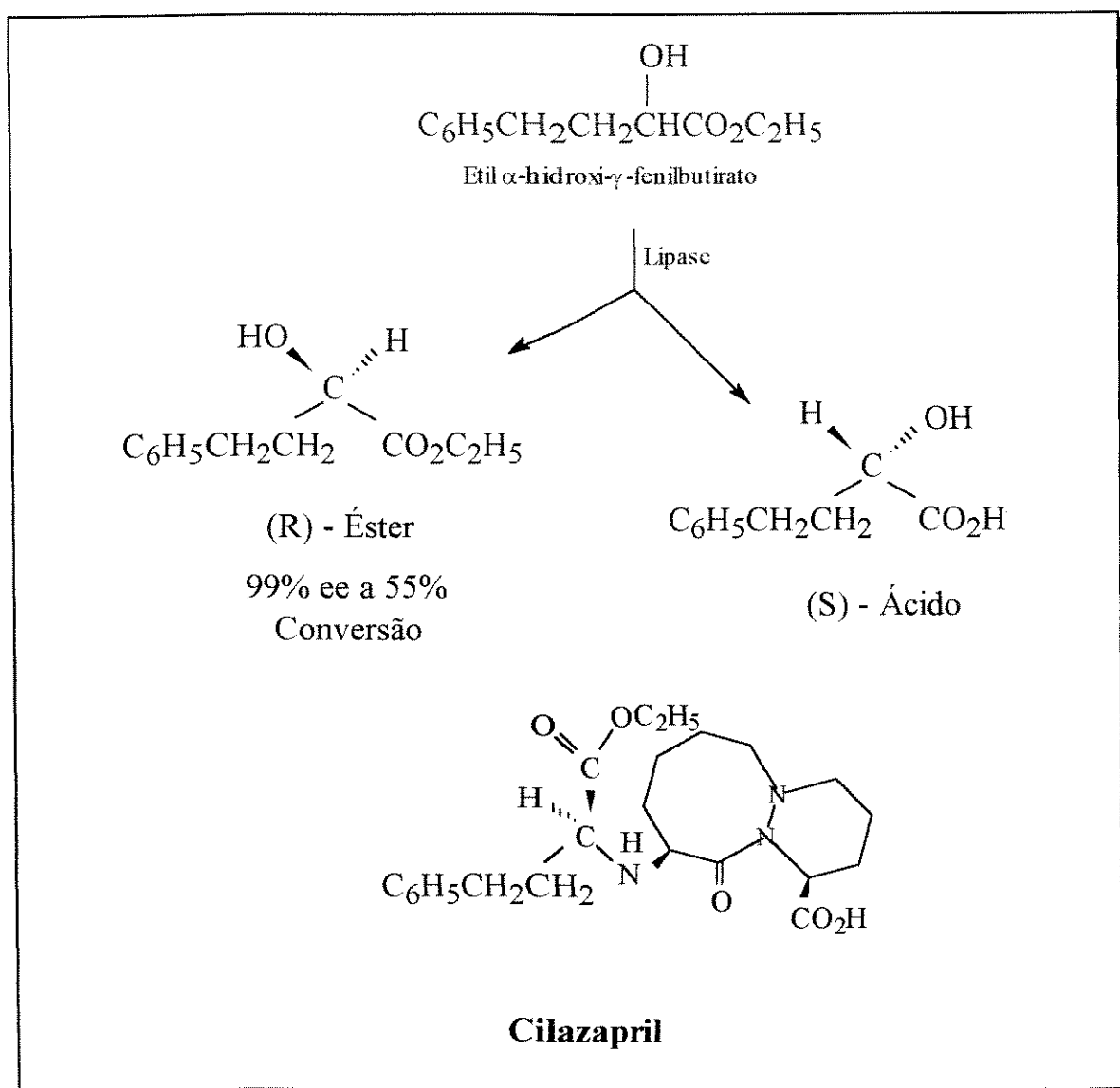


FIGURA 11 - Síntese do Cilazapril
(Stinson, 1994)

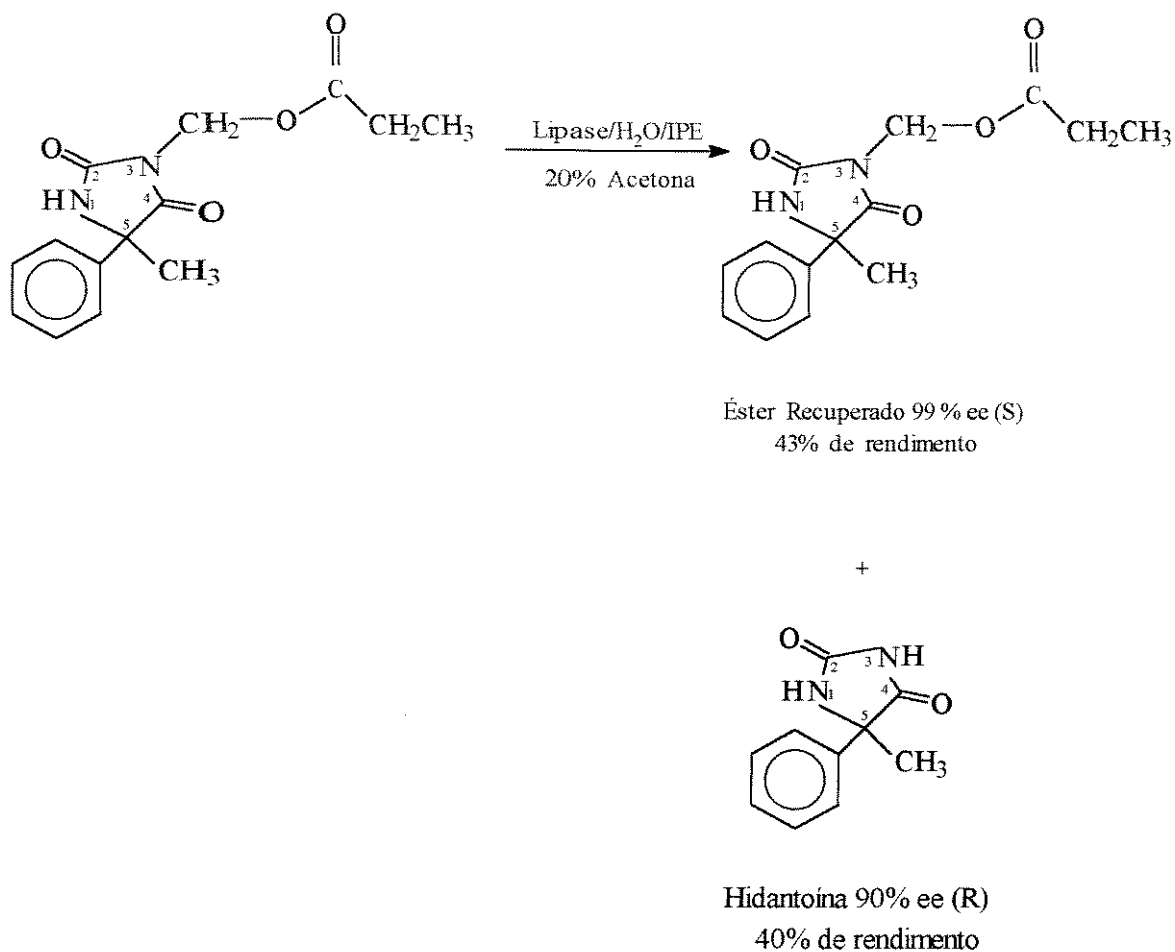


FIGURA 12 - Resolução Catalisada por Lipase de
 Hidantoinas 5,5-Disubstituída
 (Mizuguchi e col., 1994)

1.2.3. DETERGENTES

As enzimas estão contribuindo significativamente para a performance de produtos tensoativos ao atuarem como aditivos em detergentes. As lipases adicionadas aos detergentes conseguem remover manchas gordurosas num tempo menor e, em temperaturas mais baixas do que as normalmente utilizadas em lavagens. Esse processo além de econômico, oferece benefícios ao meio ambiente (Nothenberg e col., 1991).

1.2.4. INDÚSTRIA PAPELEIRA

Espera-se um aumento no uso de enzimas na indústria papaleira com o objetivo de se minimizar problemas ambientais (Björkling e col., 1991).

Ao lado das celulasas e hemicelulasas (que atuam sobre a superfície das fibras, removendo substâncias indesejáveis), e das ligninases (que degradam a lignina diminuindo o uso de produtos químicos e de energia na produção de polpas e celulose), o uso de lipases na indústria papaleira levam a um considerável aumento na produtividade e na qualidade do papel final (Vide item 1.4) (Durán e col., 1995).

1.2.5. EFLUENTES

As descargas líquidas liberadas pelas indústrias papaleiras geram problemas que se agravam a cada dia e que se refletem principalmente no meio ambiente. Para se ter uma idéia, em 1987, a produção mundial de papel foi estimada em 227 milhões de ton/ano e a produção de polpas em 50 milhões de ton/ano (Durán e Esposito, 1992). Embora as técnicas mais empregadas no tratamento de efluentes, atualmente, sejam as lagoas aeróbicas e lodos ativados, esses problemas causados pelos efluentes originados dos processos de branqueamento, podem ser minimizados com a utilização de métodos alternativos.

Os fungos filamentosos *Norcardia*, *Rhodococcus* ou *Hecrothrix parvicella*, produtores de lipases e capazes de assimilar por difusão direta lipídeos de cadeias longas encontrados nos efluentes, estão sendo utilizados no tratamento dos mesmos, reduzindo a produção de espumas características dos efluentes (Ratledge, 1992).

Resultados obtidos com lacases, peroxidases e ligninases no tratamento de efluentes provenientes da indústria papaleira, embora satisfatórios, exige que as enzimas estejam imobilizadas para que as técnicas sejam economicamente viáveis.

1.2.6. *Penicillium citrinum*

Embora a literatura contenha bastante informações sobre a atividade lipolítica de microrganismos, a demanda industrial estimula cada vez mais a pesquisa para novas fontes de lipases que apresentem novas características (estabilidade térmica, especificidade reacional, alta atividade lipolítica, etc.).

Entre os fungos, os filamentosos são os que cada vez mais estão sendo estudados como fonte dessa enzima (Rapp e Backhauss, 1992), entre eles, o gênero *Penicillium*. Maliszewska e Mastalerze (1992) investigaram a produção, purificação, e propriedades físico-químicas das lipases do *Penicillium simplissimum*.

Penicillium citrinum, microrganismo proveniente do solo, possui atividade lipolítica e tem sido estudado como fonte de lipases quando cultivado em diferentes fontes de carbono como os óleos de oliva, milho, girassol, etc (Sztajer e Malizewska, 1988). Este microrganismo pode também fazer uso de materiais lignocelulósicos (casca de arroz deteriorada) para produzir celulasas. O *Penicillium* quando encontrado em alimentos e ervas medicinais pode liberar uma micotoxina, a citrinina

(Pimentel, 1995), que é patogênica ao homem, atacando principalmente os rins (Vinãs e col., 1993).

O *Penicillium citrinum* foi o microrganismo usado nesse trabalho como produtor de lipases.

1.3. IMOBILIZAÇÃO

Atualmente, a aplicação de enzimas nos processos industriais é uma realidade, entretanto, devido a sua natureza protéica, são facilmente desnaturáveis e sua produção em larga escala com finalidades industriais tornam os custos elevados.

Uma forma de contornar essas limitações é imobilizar enzimas em suportes insolúveis em água com preservação de suas atividades biológicas. De acordo com Kennedy e col. (1987), enzimas imobilizadas são enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, podendo ser reutilizadas continuamente. Chibata e col. (1976) foram os primeiros a propor a utilização de enzimas imobilizadas no processo industrial, na produção de L-Aminoácidos a partir de uma mistura racêmica de Acil-DL-Aminoácidos usando uma amilase imobilizada.

No geral, os métodos utilizados para imobilização de enzimas podem ser agrupados em quatro grandes grupos: adsorção; oclusão da proteína no interior de polímeros; reações cruzadas mediante o emprego de reagentes bi ou multifuncionais e ligações covalentes a suportes poliméricos, via grupamentos químicos (Powell, 1990).

Nos processos de adsorção, a fixação da proteína é puramente física, ou seja, a proteína adere à superfície de um suporte inerte, por meio de ligações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas, forças de Van der Waals,

etc. A técnica consiste em misturar a enzima e o suporte sob condições apropriadas e após um certo tempo de contato, separar a enzima imobilizada através de filtração ou centrifugação. Trata-se de uma metodologia simples, de fácil execução, mas que possui a desvantagem das enzimas desorverem facilmente durante o processo de lavagem e operação (variação de pH, força iônica e temperatura (Kemeny e Challacombe, 1988). São necessárias fortes ligações hidrofóbicas e eletrostáticas entre a enzima e o suporte para que se tenha sucesso neste método de imobilização. A **TABELA III** mostra os suportes mais usados por este método (Basri e col., 1994).

Os processos de oclusão consistem no aprisionamento de uma enzima em uma matriz polimérica ou em uma membrana semi-permeável, de tal forma que se permita a penetração do substrato e difusão dos produtos e impeça a liberação da proteína, conservando integralmente sua estrutura. Entre as várias matrizes usadas para para a oclusão (géis de poliacrilamida, alginato, gelatina, ágar, agarose), os géis de poliacrilamida são os mais divulgados (Coughlan e col., 1988).

Nos processos de reações cruzadas, os reagentes bi- ou multifuncionais de baixa massa molecular, são capazes de fazer ligações cruzadas inter ou intramoleculares. Os reagentes mais empregados são glutaraldeído, isocianato e tioisocianato.

A ligação covalente formada entre a enzima e o suporte não pode envolver radicais essenciais à catálise, o que às vezes é difícil de se conseguir (Woodward, 1985). Geralmente, as reações ocorrem em meio aquoso, entre 0 e 25°C e próximas a pH neutro. Os suportes mais usados são mostrados na **TABELA III** (Jordão, 1994).

Dos aminoácidos que constituem as proteínas, os resíduos mais disponíveis usados na imobilização são em ordem decrescente: lisina,

cisteína, tirosina, histidina, ácidos aspártico e glutâmico, arginina, triptofano, serina, treonina e metionina. A **TABELA IV** mostra os resíduos reativos desses aminoácidos (Jordão, 1994).

Os grupamentos funcionais disponíveis no suporte para que a enzima possa se ligar, são mostrados na **TABELA V** (Jordão, 1994). A maioria dos suportes não possuem esses grupos reativos, mas hidroxilas, aminas, amidas e carboxilas, que precisam ser ativados para tornarem-se capazes de se ligar as enzimas.

Algumas propriedades das enzimas se modificam quando estas são imobilizadas. Alterações na estrutura da enzima fixada, ocasionará mudanças conformacionais que poderão afetar sua atividade catalítica. Também não deverá ocorrer excesso de enzima ligada ao suporte, porque poderá haver redução de sua atividade por impedimento estérico.

Quando a ligação entre a enzima e o suporte envolve modificação química, como ligações covalentes ou cruzadas, geralmente o derivado enzimático imobilizado (**DEI**), apresenta grande estabilidade operacional e perda da atividade específica devido a reações que podem ocorrer entre o suporte e diferentes regiões da enzima. Quando a enzima é imobilizada por adsorção, obtém-se, geralmente, **DEI** com alta retenção de atividade e baixa estabilidade, o que os tornam pouco práticos (Kennedy e col., 1987).

A escolha do método de imobilização apropriado, dependerá das características apresentadas pelas moléculas do substrato, da enzima, e dos produtos formados. Geralmente, imobiliza-se a enzima em estudo, em vários suportes, avaliando-se sua atividade em cada sistema imobilizado. A escolha do binômio enzima-suporte recairá sobre o sistema que apresentar maior retenção de atividade e estabilidade.

TABELA III - Alguns suportes utilizados em imobilizações de enzimas
(Basri e col., 1994)

MÉTODO	SUPORTE
ADSORÇÃO • MATERIAL MODIFICADO • TROCADORES DE CÁTIONS • TROCADORES DE ANIONS	⇒ carvão ativo, sílica gel, alumina, vidro, amido, argila. ⇒ tanino-aminohexil celulose, concanavalin a-sefarose. ⇒ CM-celulose, abertite, CG-50, dowex 50. ⇒ DEAE-celulose, DEAE-sephadex, poliaminopolistireno, amberlite IR-45.
LIGAÇÕES COVALENTES • NATURAIS • SINTÉTICOS	⇒ celulose, CM-celulose, agarose, dextran. ⇒ derivados de poliacrilamida, copolímeros de anidrido maleico, poliaminopoliestireno

TABELA IV - Resíduos Reativos das Proteínas (Jordão, 1994)

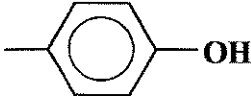
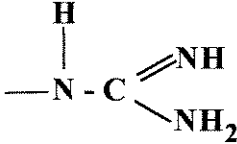
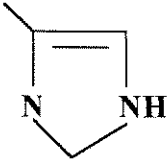
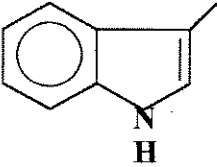
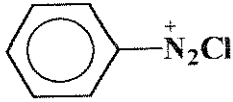
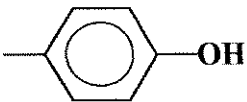
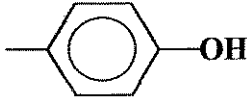
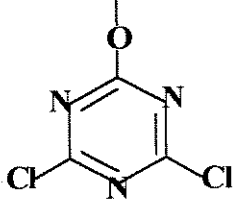
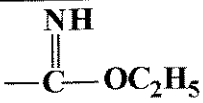
GRUPO FUNCIONAL	AMINOÁCIDO CORRESPONDENTE
-NH ₂ (amino)	lisina e N - terminal
-SH (sulfidrila)	cisteína
-COOH (carboxila)	ácido aspártico; ácido glutâmico e C - terminal
 (fenol)	tirosina
 (guanidina)	arginina
 (imidazol)	histidina
 (indol)	triptófano
-S -S (dissulfeto)	cisteína
-S -H ₃ C (mercaptometil)	metionina
-OH (hidroxila)	serina

TABELA V - Alguns Grupamentos Reativos do Suporte que Podem Reagir Diretamente com a Enzima (Jordão, 1994).

GRUPOS REATIVOS DO SUPORTE	GRUPOS REATIVOS DA ENZIMA	TIPO DE LIGAÇÃO
 sal de diazônio	-NH_2 	ligação diazo
$\text{-CH}_2\text{CON}_3$ acil azida	-NH_2 -SH 	formação de ligação amida
 triazinil	-NH_2	substituição aromática
$\text{-NH}=\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)$ imina	$\text{-CO}_2\text{H}$ -NH_2	reação de Ugi
 imidoéster	-NH_2	reação de amidinação
NH_2 amina	-NH_2 $\text{-CO}_2\text{H}$	formação de ligação amida na presença de reagentes de condensação
-CONHNH_2 acil hidrazida		formação de ligação amida na presença de reagentes de condensação

1.3.1. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Atenção especial vem sendo dada às lipases provenientes de microrganismos, devido ao potencial que essas enzimas possuem industrialmente (Vide 1.2.1.), assim como, o uso delas na forma imobilizada para catalisar reações em meios com baixo índice de água (Carta e col., 1992; Pimentel e col., 1994).

As lipases imobilizadas são bons catalisadores para reações de esterificação (Basri e col., 1995), transesterificação (Mustranta e col., 1993) e hidrólise de triglicerídeos (Ruckenstein e Wang, 1993; Al-Duri e col., 1995) em solventes orgânicos.

A imobilização de lipases têm sido realizada por métodos como adsorção, oclusão e ligações covalentes. O rendimento da atividade das lipases (geralmente com baixos percentuais) são consideravelmente mais baixos do que os relatados para outras enzimas (Mustranta e col., 1993). Entretanto, alguns estudos mostram que a imobilização acentua a atividade das lipases, assim como suas estabilidades térmica e química (Basri e col., 1995).

Os resultados obtidos com lipases imobilizadas por adsorção em um dos lados de membranas poliméricas, mostraram que o binômio enzima-membrana apresentou ótima estabilidade com uma boa retenção de sua atividade específica. Esses resultados podem estar relacionados com a estrutura porosa dessas membranas, já que estas permitem um bom contato entre a enzima e o reagente (Rucka e Turkiewicz, 1990).

As lipases normalmente atuam na interface óleo/água, sendo sua atividade influenciada pelas propriedades do suporte e pelo método de imobilização utilizado. O solvente usado na imobilização tem se mostrado importante na imobilização por ligação covalente. As interações iônicas e

hidrofóbicas entre a lipase e o suporte são importantes quando a imobilização da lipase não é covalente. Dentre os numerosos suportes investigados para imobilização de lipases, os materiais hidrofóbicos são os que mostraram a melhor performance (Ruckenstein e Wang, 1993; Montero e col., 1993), onde os polímeros hidrofóbicos têm se mostrado os melhores suportes na imobilização por oclusão (Mustranta e col., 1993).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos resultam em muitas vantagens como a possibilidade de uso das enzimas ou células em sistemas contínuos; maior reutilização das enzimas; aumento da estabilidade enzimática e capacidade de parar reações pela remoção do suporte.

As vantagens adicionais são conseguidas quando enzimas são imobilizadas em solventes orgânicos, devido os substratos orgânicos serem geralmente solúveis em solventes orgânicos; os subprodutos promovidos por reações em água (hidrólise de ácidos anidros) podem ser eliminados; e as reações nas quais o equilíbrio termodinâmico é limitado por água (esterificações) podem ser realizadas (Carta e col., 1992).

1.3.2. SUPORTES MAGNETIZADOS

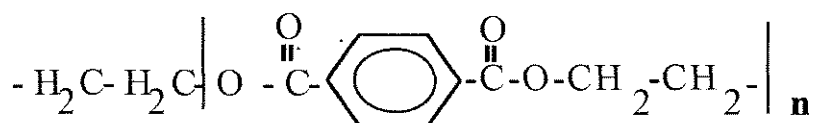
Os suportes para imobilização de enzimas a partir de materiais magnéticos são usados com o objetivo de se evitar o uso de centrifugação ou filtração. As técnicas desenvolvidas para a preparação desses suportes estão baseadas nas características dos óxidos de ferro (Leemputten e Horisberger, 1974; Guesdom e Avrameas, 1977; 1981; Kemeny e Challacombe, 1988).

Esses suportes, utilizados também para a imobilização de biopolímeros, permitem a rápida separação de partículas a partir de uma mistura reacional com componentes sólidos em suspensão, assim como de partículas finamente dispersas. São usados na hidrólise de carboidratos, degradação biológica de resíduos, fermentação alcoólica, catálise de reações redox entre substâncias orgânicas por enzimas imobilizadas, entre outros (Bendikene e col., 1995).

Os suportes magnetizados são economicamente viáveis, resistentes a grande parte dos solventes e ao ataque microbiano, apresentando boas propriedades mecânicas. Esses suportes podem ser obtidos a partir da modificação química da magnetita, do recobrimento da magnetita com polímeros orgânicos e por precipitação da magnetita sobre a superfície de estruturas poliméricas (Guesdom e Avrameas, 1981; Inada e col., 1988).

1.3.2.1. Dacron

O polietilenotereftalato, suporte utilizado neste trabalho, conhecido como Dacron (Carneiro Leão e col., 1991; Oliveira e col., 1989), é um poliéster insolúvel em meio aquoso, apresentando a seguinte estrutura:



onde **n** pode assumir até 15.000 unidades

O dacron pode ser encontrado comercialmente sob várias formas: membranas, pó, filmes, etc. Weetall (1970) foi o primeiro a propor este poliéster como suporte para fixação de proteínas, através da imobilização da L-Asparaginase em polietilenotereftalato diazotado.

A metodologia baseada neste trabalho foi proposta por Melo (1984). O método é simples, economicamente viável e não requer reagentes e equipamentos sofisticados. Utilizou-se o polietilenotereftalato na forma de filme que foi convertido à forma de pó durante o processo. O pó obtido é hidrofílico, mecanicamente resistente e não biodegradável, propriedades que o qualificam como um suporte adequado para imobilização.

1.4. RESINAS (“PITCH”)

O termo “pitch” refere-se a uma variedade de resinas orgânicas, de baixo e médio peso molecular e, aos depósitos que estas resinas originam quando extraídas em solventes neutros, apolares e orgânicos (Dreishbach e Michalopoulos, 1989). Estes extrativos lipofílicos e hidrofílicos chamados de resina ou “pitch” (Kantelinem e col., 1995) incluem triglicerídeos, ácidos graxos, ácidos resinosos, sais insolúveis desses ácidos, ésteres de ácidos graxos com glicerol e esteróis, graxas, assim como outros compostos que não estão bem caracterizados (Chen e col., 1994). Estes compostos mostram graus característicos de viscosidade (dependendo da temperatura), adesividade e força coesiva, ficando em torno de 10% do peso total da madeira (Farrell e col., 1993). Os depósitos de “pitch” podem ser encontrados nas polpas, moinhos da empresa papelreira e podem prejudicar seriamente a velocidade da produção e a qualidade do produto. Causam manchas, buracos e crostas no papel final (Dreishbach e Michalopoulos, 1989).

Em madeira não tratada, o “pitch” (Fischer e Messner, 1992a) localiza-se nas células parenquimáticas e sobre a superfície das fibras. Sua composição determina a quantidade de depósitos, variando conforme a estação (especialmente durante certos meses do inverno e primavera), localização geográfica, espécies de madeira e na própria madeira. Durante operações químicas e mecânicas (Shetty e col., 1994),

particularmente quando há mudanças de pH e/ou temperatura, refinamento e, em menor quantidade, em vários estágios de branqueamento, extrativos hidrofílicos e lipofílicos e carboidratos hidrofílicos (hemicelulases) (Kantelinem e col., 1995) são liberados na água usada para a fabricação do papel (Sundberg e col., 1993). Entre outras desvantagens, ocorre diminuição da resistência do papel e aumento da toxicidade nos efluentes. Desde que polpas mecânicas são insuficientemente lavadas, devido às rigorosas regulamentações do meio ambiente, um aumento nos níveis de substâncias coloidais dissolvidas (DCS) sobre as máquinas de papel vêm sendo observados.

O “pitch” coloidal (Shetty e col., 1994) pode ser considerado como uma emulsão diluída de óleo em água, estabilizada em parte por surfactantes naturais (ácidos graxos e ácidos resinosos em suas formas ionizadas), em parte, por certos processos químicos. Cozimento com sulfato sob condições alcalinas não removem completamente estes extrativos e como, alguns compostos presentes nos mesmos podem ser altamente reativos, estão sujeitos a mudanças consideráveis, principalmente durante o branqueamento. Como estes depósitos também podem conter altas concentrações de triglicerídeos (TG), a presença ou não de TG podem quantificar as diferenças na formação de depósitos de “pitch” em diferentes tipos de madeira. A formação desses depósitos iniciam-se durante o processo de branqueamento com cloro, onde as ligações duplas dos TG são cloradas. Esses TG clorados polimerizam-se, formando compostos adesivos que contribuem para a formação do indesejado “pitch” (Fujita e col., 1992; Fischer e Messner, 1992a). Através de um mecanismo não conhecido, esses TG clorados também formam depósitos nas polpas.

Extrativos que conduzem a formação de “pitch” são heterogêneos. Geralmente os triglicerídeos têm sido considerados a classe mais importante na formação de “pitch”. Entretanto, outros ésteres e graxas

podem estar presentes em altas concentrações e terem um papel significativo na formação desses depósitos. Polpas de madeiras provenientes de climas quentes (Ohtani e Shigimoto, 1991; Ohtani, 1993) podem conter principalmente hidrocarbonetos alifáticos polimerizados como causa primária, produzindo além de manchas no papel, depósitos de “pitch” nos equipamentos. Na polpagem mecânica de softwood, triglicerídeos, ácidos graxos e ácidos resinosos têm sido os extrativos que mais causam problemas (Mustranta e col., 1995)

Tradicionalmente as indústrias têm usado uma variedade de medidas, tais como, agentes tensoativos (alúmem, talco, dispersantes), madeiras com baixo índice de resina, modificação nos parâmetros de polpação como pH e temperatura (Dreishbach e Michalopoulos, 1989) . Entretanto, o custo é alto e em geral, os resultados não são satisfatórios. Como alternativa, dois tipos de tratamento biológico estão sendo sugeridos: enzimático e com microrganismos.

No tratamento biológico por microrganismo, um fungo *Ophiostoma piliferum*, isolado por Blanchette e col. (1992) e comercializado por Sandoz Chemicals Corp. (USA), sob o nome CARTAPIP™ 97, ao ser pulverizado sobre pilhas de cavacos reduziu consideravelmente a concentração de resinas no material biotratado (Farrel e col., 1993; Chen e col., 1994). A eficiência desse tratamento é variável, pois pode ser afetado por mudanças de temperatura.

Um outro tratamento fúngico realizado com CARTAPIP 58 (produtor de lipase e hemicelulase) ao ser pulverizado sobre pilhas de cavacos, reduziu não somente em 46 % a concentração de resinas no material biotratado, como também a quantidade de produtos químicos usados após o branqueamento sobre o mesmo. Trabalhos divulgados por pesquisadores do grupo Repligen Sandoz Research indicam que a

preparação contendo o CARTAPIP 58 está no mercado desde 1990 (Farrell e col., 1993).

Ensaio laboratoriais usando uma mistura de enzimas composta de celulasas e hemicelulase (Liftase A 40) apresentaram um efeito notável sobre o processamento das fibras secundárias (Durán e col. 1995). A ação das enzimas sobre a superfície das fibras, induzem o efeito de descascamento. Se controlado, as enzimas podem remover apenas os componentes superficiais sobre as fibras, principalmente aqueles com afinidade pela água. A ação dessas enzimas proporcionam melhorias na drenabilidade (pela redução das interações polpa-água) e nas propriedades mecânicas do papel industrial. Como os depósitos de "pitch" ocorrem também sobre as fibras, Kantelinem e col. (1995) usaram uma mistura de celulasas e hemicelulasas para a redução de extrativos lipofílicos, como método alternativo para minimização de problemas causados pelo "pitch".

No controle enzimático de "pitch", ensaios com polpas obtidas pelo processo sulfito e não branqueadas foram realizados. As polpas foram tratadas com Resinase A para reduzir o conteúdo dos triglicerídeos clorados. A enzima hidrolisou 86% dos triglicerídeos em 2 horas e os ácidos graxos liberados do "pitch" foram extraídos com solução de hidróxido de sódio. O material resinoso clorado com o mínimo de triglicerídeos e sem ácidos graxos livres foi menos adesivo do que o sistema original (Durán e col., 1995; Fischer e Messner, 1992a). Estudos com a mesma polpa e em escala piloto levaram às mesmas conclusões (Fujita e col., 1992; Fischer e col., 1993).

Atualmente, reconhece-se que o uso de enzimas em vários estágios do processamento industrial da madeira nas Indústrias de polpa e papel vem se mostrando cada vez mais promissor.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Otimizar a produção de lipase a partir do *Penicillium citrinum*;
- 2.2. propor o polietilenotereftalato magnetizado como suporte para imobilização da lipase do *Penicillium citrinum*;
- 2.3. determinar algumas propriedades cinéticas da lipase do *Penicillium citrinum* solúvel e imobilizada;
- 2.4. fazer um tratamento da polpa de *Eucalyptus* com lipases de *Candida rugosa* (comercial) e *Penicillium citrinum* solúvel, objetivando um método alternativo para eliminação de “pitch” ; e
- 2.5. caracterizar o “pitch” presente nessa polpa através de HPLC, Infravermelho, e Cromatografia Gasosa com detector de Massa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

Todos os reagentes usados foram de grau analítico MERCK ou SIGMA.

3.1.2. Equipamentos

- ⇒ Agitador magnético micro-V COLE PARMER
- ⇒ Agitador VORTEX F 52K-BRASIL
- ⇒ Balança analítica H15, METTLER
- ⇒ Balança semi-analítica SARTORIUS
- ⇒ Banho-maria GRANT
- ⇒ Centrífuga refrigerada SORVALL RC-2 (rotor SS-34)
- ⇒ Cromatógrafo Gasoso (GC) - HP 5890 Série II
- ⇒ Destilador-deionizador WA-53, YAMATO
- ⇒ Espectrofotômetros: CARY modelo 118;
- ⇒ VARIAN UV-VIS, modelo G34-S
- ⇒ Estufa modelo 002 CB, FANEM
- ⇒ Evaporador rotativo
- ⇒ HPLC - Cromatógrafo Shimadzu LC-6A
- ⇒ Infravermelho Perkin Elmer 1600 Série FTIR
- ⇒ Infravermelho IFS66
- ⇒ Liofilizador GT 2
- ⇒ Massa (MS) - HP 5970 B
- ⇒ Membranas de Ultrafiltros da Millipore CX-30 (PM=30.000)
- ⇒ Placa magnética CIBA CORNING Co.
- ⇒ Potenciômetro PHM 61 - RADIOMETER COPENHAGEN

3.1.3. Microrganismo

O *Penicillium citrinum*, microrganismo produtor de lipases, foi isolado como contaminante do óleo de oliva pela professora Maria do Carmo de Barros Pimentel, no Departamento de Bioquímica - UFPE (Pimentel e col., 1994).

3.1.4. Rejeito/"pitch" e Polpa

Utilizou-se rejeito/"pitch" (79,1% peso seco) e polpa (81% peso seco) de processo Kraft de Eucalyptus (75% *E. saligna*, 25% *E. grandis*) da CELPAV de Ribeirão Preto.

3.1.5. Enzimas

- Lipase de *Candida rugosa* (860 IU/ml, SIGMA, St. Louis, USA);
- Lipase de *Penicillium citrinum*.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Meios de Cultura (Pimentel, 1996)

3.2.1.1. Meio de Manutenção dos Fungos (**BDA**)

- batata - 14,0 % (p/v);
- dextrose - 2,0 % (p/v);
- ágar - 1,5 % (p/v).

3.2.1.2. Meio Líquido com Extrato de Leveduras (**MEL**)

- óleo de oliva - 1,0 % (v/v)
- extrato de levedura - 0,5% (p/v)

3.2.1.3. Meio Líquido com Sulfato de Amônio (**MSA**)

- óleo de oliva - 1,0 % (v/v)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,75 % (p/v)
- KH_2PO_4 - 0,015 % (p/v)
- NaCl - 0,015 % (p/v)
- MgSO_4 - 0,11 % (p/v)
- ZnSO_4 - 0,0015 % (p/v)
- FeSO_4 - 0,0010 % (p/v)

Obs.: Os meios de cultura tiveram suas composições em gramas por litro de água destilada.

3.2.2. Manutenção da Cultura e Produção do Inóculo

Manteve-se o microrganismo a 4°C em tubos de ensaio contendo **BDA** previamente esterilizados. Repicou-se as culturas e incubou-se a 28°C, por 5 dias, no mesmo meio de cultura para produção do inóculo.

3.2.3. Condições de Cultivo

Cultivou-se o *Penicillium citrinum* nos meios **MEL** e **MSA**. Realizou-se os experimentos, para ambos os meios, em três Erlenmeyers com capacidades para 2000, 500 e 125 mL. Esterilizou-se previamente os meios em autoclave à 120°C, por 20 min. Inoculou-se 10^7 esporos/mL em uma suspensão de 10 mL dos respectivos meios, nos Erlenmeyers de 125 mL à 28°C com agitação de 100 rpm durante dois dias. Após este intervalo, transferiu-se os inóculos para os Erlenmeyers de 500 mL, durante 3 dias e, por último, para o de 2000 mL. Antes de cada transferência e ao final da fermentação (6 dias para **MEL** e 8-10 dias para **MSA**), retirou-se amostras (5mL) assepticamente e filtrou-se em papel de filtro. A partir dos filtrados brutos determinou-se pH e atividade lipolítica.

3.2.4. Extrato Parcialmente Purificado (EPP)

Para obtenção do extrato parcialmente purificado (**EPP**) nos filtrados brutos dos meios de cultura **MEL** e **MSA**, inicialmente, adicionou-se lentamente sulfato de amônio (80 % de saturação) em banho de gelo. Após, deixou-se sob agitação suave à 4°C durante uma noite. Separou-se por centrifugação (13000 g ; 30 min) o precipitado e ressuspendeu-se em tampão TRIS/HCl 50 mM pH 8.0 para os meios **MEL** e **MSA**. Posteriormente utilizou-se membranas de ultrafiltros para obtenção do **EPP**, de acordo com a **FIGURA 13**. Para determinação do grau de purificação, utilizou-se amostras (**A** e **B**) provenientes do meio **MSA** de bateladas diferentes.

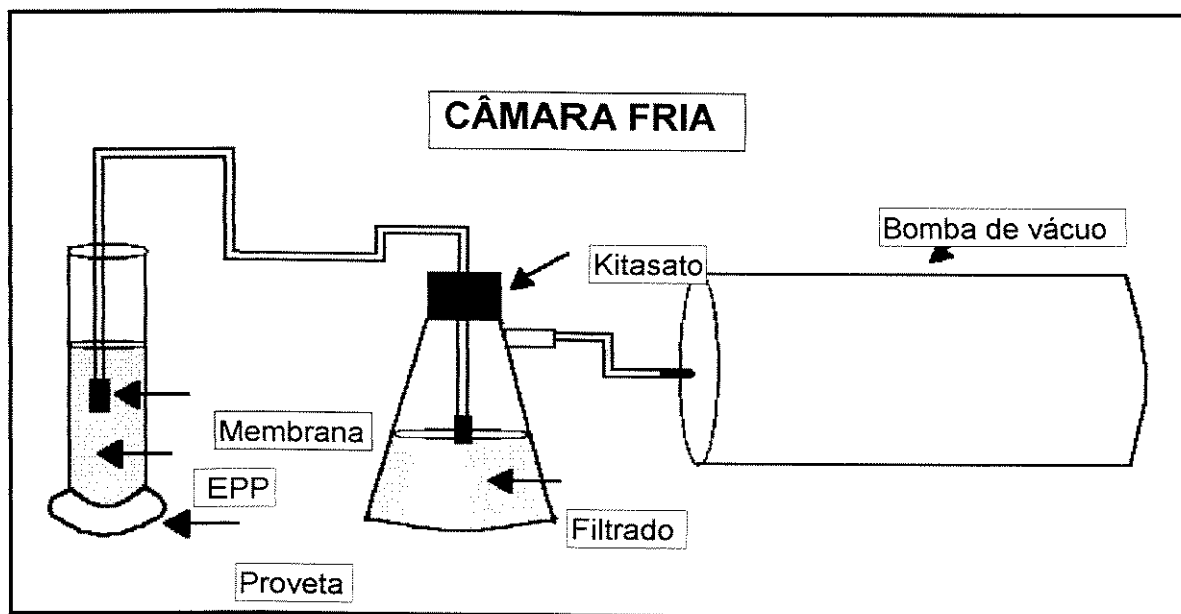


FIGURA 13 - Esquema para obtenção do **EPP** utilizando-se Membranas de Ultrafiltros da Millipore CX-30 (PM=30.000).

3.2.5. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática das lipases de *Cândida rugosa* e do *Penicillium citrinum* no **EPP** e **DEI**, baseou-se na hidrólise do p-nitrofenilpalmitato (pNPP) em p-Nitrofenol (pNP) e palmitato. Detectou-se a liberação do p-Nitrofenol à 410 nm (Winkler e Stuckmann, 1979; Pimentel e col., 1994).

SOLUÇÕES:

- Tampão Trishidroximetilaminometano em HCl-TRIS/HCl 50 mM pH 8.0;
- Solução **A** ou pNPP: 27 mg de pNPP em 9 mL de isopropanol;
- Solução **B**: 2 g de Triton x-100 + 0,5 g de goma arábica dissolvidos em 450 mL de tampão TRIS/HCl. Estável por 6 semanas à 4°C.

SUBSTRATO: sob agitação, adicionou-se 1 mL da solução **A** (gota-a - gota) na solução **B**.

MISTURA DE REAÇÃO: adicionou-se 0,3 mL de **EPP** em 2,7 mL de substrato, em uma cubeta de vidro de 3 mL. Fez-se leituras de 15 em 15 segundos num total de 2 minutos.

BRANCO: adicionou-se 0,3 mL de tampão TRIS/HCl em 2,7 mL de substrato, em uma cubeta de vidro de 3 mL.

Para determinação da atividade enzimática no **DEI**, colocou-se um Erlenmeyer de 50 mL em um banho à 37°C e adicionou-se 13,5 mL do substrato + 1,5 mL do **DEI**. Agitou-se em um agitador orbital e detectou-se à liberação do pNP. Guardou-se o **DEI** para determinação de proteínas.

3.2.6. Determinação de Proteínas

Inicialmente fez-se uma hidrólise no **DEI** para separar proteína, ferro e dacron. Após, determinou-se a concentração de proteínas no **EPP** e **DEI** pelo método de Lowry e col. (1951). Utilizou-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão.

Hidrólise:

- adicionou-se 1 mL de água no pó que restou da análise anterior;
- adicionou-se 0,2 mL de HCl 6 N concentrado;
- alcalinizou-se com NaOH (50%) até precipitação;
- filtrou-se e retirou-se 0,9 mL do sobrenadante; e
- procedeu-se com o Método de Lowry.

Método de Lowry

SOLUÇÕES:

A: Na_2CO_3 2 % p/v em NaOH 0,1N;

B: CuSO_4 0,5 % p/v em Citrato de Sódio 1 % p/v;

C: 50 mL **A** + 1 mL **B** (preparar na hora);

D: O reagente Folin-Ciocalteus diluído 1:1 com água

⇒ faixa de dosagem : 5 a 100 μg de proteínas.

PROCEDIMENTO:

- adicionou-se à 0,9 mL de amostra, 1 mL de **C**;
 - agitou-se e deixou-se em repouso por 10 minutos;
 - adicionou-se 0,1 mL de **D**;
 - agitou-se e deixou-se em repouso por 30 minutos;
 - branco: utilizou-se 0,9 mL de água e procedeu-se como escrito acima;
 - realizou-se as leituras à 500 nm;
- ⇒ faixa de dosagem: 25 - 100 μg .

3.2.7. Hidrazinólise do Polietilenotereftalato (Dacron)

(Carneiro Leão e col., 1991)

- cortou-se o dacron em tiras (4 g);
- adicionou-se uma mistura de 100 mL de metanol e 10 mL de hidrato de hidrazina;
- incubou-se em banho-maria a 40°C por 48 horas sob agitação constante;
- filtrou-se a vácuo e lavou-se em 50 mL de metanol (2 x);
- guardou-se no freezer após liofilizado.

3.2.8. Eliminação de Partículas Pequenas (fines) (Carneiro Leão e col., 1991)

- preparou-se suspensões de dacron-hidrazida utilizando-se a proporção de 2g do pó em 10 mL de água destilada;
- homogeneizou-se e esperou-se a sedimentação das partículas;
- retirou-se cuidadosamente os sobrenadantes;
- repetiu-se a operação por quatro vezes;
- filtrou-se para magnetização das partículas.

3.2.9. Magnetização (Carneiro Leão e col., 1991)

- adicionou-se 2 g de dacron-hidrazida a 100 mL de água destilada;
- adicionou-se gota-a-gota 10 mL de uma solução contendo 300 mg/mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 242 mg/mL de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sob vigorosa agitação;
- ajustou-se o pH para 8,3 pela adição de NH_4OH 28%;
- incubou-se a solução a 60°C por 30 minutos;
- filtrou-se o pó e lavou-se exaustivamente com água; e
- guardou-se no freezer após liofilizado.

3.2.10. Conversão dos Grupamentos Hidrazida em Azida

(Carneiro Leão e col., 1991)

- Adicionou-se a 0,4 g do suporte:
 - ⇒ 4 mL de HCl 0,6 N;
 - ⇒ 0,5 mL de Nitrito de sódio 5% (p/v);
- agitou-se por 25 minutos à temperatura ambiente;
- separou-se o pó magnetizado com uma placa de imã e lavou-se:
 - ⇒ 50 mL de água (4x);
 - ⇒ 50 mL NaCl (2x);
 - ⇒ 50 mL de água (4x);

3.2.11. Imobilização Covalente da Proteína (Carneiro Leão e col., 1991)

- adicionou-se 10 mL de **EPP** em 0,4 g do suporte magnetizado;
- agitou-se por 3 horas a 4°C (câmara fria);
- separou-se o material com um imã e removeu-se as proteínas não fixadas, lavando-as com:
 - ⇒ 50 mL de tampão pH 7,2;
 - ⇒ 50 mL NaCl 1 M;
 - ⇒ 50 mL tampão pH 7,2;
 - ⇒ 100 mL Triton x-100 (0,5%);
 - ⇒ 50 mL NaCl 1 M;
 - ⇒ 100 mL tampão pH 7,2;
- guardou-se o derivado enzimático imobilizado (**DEI**) em 20 mL de tampão pH 7,2.

3.2.12. Efeito da Temperatura sobre Atividade da Lipase do *Penicillium citrinum* no EPP e DEI

Determinou-se a temperatura ótima no **EPP** e **DEI** pelo método do pNPP, incubando-se a mistura de reação numa faixa de temperatura de 30 à 60°C, usando TRIS / HCl 50 mM, pH 7.2.

3.2.13. Efeito da Estabilidade Térmica da Lipase do *Penicillium citrinum* no EPP e DEI

A enzima foi pré-incubada sobre uma variação de temperatura de 30 à 60°C. O tempo de incubação das amostras foi de 60 min. Após, determinou-se a atividade da lipase pelo método pNPP a 37°C, usando TRIS / HCl pH 7.2.

3.2.14. pH Ótimo do EPP e DEI

Determinou-se o pH ótimo do **EPP** e **DEI** pelo método pNPP, variando-se o pH do substrato de 7,2 - 9,0 (**EPP**) e 3,0 - 9,0 (**DEI**), incubando-se a mistura de reação à 37°C. Utilizou-se Citrato de sódio 50 mM para a faixa de pH de 3,0 à 6,0 e TRIS/HCl 50 mM para faixa de 7,2 à 9,0.

3.2.15. Efeito da Concentração do Substrato sobre Atividade da Lipase do *Penicillium citrinum* no EPP e DEI

Utilizou-se soluções de pNPP a 37°C e pH 7.2 para a investigação da influência da concentração do substrato no meio de reação, variando-se a concentração do pNPP de 8 a 795 μ M de pNPP.

3.2.16. Efeito do Solvente sobre a Atividade da Lipase do *Penicillium citrinum* no EPP e DEI

Utilizou-se soluções de pNPP a 37°C e pH 7.2 para a investigação do efeito do isopropanol no meio de reação, variando-se a concentração do solvente na solução de pNPP / isopropanol de 0,1 a 10 % .

3.2.17. Reutilização do DEI

Fez-se 5 ensaios consecutivos durante um dia, lavando-se o **DEI** após cada ensaio com tampão TRIS/HCl 50 mM, pH 7,2. Determinou-se a atividade enzimática no **DEI** pelo método pNPP a 37° e pH 7.2 após cada vez utilizada.

3.2.18. Armazenamento do EPP e DEI

Fez-se a determinação da atividade enzimática da lipase do *Penicillium citrinum* no **EPP** e **DEI** pelo método pNPP (37° ; pH 7.2), com intervalos de 1, 11, 22, 29, 36 e 60 dias (**DEI**) e com 1 e 60 dias (**EPP**) após armazenados à 6 °C.

3.2.19. Extração dos Ácidos Graxos Livres no Rejeito/"Pitch"

(Fischer e Messner, 1992a; 1992b).

Em dois Erlenmeyers, incubou-se 20 g rejeito/"pitch" em 200 mL de tampão TRIS/HCl 50 mM, pH 7,2 contendo 0.025M CaCl₂ . Adicionou-se 4 mL de uma solução de *Candida rugosa* (5000 UI/mL) em apenas um dos Erlenmeyers. Ajustou-se a temperatura para 45°C por 12 horas sob agitação (300 rpm) (**FIGURA 14**) para os dois sistemas. Após incubação, filtrou-se e extraiu-se com acetona até completa exaustão. Secou-se sobre sulfato de sódio. Filtrou-se e evaporou-se em um evaporador rotativo. Dissolveu-se o "pitch" obtido em 50 mL de dietil éter e extraiu-se com 5 porções (50 mL cada) de NaOH 0,1 N em um funil de separação. As camadas de éter obtidas foram secas em sulfato de sódio, filtradas e evaporadas. Obteve-se a fração de éter com pouco ácido graxo. Acidificou-se com HCl concentrado as camadas de NaOH. Extraíu-se com 3 porções (50 mL cada) de dietil éter. Secou-se novamente com sulfato de sódio e evaporou-se. Obteve-se a fração de ácidos graxos livres. Para determinação desses ácidos utilizou-se o Método do Cobre (Kwon e Rhee, 1986).

3.2.20. **Método do Cobre** (Kwon e Rhee, 1986)

Determinou-se os ácidos graxos livres presentes na esterificação do ácido oleico com glicerol pela lipase do *Penicillium citrinum* no **EPP** e **DEI**, através do Método do Cobre (Kwon e Rhee, 1986).

REAGENTES: ácido oleico; isooctano; acetato cúprico e piridina.

REATIVO DE COBRE: solução aquosa de acetato cúprico 5% filtrada e com pH ajustado para 6,1 com piridina.

BRANCO: 0,5 mL do reativo de cobre em 3 mL de isooctano

PROCEDIMENTO:

Adicionou-se às amostras (200 μ L) retiradas, 2,9 mL de isooctano e 0,5 mL do reativo. Agitou-se por 90 segundos em vórtex. Leu-se a fase superior à 715 nm.

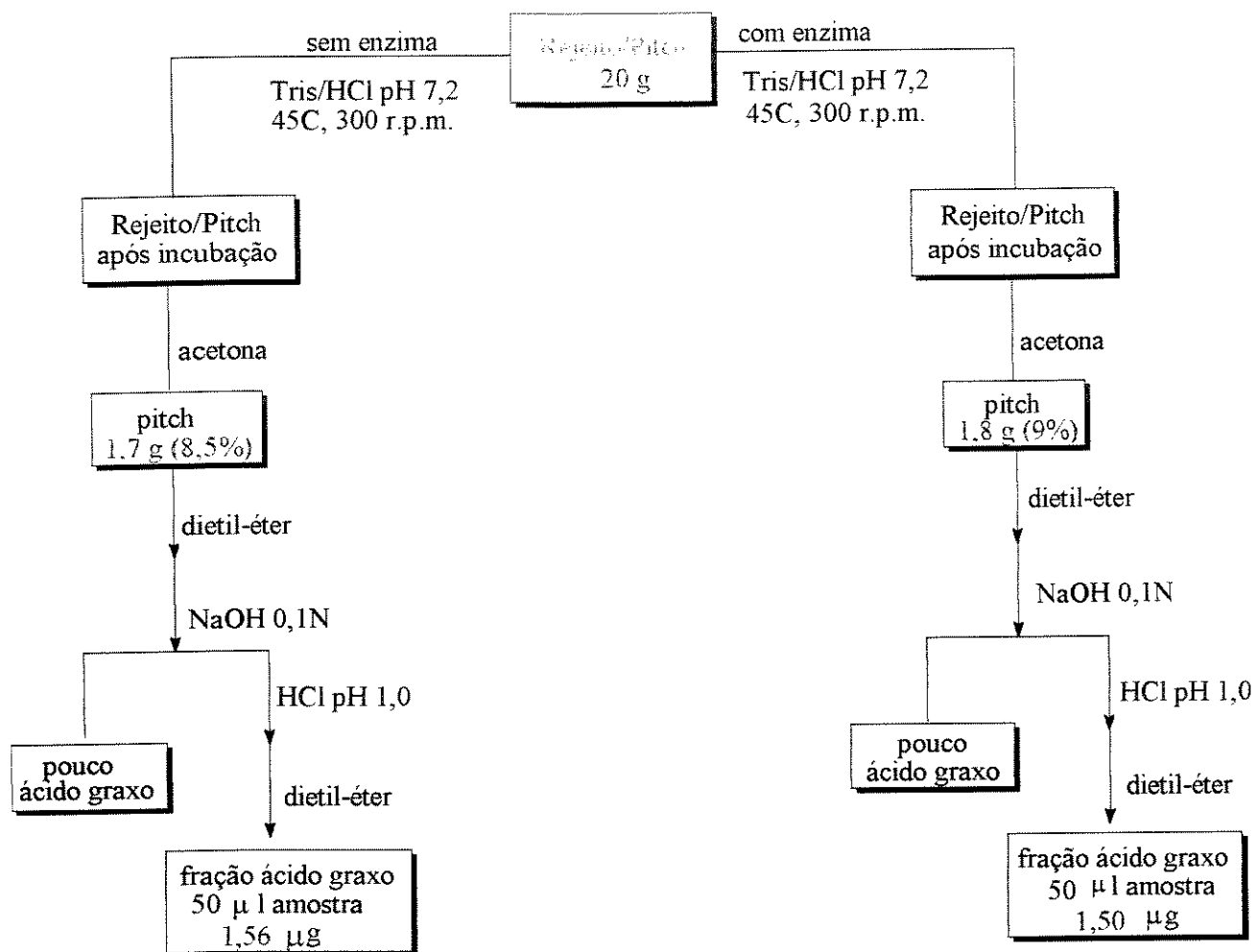


FIGURA 14 - Fluxograma de extração dos Ácidos Graxos

3.2.21. Hidrólise de Triglicerídeos (Fischer e Messner, 1992a; 1992b)

Fez-se a hidrólise de triglicerídeos em duas etapas. Na primeira, adicionou-se a três Erlenmeyers (250 mL cada um), 20 g de rejeito/"pitch" e 200 mL de tampão TRIS/HCl 50 mM, pH 7,2 contendo 0.025M CaCl_2 . Ajustou-se a temperatura para 30°C e incubou-se por 48 horas. Deixou-se duas suspensões sob agitação (300 rpm) e apenas em uma delas adicionou-se 4 mL de uma solução de *Candida rugosa* (5000 UI/mL). A terceira suspensão foi incubada sem adição de enzima e sem agitação e foi considerada como o "pitch" nativo. Filtrou-se as amostras

após incubação e extraiu-se com diclorometano até completa exaustão. Secou-se os filtrados com sulfato de sódio. Filtrou-se e evaporou-se em evaporador rotativo. Analisou-se os triglicerídeos hidrolisados pelo Método do Cobre (Kwon e Rhee, 1986) e por TLC (Park e Pastore, 1989).

Na segunda etapa, incubou-se 20 g rejeito/"pitch" em dois Erlenmeyers, sob agitação, com lipase de *Candida rugosa*. Ajustou-se as temperaturas para 30 e 45°C na água do banho. Retirou-se amostras após 1, 3, 6 e 12 horas para ambas temperaturas. Após incubação, filtrou-se e extraiu-se com diclorometano até completa exaustão. Analisou-se as amostras por HPLC e infravermelho.

Extraiu-se duas amostras de rejeito/"pitch" **in natura** (20 g cada) com diclorometano e acetona, respectivamente, até completa exaustão. Filtrou-se, evaporou-se e analisou-se as amostras por HPLC

3.2.22. Cromatografia em Camada Fina (TLC)

(Park e Pastore, 1989)

- ativou-se placas de sílica gel G (200 x 200 x 0,25 mm) impregnadas com ácido bórico 5% à 120°C durante 20 minutos;
- diluiu-se 50µL das amostras e dos padrões (trioleína e ácido oléico) em 1 mL de éter de petróleo (benzina de petróleo);
- aplicou-se 25 µL das amostras e dos padrões sobre a placa e deixou-se secar;
- desenvolveu-se o cromatograma no sistema de solventes:
15 mL de éter etílico : 85 mL éter de petróleo : 1 mL ác. acético
- retirou-se as placas do sistema de solventes e deixou-se secar à temperatura ambiente; e
- revelou-se com ácido sulfúrico 50 % à 120 °C por 20 minutos.

3.2.23. **Análise dos Triglicerídeos** (Akoh e col., 1992; Chang e col., 1994)

Analizou-se os triglicerídeos por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) considerando-se os parâmetros abaixo:

- detector UV-Visível: 205 nm;
- coluna analítica: Ultrasphere ODS (C₁₈);
- fase móvel: acetonitrila/acetona (34:66);
- velocidade de fluxo: 1,5 mL/min;
- amostras: evaporou-se 200 µL de cada amostra em nitrogênio gasoso e redissolveu-se-as em acetona (1:26);
- volume injetado das amostras: 20 µL;
- padrões: trioleína e ácido oléico

3.2.24. **Efeito da Agitação Sobre a Atividade Enzimática da Lipase de *Candida rugosa***

Solubilizou-se 24 mg de *Candida rugosa* em 4 mL de tampão TRIS/HCl pH 7,2. Deixou-se a enzima solúvel sob agitação constante (200 rpm) à 30°C. Retirou-se amostras com 0; 1; 2; 3; 4 e 5 horas. Determinou-se a atividade enzimática pelo Método pNPP em tampão TRIS / HCl pH 7,2 à 45°C

3.2.25. **Identificação de Extrativos Lipofílicos e Hidrofílicos**

Fez-se necessário dividir o trabalho em etapas para identificação de extrativos lipofílicos e hidrofílicos.

PRIMEIRA: tratou-se amostras (10 g) rejeito / "pitch" de Eucalyptus em acordo com a **FIGURA 15**. Fez-se a extração com solventes até completa exaustão. Filtrou-se e secou-se sobre sulfato de sódio. Filtrou-se novamente e evaporou-se em um evaporador rotativo. Após evaporação e liofilização das amostras provenientes dos extrativos hidrofílicos,

secou-se em nitrogênio gasoso as amostras utilizadas para análises de espectroscopia no Infravermelho.

SEGUNDA: rejeito/"pitch" (5 gramas) foram extraídas com soluções de NaOH nas concentrações 0,1; 0,2; 0,5 e 2,0 N, sob agitação. Acidificou-se com HCl 6 N (pH em torno de 1) o filtrado obtido com a polpa extraída com 0,1N de NaOH e adicionou-se 50 mL de éter dietílico em um funil de separação. Secou-se sobre sulfato de sódio a camada orgânica e evaporou-se. Obteve-se a fração com ácidos graxos. Re-extraiu-se o rejeito / "pitch" com acetona, filtrou-se e evaporou-se. Analisou-se por Infravermelho todas as amostras obtidas, e por GC-MS as amostras extraídas com NaOH (0,1; 0,5 e 2,0 N).

TERCEIRA: 10 gramas de rejeito / "pitch" foram submetidas a uma extração seletiva com solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, diclorometano e acetona) e por último com água. Os filtrados obtidos foram evaporados. Liofilizou-se o filtrado obtido com a água. Analisou-se as amostras por IV. As amostras extraídas com hexano e diclorometano também foram analisadas por GC-MS.

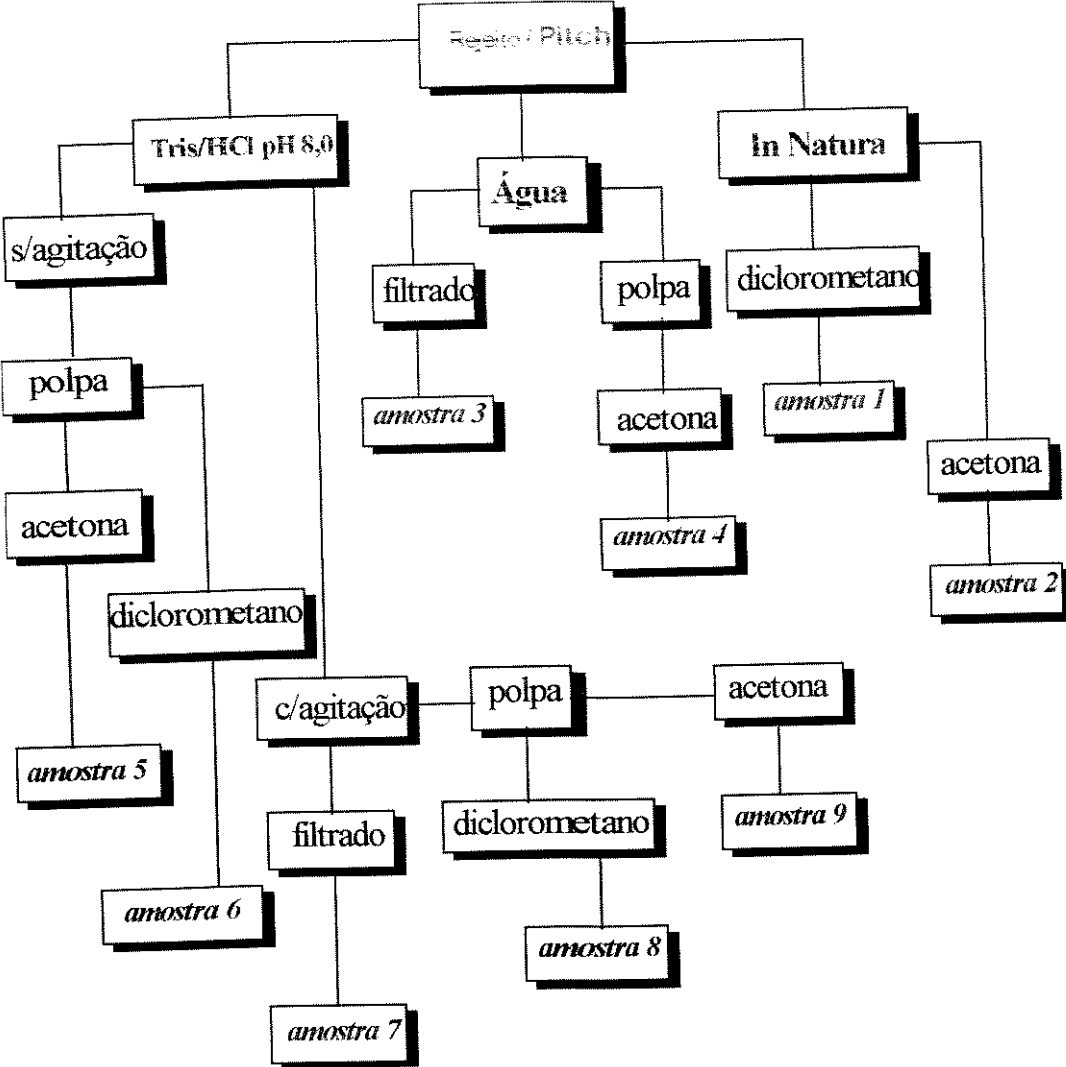


FIGURA 15 - Fluxograma de Extrativos Hidrofílicos e Lipofílicos
Obtidos a partir de amostras rejeito / “pitch”

3.2.26. Esterificação de Ácidos Graxos (Maia, 1992)

REAGENTE DE SAPONIFICAÇÃO

Solução 0,5 N NaOH em metanol (MeOH) p.a.;

REAGENTE ESTERIFICANTE (solução de NH_4Cl - H_2SO_4 -MeOH)

Em um balão de fundo redondo e boca esmerilhada, adicionou-se 10 g de cloreto de amônio (NH_4Cl) em 300 mL de metanol. Adicionou-se lentamente 15 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (agitação manual). Adaptou-se o balão a um condensador e deixou-se essa mistura em refluxo até dissolução completa do cloreto de amônio (15-20 min.). Utilizou-se um sistema de aquecimento (chapa, manta, etc.) com reostato para controle da temperatura, que deve ser estabilizada quando a ebulição iniciar-se. O reagente é estável por várias semanas.

AMOSTRA: 30-100 mg

PROCEDIMENTO

- adicionou-se em tubos de ensaio com tampa de rosca 30 mg de amostra e 4 mL do reagente de saponificação;
- fechou-se bem o tubo e aqueceu-se em um banho de água fervente por 3 - 5 minutos. Esfriou-se o tubo em água corrente;
- adicionou-se 5 mL do reagente de esterificação. Agitou-se, fechou-se o tubo e aqueceu-se no banho de água fervente por 5 minutos. Esfriou-se o tubo em água corrente;
- adicionou-se 4 mL de solução salina saturada e agitou-se em vórtex por 60 segundos. Deixou-se em repouso para separação das fases;
- adicionou-se 5 mL de hexano ou éter de petróleo e agitou-se novamente em vórtex por 60 segundos;
- transferiu-se a fase superior (fase orgânica) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para um frasco com tampa;

- manteve-se no freezer e em frascos escuros o sobrenadante (onde se encontram os ésteres metilados), que posteriormente foram injetados no cromatógrafo.

3.2.27. Cromatografia Gasosa com Detector de Massa

Fixou-se os seguintes parâmetros de operação:

- Energia de ionização: 70 ev;
- solventes: Hexano e Acetato de etila;
- volume injetado: 1 μ L;
- temperatura do injetor: 250°C;
- temperatura da linha de transferência: 280°C;
- temperatura inicial: 50°C;
- tempo inicial: 3 minutos;
- velocidade de aquecimento: 10°C/min;
- temperatura final: 300°C;
- tempo final: 33 minutos.

3.2.28. Polpas

Para uma melhor compreensão das características do “pitch”, adquiriu-se polpas em épocas diferenciadas. Amostras rejeito / “pitch” na Primavera de 1994 utilizadas nos experimentos anteriores e, as de polpa no Verão 1995/1996. Separou-se quatro frações e adicionou-se solventes em acordo com a **FIGURA 16**. Filtrou-se e evaporou-se as amostras obtidas.

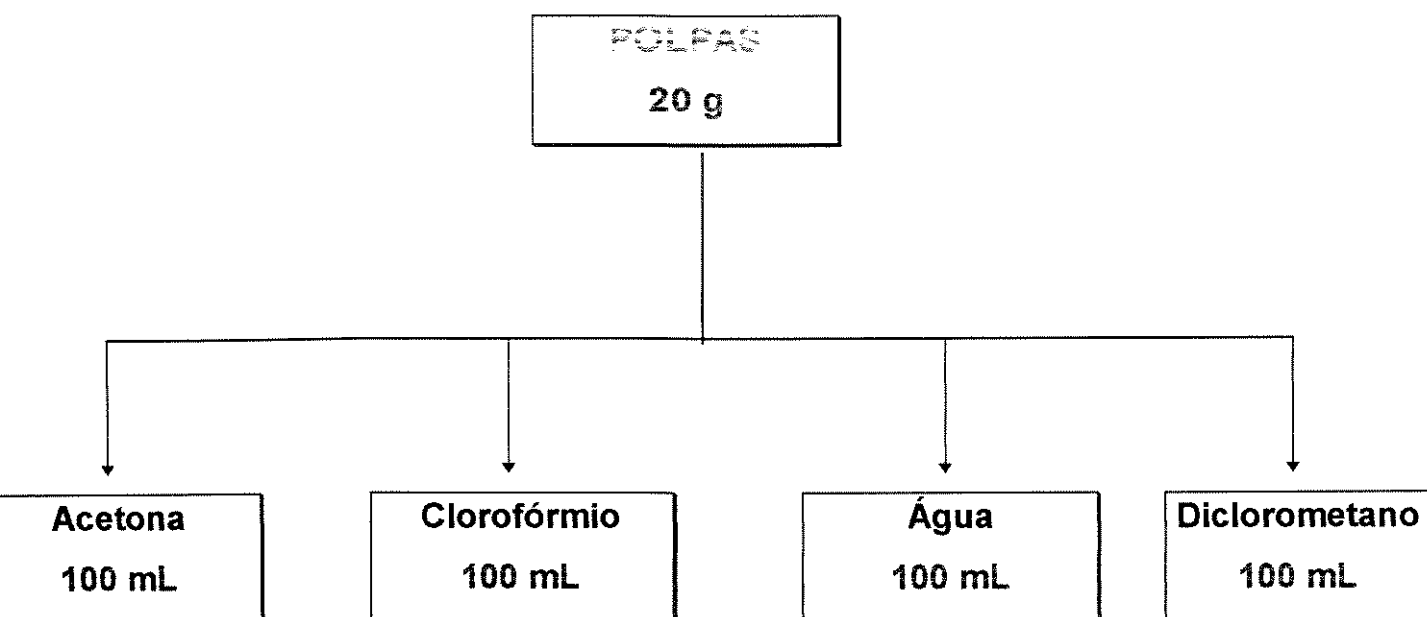


FIGURA 16 - Extração do “pitch” na Polpa de *Eucalyptus*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE ENZIMAS

4.1.1. PRODUÇÃO

Lipases foram produzidas a partir do *Penicillium citrinum* no Meio líquido de Extrato de Levedura (**MEL**), e no Meio Líquido de Sulfato de Amônio (**MSA**), apresentando no máximo de produção da atividade lipolítica extracelular um pH em torno de 2,2 - 3,0 (**MSA**), e 6,5 - 7,8 (**MEL**) (Vide 3.2.3.). A morfologia do *Penicillium citrinum* apresentou-se esférica no meio **MEL**, enquanto no **MSA** mostrou-se filamentosa e com aspecto turvo (**FIGURA 17**). De acordo com Pimentel (Pimentel, 1995), quando alterou-se o pH do **MSA** para 6,5 com NaOH e do meio **MEL** para 4,5 com tampão, a morfologia do fungo no **MSA** foi a mesma apresentada que no **MEL**, e a deste, a mesma apresentada que no **MSA**, indicando que o pH é um importante parâmetro para alterar a morfologia do fungo.

Dentre os dois meios escolheu-se o **MSA**, por sua atividade específica ter sido maior que a obtida com o **MEL** ao final da fermentação (**TABELA VI**), como também pelos resultados obtidos através da eletroforese SDS-page (Pimentel, 1996), que mostraram que o meio **MSA** apresentara menos bandas que a lipase produzida pelo meio **MEL**. Esses resultados podem indicar que a lipase produzida pelo meio **MSA** é mais livre de proteínas que compõem o meio de cultura, portanto mais pura (Vorderwülbecke e col., 1992; Linko e Yan Wu, 1996) e menos propícia a contaminações.

Utilizou-se o método do pNPP (Vide 3.2.5.) para se determinar a atividade enzimática das lipases produzidas em ambos os meios, devido

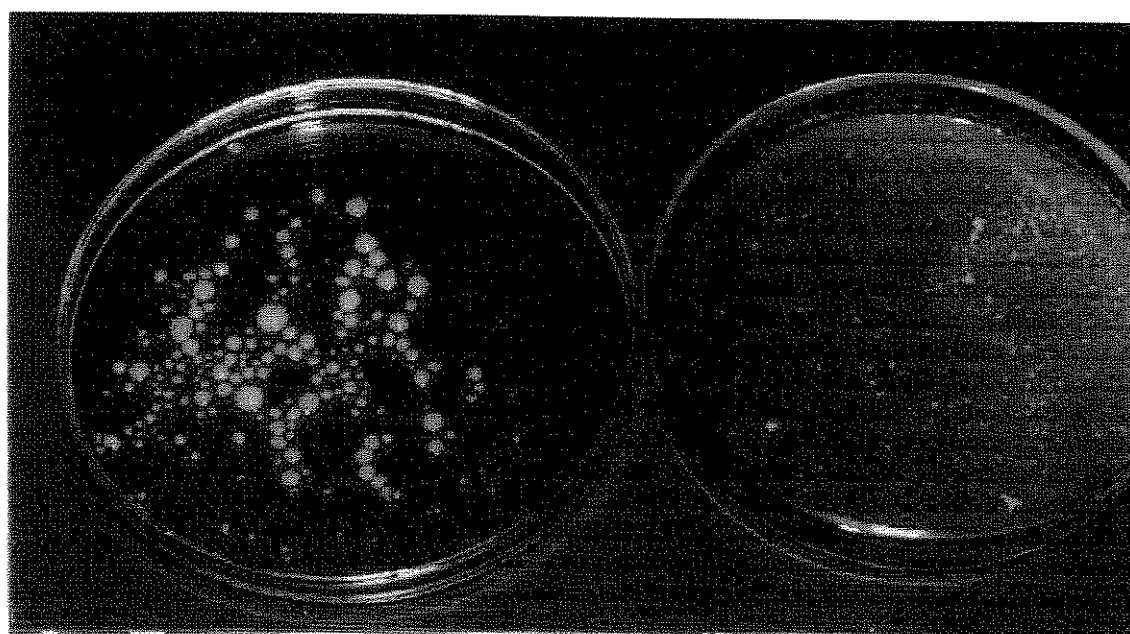
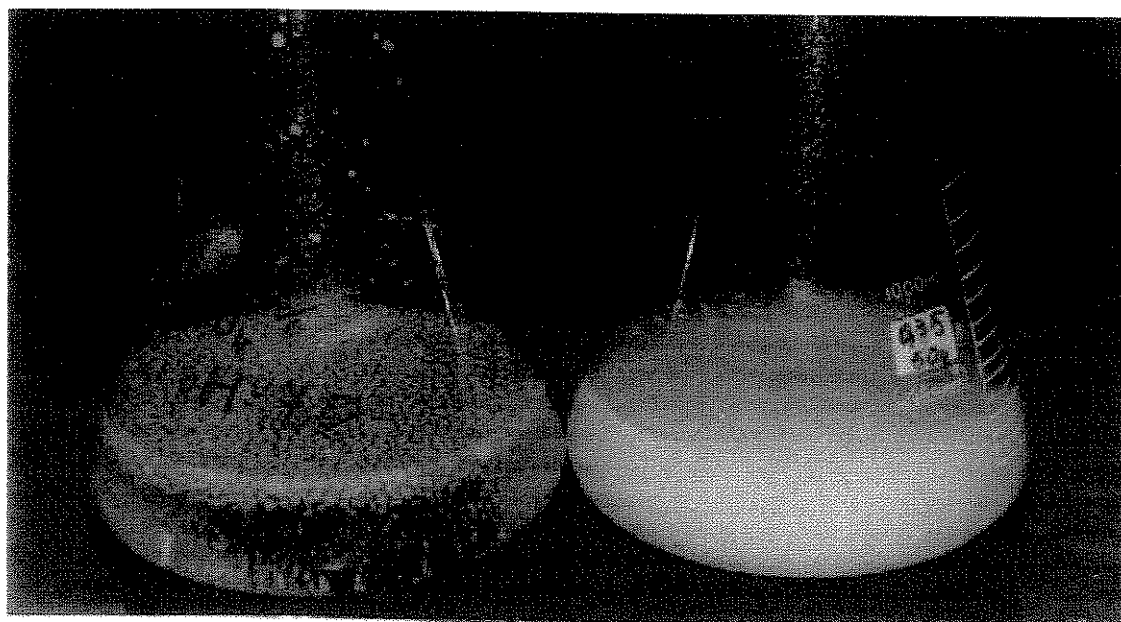
aos resultados obtidos por Pimentel e col. (1994), que mostraram que a atividade específica da lipase do *Pencillium citrinum* apresentada pelo pNPP (11,27 U / mg de proteína) ficou muito próxima da atividade específica (11,0 U / mg de proteína) apresentada pelo método titulométrico, que hidrolisou os triglicerídeos presentes no óleo de oliva liberando ácidos graxos.

Lipases não só hidrolisam ligações éster de triglicerídeos, como também ligações de ésteres sintéticos como os p-Nitrofenil de acetato e palmitato (Brahim-Horn e col., 1990). De acordo com Vorderwülbecke e col. (1992) não existe um método padrão para se determinar a atividade de lipases com substratos diferentes. Enzimas que hidrolisam trioleína sempre hidrolisarão ésteres sintéticos, embora o inverso nem sempre seja verdadeiro.

TABELA VI - Atividade específica das Lipases do *Penicillium citrinum* no **MSA** e **MEL**

(Condições experimentais Vide 3.2.5 e 3.2.6.)

MEIO DE CULTURA	MEL	MSA
Atividade Específica (U/mg de proteína)	0.4	0.7



A

B

FIGURA 17 - Morfologia do *Penicillium citrinum* após Fermentação
(Pimentel, 1995)

(A) MEL - esférica

(B) MSA - filamentosa

Condições experimentais Vide 3.2.3.

4.1.2. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E ARMAZENAMENTO

Para precipitar-se a lipase no filtrado do meio de cultura **MSA**, inicialmente utilizou-se sulfato de amônio (Vide 3.2.4.). Entretanto, este procedimento não mostrou-se satisfatório devido a grandes perdas de proteínas. Com o uso de membranas de ultrafiltros da Milipore para concentrar-se o meio (10 vezes), os resultados foram bastante satisfatórios (**TABELA VII**). A membrana serviu tanto para concentrar quanto purificar parcialmente o meio (**TABELA VIII**).

Observou-se que mantendo-se a lipase no próprio extrato parcialmente purificado à 6 °C, sua atividade após 60 dias manteve-se inalterada (**TABELA IX**). Com a liofilização, observou-se uma grande perda da atividade lipolítica, chegando a desnaturação após 2 descongelamentos consecutivos com posterior liofilização. Resultado não obtido por Pimentel (1995), que obteve 15 % da atividade lipolítica inicial após quatro descongelamentos.

TABELA VII - Atividade Específica do **MSA** após Purificação Parcial com Sulfato de Amônio e com Membranas da Ultrafiltro
(Condições experimentais Vide 3.2.4.)

MSA	ATIVIDADE ESPECÍFICA Amostra A	ATIVIDADE ESPECÍFICA Amostra B
Extrato Bruto	0.55 UI/mg de proteína	0.38 UI/mg de proteína
EPP		
Sulfato de Amônio (80 % saturação)	0.70 UI/mg de proteína	_____
EPP		
Ultrafiltros	_____	0,85 UI / mg de proteína
Purificação (vezes)	1	2
Rendimento (%)	12,7	22,4

TABELA VIII - Atividade Relativa do Extrato Parcialmente Purificado (**EPP**) e do Filtrado após Purificação com Ultrafiltros (Condições experimentais Vide 3.2.4.)

MSA	PROTEÍNA	ATIVIDADE RELATIVA
EPP	1.24 mg / mL	0.53 UI / mL
Filtrado do EPP após Purificação com Ultrafiltros	0.92 mg / mL	_____

TABELA IX - Armazenamento da Lipase do *Penicillium citrinum* no Extrato Parcialmente Purificado (**EPP**) à 6 °C.

DIAS	ATIVIDADE ESPECÍFICA
1	0,41 UI / mg de proteína
60	0,47 UI / mg de proteína

4.1.3. PROPRIEDADES DO EXTRATO PARCIALMENTE PURIFICADO (EPP) DO MSA DA LIPASE DO *Penicillium citrinum*

O pH ótimo da lipase do *Penicillium citrinum* no **MSA** ficou entre 8,0 - 8,5 (**FIGURA 18**) e a temperatura ótima foi de 37 °C (Vide **FIGURA 20**), resultados que estão de acordo com Pimentel (1995). Quanto a termoestabilidade, a lipase do *Penicillium citrinum* ficou praticamente inativa ao ser incubada durante 1h a 60 °C (Vide **FIGURA 21**).

As lipases obtidas de diferentes cepas do *Geotrichum candidum* tiveram seus pHs ótimos na faixa de 8,0 a 8,5 (Hedrich e Spener, 1991) e, as lipases de *Rhizopus sp* mostraram atividade máxima em pH 8,0 à 37 °C (Rucka e Turkiewicz, 1990). Já as lipases do *Rhizopus japonicus* NR 400 tiveram seus pHs ótimos em torno de 5 na ausência de albumina e, entre 3 e 8 à medida que se adicionava 0,01 % da mesma (Suzuki e col., 1986) após cada determinação do pH.

De acordo com Malcata e col. (1992), uma grande parte das lipases de origem animal exibem pH ótimo na faixa alcalina (entre 8 e 9). Entretanto, dependendo do substrato usado, da presença de sais e do tipo de emulsificantes presentes, o pH ótimo pode mudar para faixa ácida. A maioria das lipases microbianas têm sua atividade máxima entre 5,6 e 8,5. Em relação a temperatura, o ótimo varia entre 30 e 40 °C. A termoestabilidade das lipases variam consideravelmente, dependendo da sua procedência. Lipases de origem animal e vegetal são geralmente menos termoestáveis do que as lipases microbianas.

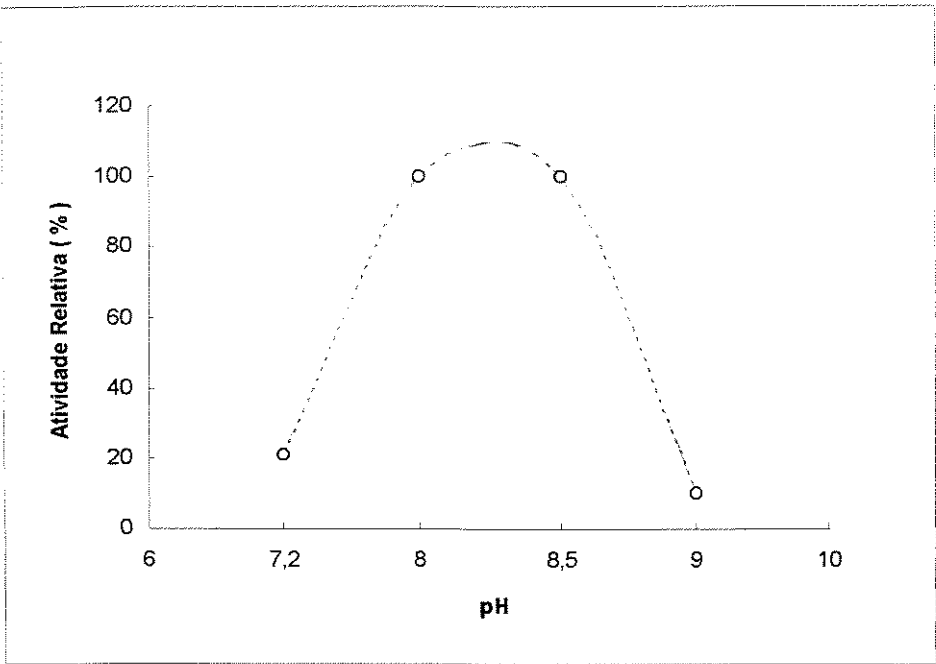


FIGURA 18 - Curva de pH da Lipase do *Penicillium citrinum* no **EPP**
Atividade Lipolítica (Método pNPP) à 37 °C no Tampão
TRIS/HCl 50 mM pH 7,2 - 9,0
(Condições experimentais Vide 3.2.14.)

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE IMOBILIZAÇÃO

4.2.1 CARACTERÍSTICAS DO DACRON MAGNETIZADO

A hidrazinólise do dacron (**FIGURA 19**) transformou-o da forma de filme para pó, cujas partículas variaram consideravelmente de tamanho. Observou-se que o tempo de reação da hidrazinólise é quem reduz o tamanho das moléculas do polímero ao hidrolizar as ligações tipo éster entre os monômeros que o constituem. Algumas partículas, menores que 63 μm , obtidas com 72 horas e em menor percentual com 48 horas de reação (Carneiro Leão, 1992), embora magnetizadas, são difíceis de serem recuperadas pelo imã, perdendo-se facilmente nos processos de lavagem. Por isso necessitou-se fazer uma eliminação de partículas em suspensão antes da magnetização.

Obteve-se dacron-hidrazida magnetizado com sucesso a partir de reações entre os íons férricos e ferrosos em pH alcalino, o qual foi rapidamente separado do meio reacional durante as lavagens e após a imobilização, com um campo magnético. De acordo com Tamaura e col. (1986), a reação entre esses íons produziria magnetita (Fe_3O_4) que seria adsorvida irreversivelmente à superfície do suporte. A magnetita é considerada um óxido misto de ferro, pois apresenta em sua estrutura cristalina íons férricos e ferrosos, podendo ser obtida por aquecimento do ferro na presença de oxigênio ou por aquecimento do óxido de ferro a 1.000°C, sob vácuo.

De acordo com o Laboratório de Difração de Raios X e Espectrometria (Departamento de Engenharia de Minas, UFPE), o óxido de ferro sintetizado neste trabalho apresentou estrutura compatível com γ -maghemita (γ - Fe_2O_3) (Carneiro Leão, 1992), que é considerada

como magnetita cátion deficiente, ou seja, como uma variante da estrutura cristalina da magnetita (Lindley, 1976).

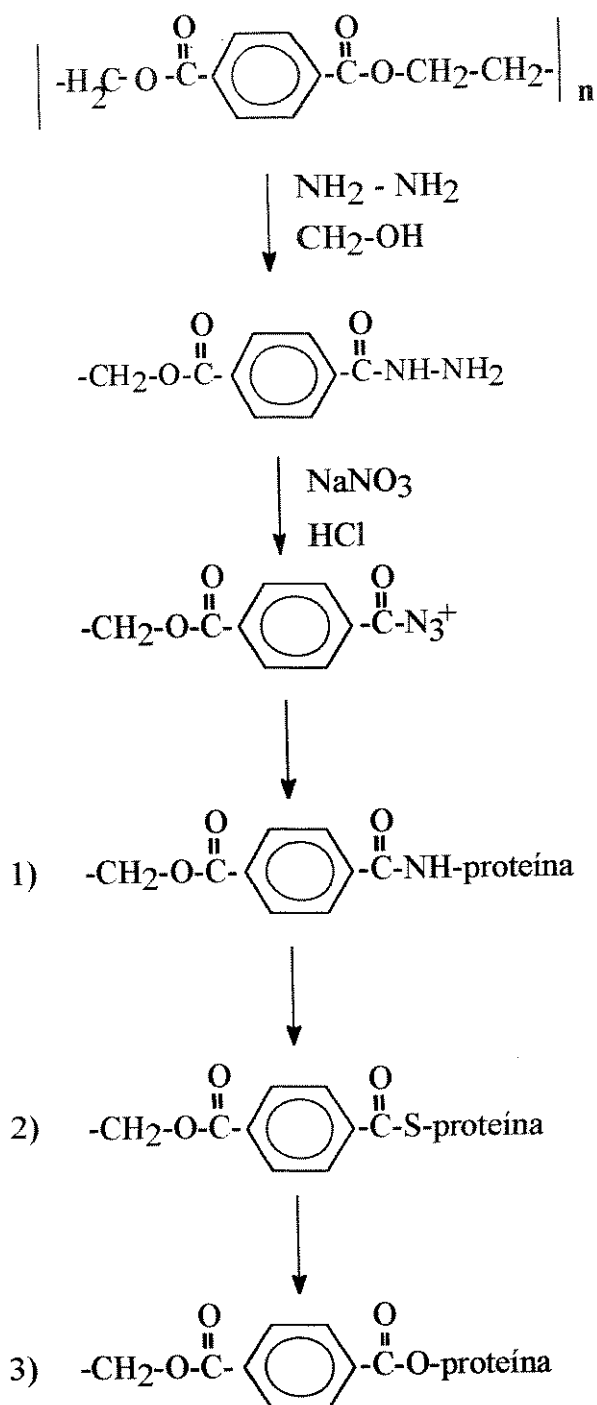


FIGURA 19 - Esquema de ativação do dacron-hidrazida e possíveis ligações destes derivados com a proteína imobilizada.
(Condições experimentais Vide 3.2.7 à 3.2.11)

4.2.2. IMOBILIZAÇÃO

Lipases do *Penicillium citrinum* foram fixadas ao suporte, dacron-hidrazida magnetizado, provavelmente devido aos grupos azidas introduzidos pela modificação química dos mesmos (**FIGURA 19**). Entretanto, Oliveira e Carvalho Jr. (1989) não detectaram a presença de grupos azidas no polímero quando usaram o método de Anton modificado. Ou o método não responde ao suporte em estudo, ou esses grupos por não serem muito estáveis são liberados durante a etapa de ativação do suporte.

Os resultados mostraram que 19 mg do extrato parcialmente purificado (**EPP**) do meio de sulfato de amônio (**MSA**) foram imobilizados por grama do suporte após 3 horas de incubação, mostrando uma atividade específica em torno de 73 % da enzima solúvel. Oliveira e col. (1989) também obtiveram um alto percentual de retenção ao imobilizarem amiloglucosidade em dacron. A lipase de *Candida rugosa* teve 10 % de retenção em pérolas de vidro (Nadruz e col., 1994), 2,4% e 3 a 21 % em microporos de polipropileno (Virto e col., 1994; Montero e col., 1993), respectivamente.

Para se evitar a adsorção da lipase, que deve ser predominantemente por forças hidrofóbicas, fez-se necessárias sucessivas lavagens do derivado não somente com solução de cloreto de sódio 1 M (Carneiro Leão e col., 1991), como também com detergente Triton X - 100, já que o último é um dos componentes usado na determinação da atividade enzimática. A **TABELA X** mostra os dados da enzima solúvel e imobilizada do *Penicillium citrinum*.

TABELA X - Dados da Lipase do *Penicillium citrinum* no **EPP** (solúvel)
e **DEI** (imobilizada)
(Condições experimentais Vide 3.2.5; 3.2.12. e 3.2.14.)

ENZIMA	SOLÚVEL	IMOBILIZADA
Atividade	0,56 UI / mg de proteína	0,41 UI / mg de proteína
Temperatura (°C)	37	37
pH	8,0 - 8,5	8,5

4.2.3. ALGUMAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DA LIPASE DO *PENICILLIUM CITRINUM* NO EXTRATO PARCIALMENTE PURIFICADO (EPP) E NO DERIVADO ENZIMÁTICO IMOBILIZADO (DEI)

4.2.3.1. Temperatura Ótima e Estabilidade Térmica

FIGURA 20 mostra a temperatura ótima para a lipase do *Penicillium citrinum* solúvel e imobilizada. Para ambos os sistemas, a temperatura de 37 °C foi o melhor perfil encontrado.

Observou-se que ao incubarmos a lipase do *Penicillium citrinum* presente no **EPP** (solúvel) e no **DEI** (imobilizada) a diferentes temperaturas durante 1 hora (**FIGURA 21**), o **DEI** mostrou-se mais termoestável do que a enzima solúvel, permanecendo com 60 % de sua atividade a 50 °C, embora a 60 °C, ambas foram praticamente inativadas.

Resultados com *Candida rugosa* imobilizadas em microporos de polipropileno mostraram que a enzima praticamente foi inativada quando submetida às mesmas condições (Montero e col., 1993).

De acordo com Malcata e col. (1992), a estabilidade térmica das lipases depende da presença ou não de substrato, já que o mesmo pode remover o excesso de água nas vizinhanças da enzima restringindo sua mobilidade conformacional. Se o dacron magnetizado atuar como uma barreira entre a enzima e o substrato, a remoção de água nesse microambiente pelo substrato poderá não ocorrer, deixando a enzima mais livre (Rucka e Turkiewicz, 1990) e portanto mais disponível para reagir com o substrato. Essa mobilidade conformacional poderia justificar a estabilidade térmica e a alta atividade específica do **DEI**.

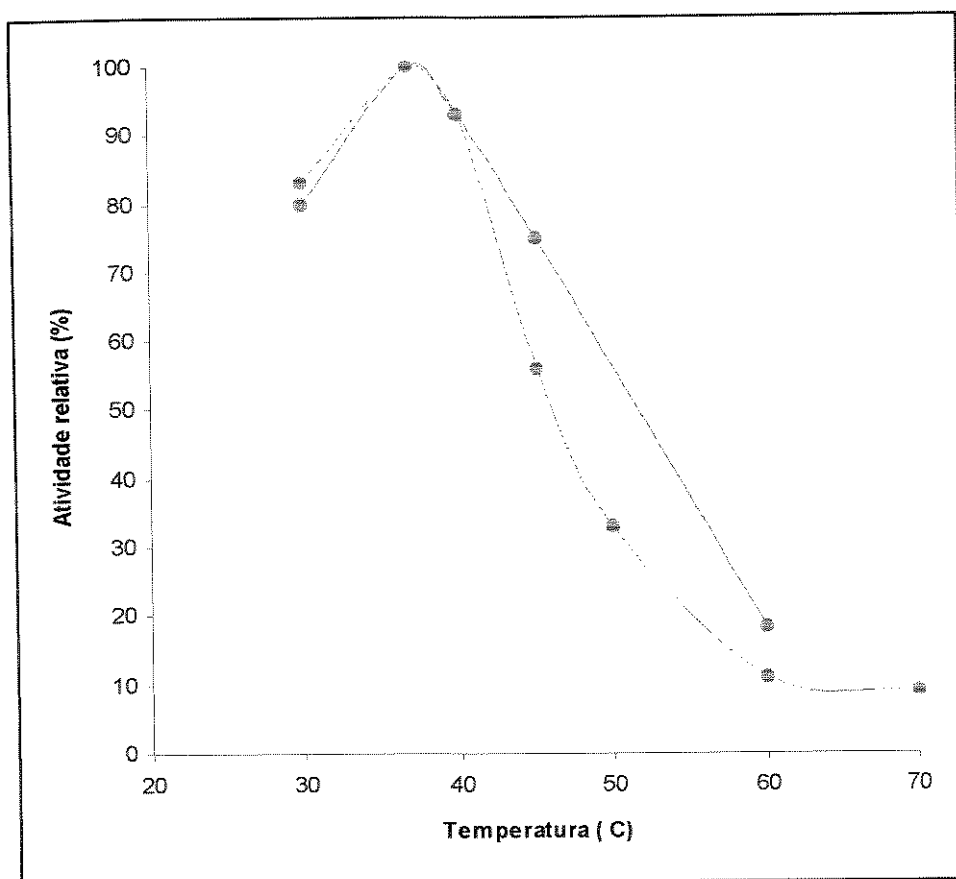


FIGURA 20 - Temperatura Ótima do Extrato Parcialmente Purificado (EPP) e do Derivado Enzimático Imobilizado (DEI)

- EPP (solúvel)
- DEI (imobilizada)

(Condições experimentais Vide 3.2.12.)

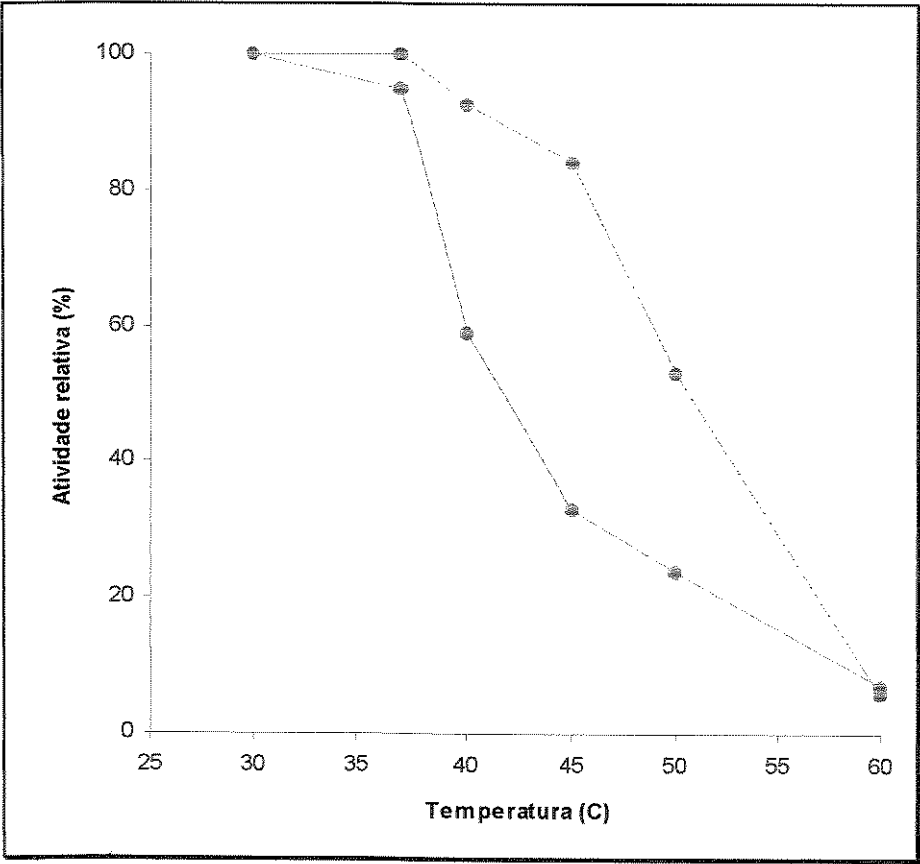


FIGURA 21 - Estabilidade Térmica do Extrato Parcialmente Purificado (EPP) e do Derivado Enzimático Imobilizado (DEI)

- EPP (solúvel)
- DEI (imobilizada)

(Condições experimentais Vide 3.2.13.)

4.2.3.2. EFEITO DO pH SOBRE O DEI

A lipase imobilizada incubada em diferentes valores de pH mas com força iônica similar (50 mM), mostrou sua atividade máxima em pH 8.5 (**FIGURA 22**), enquanto a solúvel manteve-se ativa na faixa de 8.0 - 8.5 (**TABELA X**). Resultado similar foi obtido com *Candida rugosa* em microporos de polipropileno (Montero e col., 1993). A enzima solúvel mostrou-se ativa na faixa de pH 6.2 - 7.7 e a imobilizada em pH 6.8.

De acordo com Macalta e col. (1992), com poucas exceções, o pH ótimo para lipases imobilizadas é igual ou maior do que para as solúveis. A imobilização parece ceder importantes resíduos aminoácidos básicos cataliticamente importantes. Ou seja, após a imobilização, o sítio ativo torna-se mais exposto ao solvente do que estava na forma solúvel e, a transferência de prótons para resíduos aminoácidos no sítio ativo da enzima torna-se menos impedido.

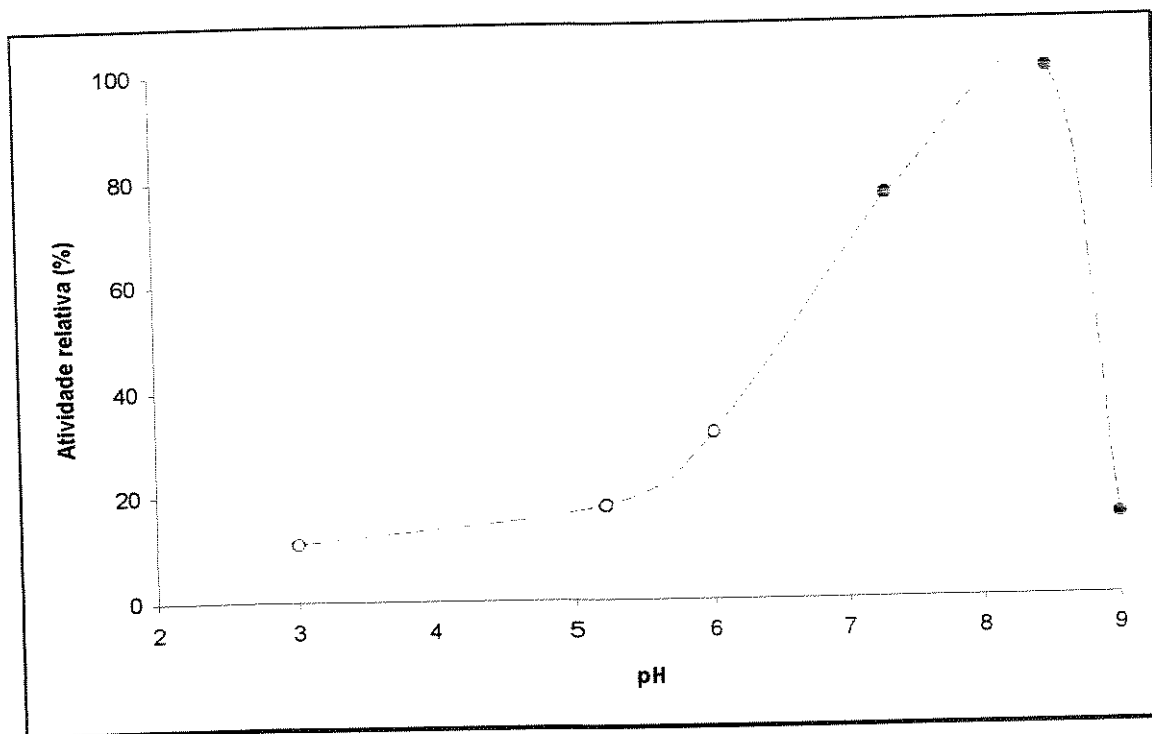


FIGURA 22 - Curva de pH da Lipase do *Penicillium citrinum* no DEI

Atividade Lipolítica (Método pNPP) à 37 °C nos Tampões:

○ Citrato de Sódio 50 mM pH 3,0 - 6,0

● TRIS / HCl 50 mM pH 7,2 - 9,0

(Condições experimentais Vide 3.2.14.)

4.2.3.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO E DO SOLVENTE SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA SOLÚVEL E IMOBILIZADA

Sabe-se que a atividade lipolítica é função da concentração na interface, ou seja, da área interfacial por unidade de volume de uma mistura de reação. Entretanto, para se conhecer a área interfacial durante a reação, necessita-se de equipamento especializado (O'Connor e Bailey, 1988). Por isso, no nosso sistema, observou-se o efeito da concentração do

substrato sobre a atividade lipolítica e calculou-se K_m . O K_m da lipase (emulsão) corresponde a um certo valor dessa concentração na interface (Benzonana e Desnuelle, 1965).

Usando pNPP como substrato (37°C , pH 7,2), a enzima solúvel e imobilizada apresentou uma cinética segundo Michaelis-Menten. A lipase solúvel mostrou K_m aparente de $235\ \mu\text{M}$ e $V_{\text{máx}}$ 0,99 UI/mg de proteína, enquanto a lipase imobilizada mostrou K_m de $281\ \mu\text{M}$ e $V_{\text{máx}}$ 0,56 UI/mg de proteína (**FIGURAS 23 e 24**). Os valores obtidos para o K_m parecem indicar que a imobilização não afeta a afinidade da enzima pelo substrato, embora possa indicar uma maior afinidade da lipase solúvel pelo mesmo.

Os resultados também indicam que a variação da concentração do pNPP não afetou a atividade lipolítica da enzima solúvel e imobilizada até a concentração $795\ \mu\text{M}$ (**TABELA XI**). Entretanto, ao variarmos as proporções de álcool isopropanol no substrato (**TABELA XII**), observou-se uma inibição significativa da enzima solúvel com soluções acima de $636\ \mu\text{M}$, enquanto a imobilizada não demonstrou uma alta inibição na mesma faixa de concentração (**FIGURAS 25 e 26**). Carta e col. (1992) ao observarem uma inibição com etanol em concentrações acima de 0,2 M, sugeriram que os substratos polares ao se acumularem no microambiente aquoso que envolve a enzima (por serem solúveis em água), podem chegar a um nível de concentração extremamente tóxico para a mesma, causando sua desnaturação. De acordo com Warmuth e col. (1994), essa inibição também poderia ser explicada pelo declínio na concentração de água na vizinhança da enzima em altas concentrações do substrato, principalmente pela enzima solúvel. Kwon e Rhee (1987) atribuíram a inibição do substrato a um aumento na hidrofobicidade do sistema, já que o volume e a interface da fase orgânica são variados. A

inibição seria o resultado das interações entre a tributirina (no sistema deles) e a lipase, ou seja, excesso de substrato.

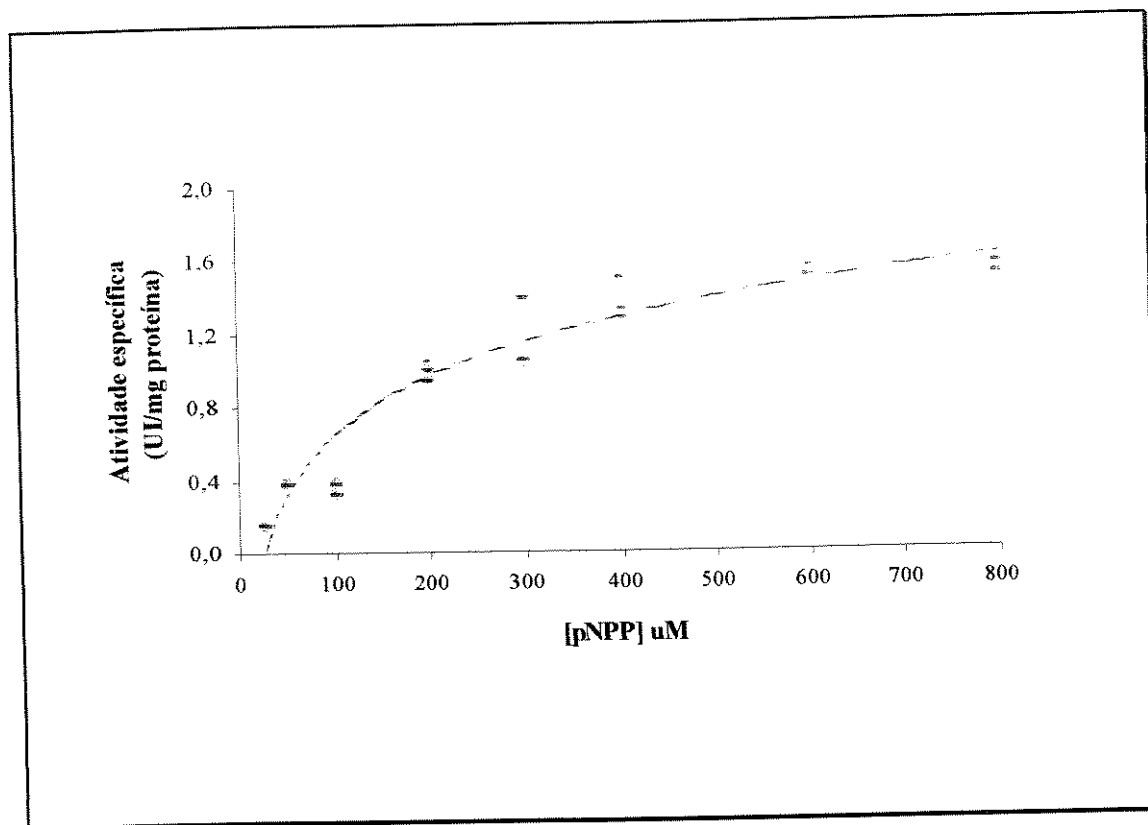


FIGURA 23 - Efeito da Concentração do pNPP sobre a Lipase do *Penicillium citrinum* no **EPP** (solúvel) à 37 °C e pH 7.2
Concentração do pNPP 8 a 795 μM
(Condições experimentais Vide 3.2.15.)

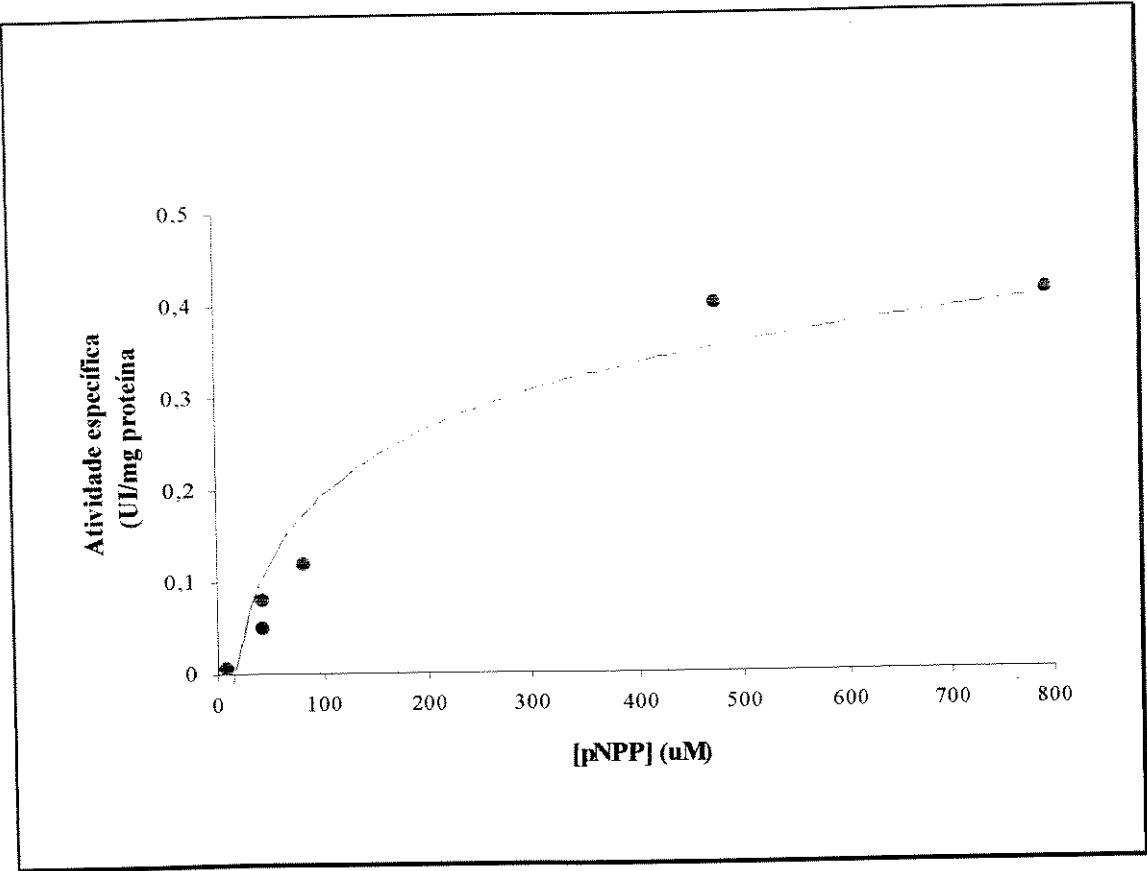


FIGURA 24 - Efeito da Concentração do pNPP sobre a Lipase do *Penicillium citrinum* no DEI (imobilizada) à 37 °C e pH 7.2
Concentração do pNPP 8 a 795 μ M
(Condições experimentais Vide 3.2.15).

TABELA XI - Variação da Concentração do pNPP na Solução A usada no Método pNPP.

(Condições experimentais Vide 3.2.5.)

CONCENTRAÇÃO COMPONENTES (%)	795	636	477	318	159	80	40	8
TRITON x - 100	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
GOMA ARÁBICA	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
pNPP	0,030	0,024	0,018	0,012	0,006	0,003	0,0015	0,0003
ISOPROPANOL	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

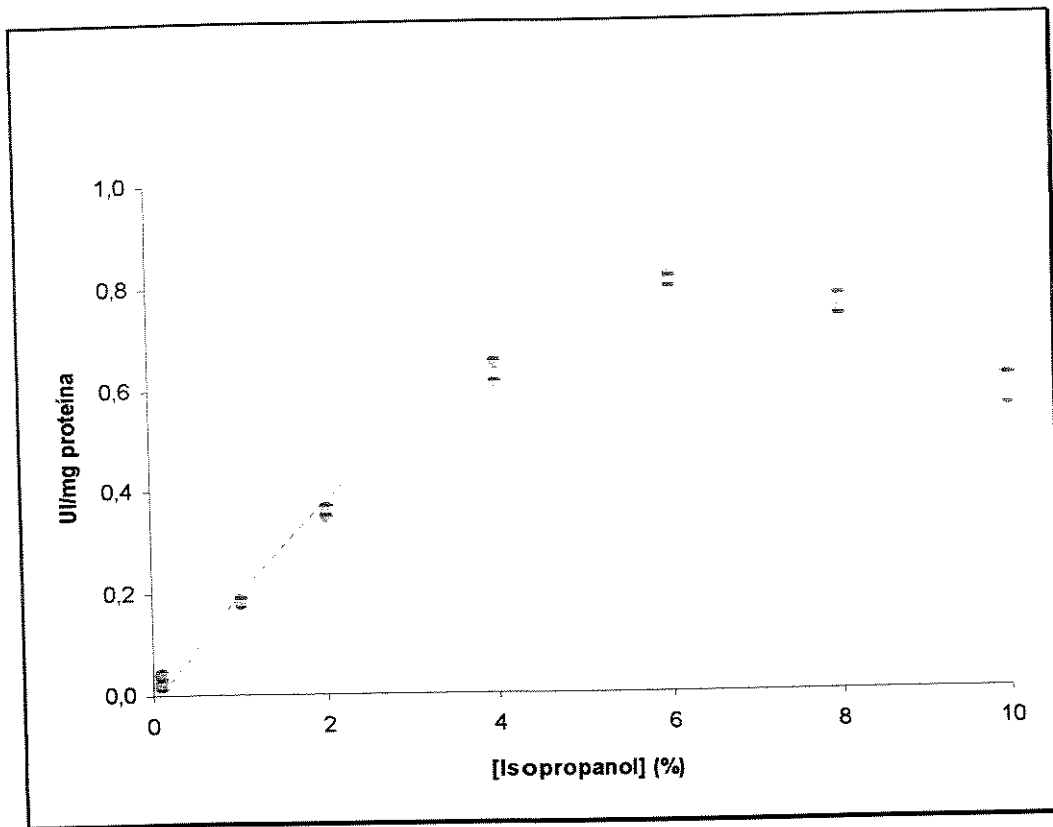


FIGURA 25 - Efeito do Isopropanol sobre a Lipase do *Penicillium citrinum* no **EPP** (solúvel) à 37 °C e pH 7.2.
Concentração do isopropanol de 0.1 a 10 %
(Condições experimentais Vide 3.2.16.)

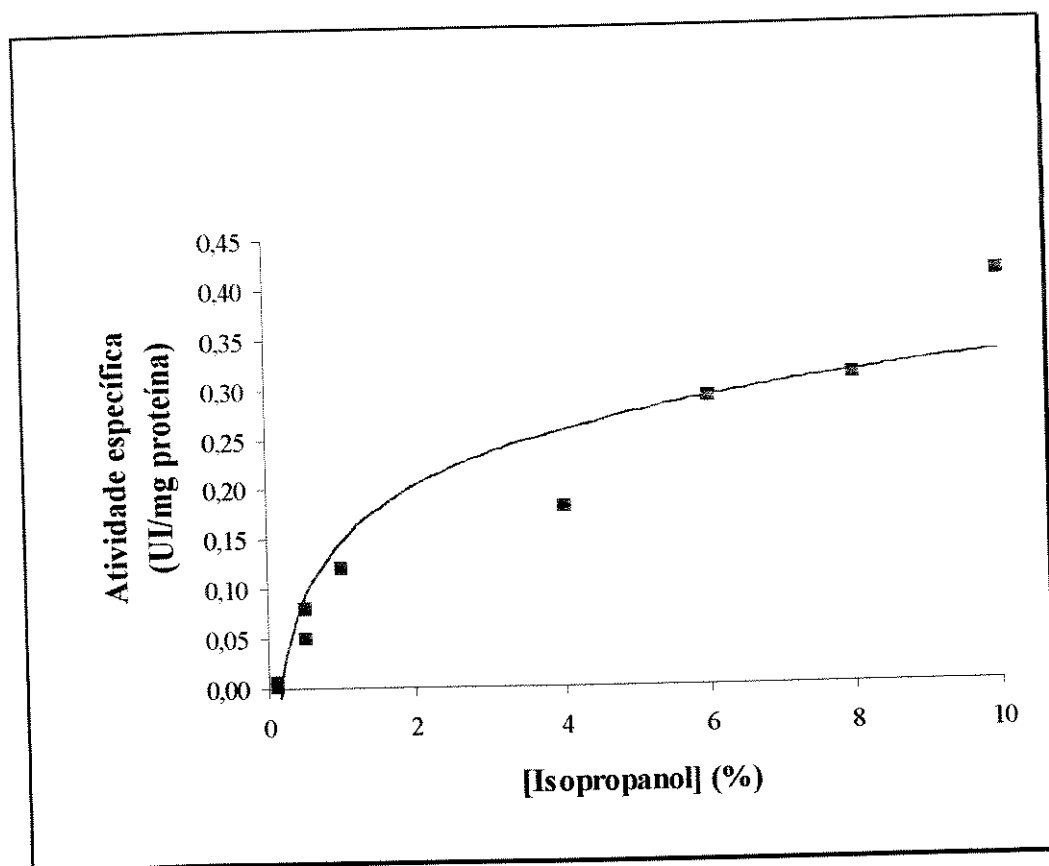


FIGURA 26 - Efeito do Isopropanol sobre a Lipase do *Penicillium citrinum* no **DEI** (imobilizada) à 37 °C e pH 7.2.
Concentração do isopropanol de 0.1 a 10%
(Condições experimentais Vide 3.2.16.)

Observou-se também que com a inibição da enzima pelo isopropanol, alterou-se a proporção usada entre as soluções **A** (1 mL) e **B** (9 mL) no Método pNPP (Vide 3.2.5.), e que a razão entre as mesmas foi caindo gradativamente a medida que diminuía-se não somente a concentração de isopropanol, mas também dos outros componentes que participavam das soluções (**TABELA XII**).

Felizmente ao calcularmos os percentuais para cada componente na **TABELA XII**, observou-se que as variações do Triton x - 100 e da goma arábica manteve-se praticamente constante, e as de pNPP, as mesmas observadas para a **TABELA XI**, e como foi visto, estas variações não causam inibição enzimática.

Portanto, a inibição da enzima causada pela variação da concentração do isopropanol, pode ser um indicativo que a proporção usada entre as soluções **A** e **B**, normalmente usada neste método deverá ser diminuída, já que o índice de isopropanol nesta concentração (10 %) torna-o extremamente tóxico para a enzima.

TABELA XII - Variação das concentrações dos Componentes das Soluções A e B usadas no Método pNPP
(Condições experimentais Vide 3.2.5.)

CONCENTRAÇÃO COMPONENTES (%)	795	636	477	318	159	80	40	8
TRITON x - 100	0,40	0,41	0,41	0,42	0,43	0,44	0,44	0,44
GOMA ARÁBICA	0,10	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
pNPP	0,030	0,024	0,018	0,012	0,006	0,003	0,0015	0,0003
ISOPROPANOL	10,0	8,0	6,0	4,0	2,0	1,0	0,5	0,1

4.2.3.4. Reutilização e Armazenamento

A enzima imobilizada perdeu um total de 25 % de sua atividade após cinco determinações consecutivas durante um dia (**FIGURA 27**). Esse resultado provavelmente é devido a perda de material nas lavagens, já que resultados atuais obtidos com *Candida rugosa* em dacron magnetizado (Dissertação de Mestrado em andamento, UFPE) manteve 91 % de sua atividade sob as mesmas condições, quando resultados anteriores com a mesma *Candida rugosa* tinham apresentados percentuais baixíssimos.

A enzima imobilizada armazenada a 6 °C em tampão Tris / HCl 0,05M, pH 7,2, reteve 100 % de sua atividade inicial após intervalo de 10 dias (**FIGURA 28**) mantendo um tempo de vida médio em torno de 25 dias, resultado que também coincidiu com o de *Candida rugosa* imobilizada no mesmo suporte (Dissertação de mestrado em andamento, UFPE).

Observou-se (dados não mostrados) que o suporte é extremamente instável ao ser armazenado em tampões com $\text{pH} \geq 6.0$. Em $\text{pH} \geq 8.0$ conseguiu-se armazená-lo no máximo por 24 horas. Após, observou-se um escurecimento do tampão.

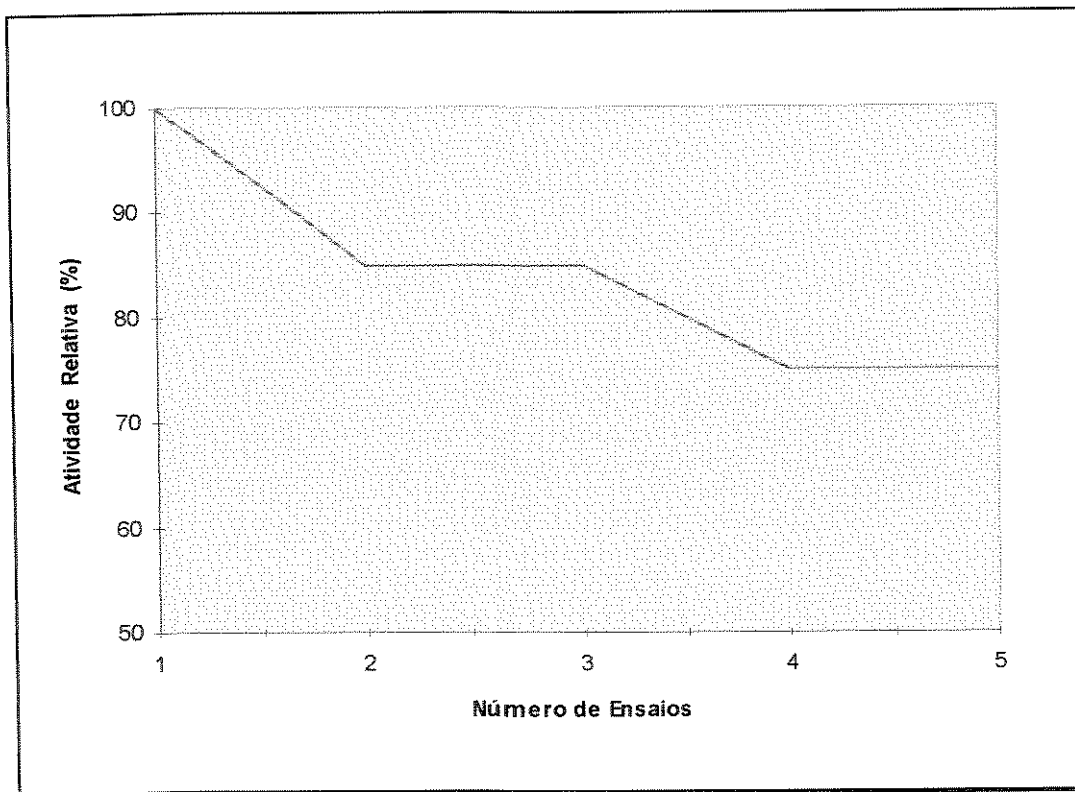


FIGURA 27 - Reutilização da Lipase do *Penicillium citrinum* no DEI (Imobilizada). Atividade lipolítica (Método pNPP) à 37 °C e pH 7.2 (Condições experimentais 3.2.17)

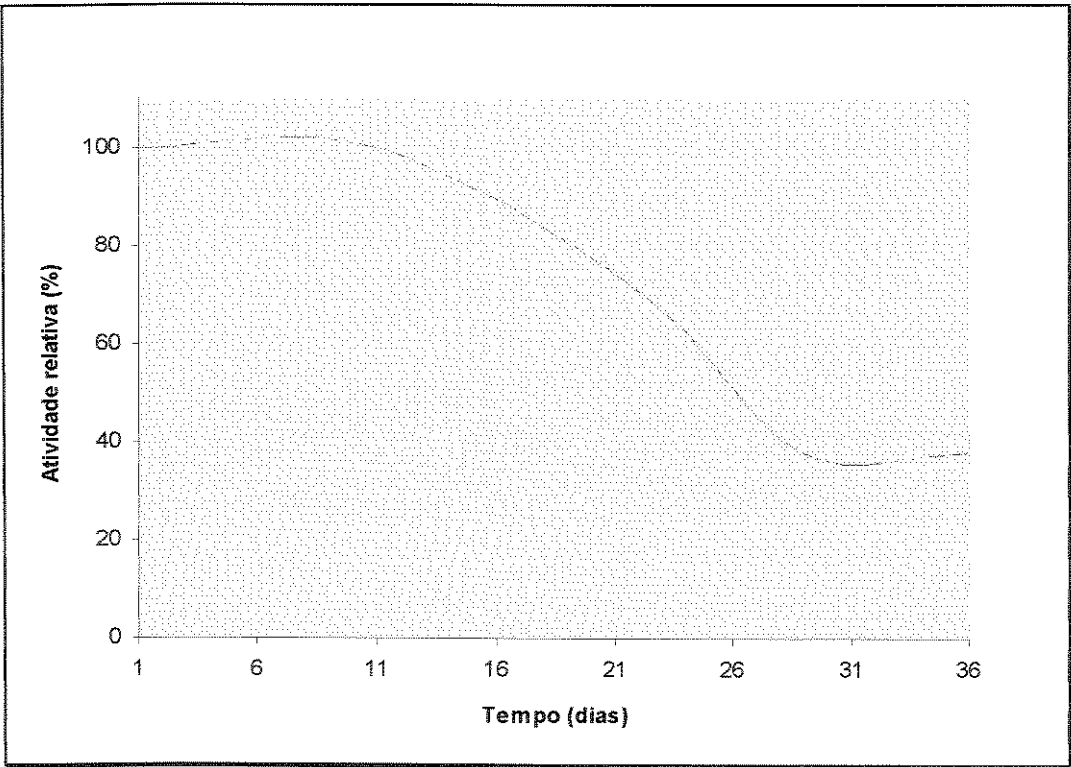


FIGURA 28 - Armazenamento da Lipase do *Penicillium citrinum* no **DEI** (Imobilizada).
Temperatura de armazenamento 6 °C
Atividade lipolítica (Método pNPP) à 37 °C e pH 7.2
(Condições experimentais 3.2.18)

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESINAS

4.3.1. ESTUDO SOBRE PITCH

4.3.1.1. Ácidos Graxos Livres

Após extração com acetona, o “pitch” líquido, viscoso e marrom, presente no rejeito, ficou em torno de 9% (Vide 3.2.21.). Como a fração de ácidos graxos presentes foi a mesma nos dois sistemas, imaginou-se inicialmente que a enzima utilizada não seria apropriada no tratamento de “pitch”, ou que a mesma não conteria triglicerídeos. Este último resultado iria de encontro aos trabalhos de Fischer e Messner (1992a; 1992b) e Fischer e col.(1993), que afirmam a predominância de triglicerídeos como um dos principais componentes presentes no “pitch” , mas que estaria em acordo com os trabalhos de Ohtani e Shigimoto (1991), que indicam a presença de materiais poliméricos, embora esses compostos sejam excepcionais quando comparados com outros compostos encontrados no “pitch” por outros autores.

Entretanto, a presença de ácidos graxos livres no “pitch”, sem hidrólise, fez-nos imaginar sobre a possibilidade de ter havido desnaturação da enzima devido a agitação (300 rpm) durante a reação enzimática. Por isso, em um segundo experimento, considerou-se os parâmetros mostrados na **TABELA XIII**.

Como esperado, todos os ensaios com as amostras de rejeito / “pitch” apresentaram ácidos graxos livres. O ensaio **P₂** considerado como “pitch” nativo (**in natura**), apresentou 0,295 µg de ácidos graxos livres. Nas condições de agitação do ensaio enzimático **P₁**, liberação de um total de 0,494 µg de ácidos foi observada, indicando que a agitação produziria hidrólise de ésteres. Contudo, quando adicionou-se lipase de *Candida*

rugosa, houve um aumento significativo dos ácidos graxos totais, indicando um valor de ácidos totais de 0,357 μg de ácidos graxos livres pela hidrólise enzimática (**P₃**).

Como fortes agitações podem desnaturar a enzima (**FIGURA 29**), esse resultado sugere que poderíamos aumentar a quantidade de ácidos graxos livres, se tratássemos inicialmente a polpa com forte agitação, para depois tratá-la com enzima e agitação moderada.

A **FIGURA 30** mostra a separação obtida através da cromatografia de camada fina (**TLC**), utilizando-se placas de sílica, dos ensaios com as amostras de rejeito / “pitch” analisadas pelo Método do Cobre (Kwon e Rhee, 1986). Da esquerda para a direita temos: padrão de ácido oleico, **P₄**, **P₃**, **P₂**, **P₁**, e padrão de trioleína. O resultado da polpa **P₄** foi excluído, devido a problemas no ensaio enzimático. Todas as amostras apresentaram manchas na faixa de ácidos graxos, com **P₃** um pouco mais acentuada do que as outras, confirmando os resultados analisados pelo Método do Cobre.

TABELA XIII - Ácidos Graxos Livres Após Extração com Acetona
(Condições experimentais Vide 3.2.19 e 3.2.20)

REJEITO / "PITCH"	P₁	P₂	P₃
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	sem enzima com agitação 30 °C	sem enzima sem agitação 30 °C	com enzima com agitação 30 °C
µg ÁCIDOS GRAXOS LIVRES / 0,1 mL AMOSTRA	0,494	0,295	0,851
RAZÃO	1	0,6	1,7

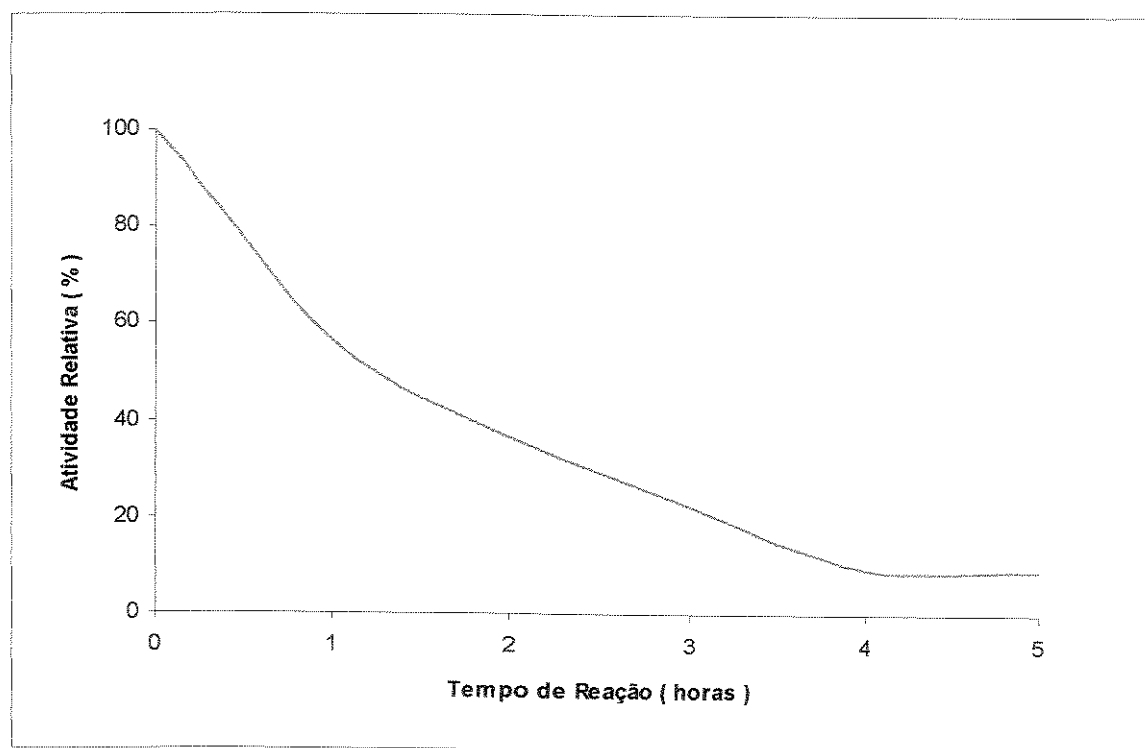


FIGURA 29 - Efeito da Agitação sobre a Atividade da Lipase de *Candida rugosa*. Atividade Lipolítica (Método pNPP) à 37 °C em tampão TRIS / HCl 50 mM pH 7,2.
(Condições experimentais Vide 3.2.24)

AO P₄ P₃ P₂ P₁ TA

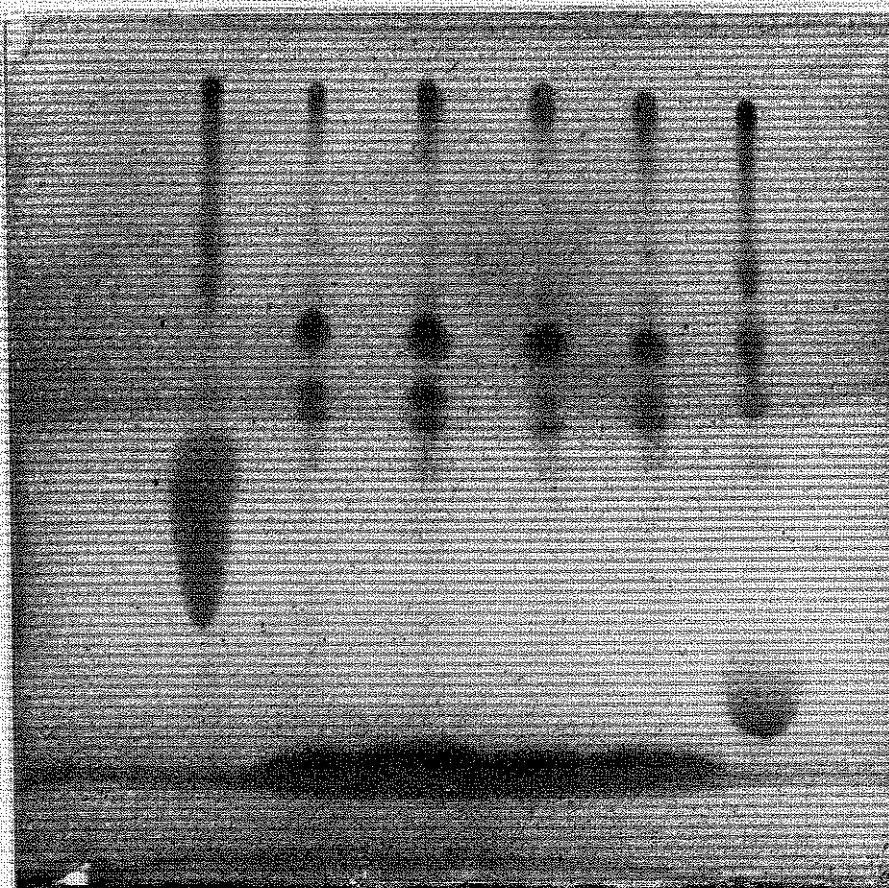


FIGURA 30 - Cromatograma (TLC)de Ácidos Graxos Livres Após

Extração com Acetona.

Padrões de ácido oleico (**AO**) e Trioleína (**TA**)

Produtos das amostras de rejeito / "pitch" :

P₃ - catalisado por *Candida rugosa*;

P₂ - submetido a forte agitação;

P₁ - nativo.

(Condições experimentais Vide 3.2.21 e 3.2.22)

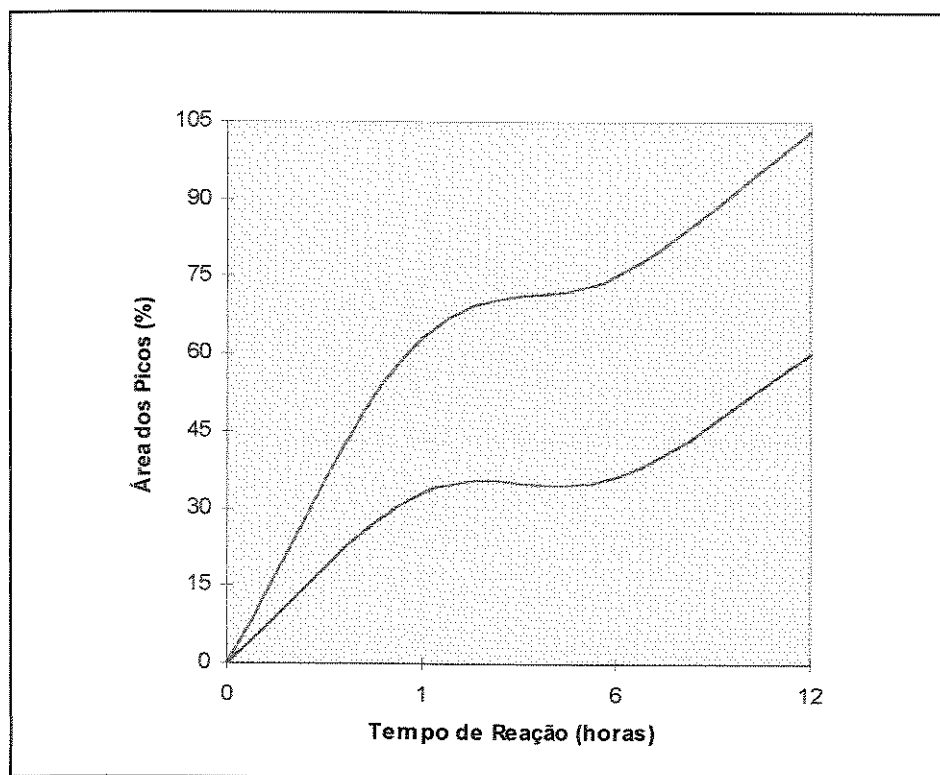


FIGURA 31 - Áreas Relativas Obtidas Através dos Cromatogramas (HPLC) Provenientes da Reação Enzimática de Rejeito / “pitch” com *Candida rugosa* às temperaturas de 30°C (—) e 45°C (—) nos tempos 0; 1; 6 e 12 horas (Condições experimentais Vide 3.2.21 e 3.2.23).

TABELA VIII: - Razão Obtida a Partir das Análises das Áreas dos Cromatogramas (**HPLC**) Provenientes dos Produtos Formados Após Ensaio com Amostras de Rejeito / "Pitch" (Condições Experimentais Vide 3.2.21 e 3.2.23).

REJEITO-"PITCH"	P ₂	P _{2'}	P ₄	P ₅
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	sem enzima sem agitação diclorometano	sem enzima sem agitação acetona	sem enzima com agitação (200 rpm) diclorometano 12 horas de incubação	enzima (<i>Candida rugosa</i>) com agitação (200 rpm) diclorometano 12 horas incubação
RAZÃO	0,8	0,9	1	1,2

4.3.3. EXTRATIVOS HIDROFÍLICOS E LIPOFÍLICOS

4.3.3.1. Espectros de Infravermelho

No **APÊNDICE I**, **II**, **III** e **IV** encontram-se espectros de infravermelho obtidos a partir dos extrativos hidrofílicos e lipofílicos provenientes das amostras de rejeito / “pitch” (Vide 3.2.21. e 3.2.25.).

As amostras obtidas a partir dos filtrados de água e tampão no **APÊNDICE I** (**FIGURAS 1** e **2**) apresentaram principalmente as seguintes bandas:

- a presença de uma banda em $3.500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, devido ao estiramento da ligação O-H, típica de álcoois e fenóis;
- uma banda em $1580 - 1450 \text{ cm}^{-1}$, devido ao estiramento das ligações C=C em hidrocarbonetos aromáticos;
- uma banda em $1205 - 1050 \text{ cm}^{-1}$, devido ao estiramento da ligação do C-O em álcoois e fenóis;

As amostras extraídas com acetona e diclorometano (**FIGURAS 3, 4, 5** e **6** no **APÊNDICE I**) apresentaram no geral as principais bandas de absorção:

- a presença de uma banda larga em 3400 cm^{-1} , característica de OH;
- bandas de absorção em 2925 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} , devido aos estiramentos assimétricos e simétricos de CH_2 , respectivamente;
- as bandas de absorção em 1735 cm^{-1} , devido a presença de ésteres alifáticos;
- uma banda de absorção de intensidade moderada em 1636 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação C=C em olefinas não conjugadas;

- bandas de absorção em 1377 e 1460 cm^{-1} , características de deformações angulares simétricas de CH_3 e CH_2 , respectivamente;
- a absorção de uma banda em 1050 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C-O, indicando a presença de hidroxila alcoólica de álcool primário; e
- uma banda em torno de 722 cm^{-1} , devido a deformação angular assimétrica no plano de CH_2 ;

Comparando as **FIGURAS 3 e 5**, cujas amostras de rejeito / “pitch” não foram submetidas a um processo de lavagem, às **FIGURAS 4 e 6** que foram submetidas, observou-se uma redução significativa da banda na região de $3500 - 3200\text{ cm}^{-1}$.

No **APÊNDICE II** encontram-se espectros do padrão ácido oleico (**FIGURA 7**), da amostra do rejeito / “pitch” cujos ácidos graxos foram liberados após lavagem com NaOH 0,1 N (**FIGURA 8**), assim como espectros de infravermelho obtidos das polpas lavadas com concentrações diferenciadas de NaOH (**FIGURAS 9 - 11**).

Os espectros mostrados nas **FIGURAS 7 e 8**, além de apresentarem as bandas de absorção em 2925 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} , devido aos estiramentos assimétrico e simétrico de CH_2 , respectivamente; uma banda em 1460 cm^{-1} , característica de deformações angulares simétricas de CH_2 ; e uma banda em torno de 722 cm^{-1} , devido a deformação angular assimétrica no plano de CH_2 , apresentaram uma banda proveniente do estiramento da ligação C-O e, da deformação angular do O-H, ambas ocorrendo em 1280 cm^{-1} ; e uma banda na região de $1720 - 1706\text{ cm}^{-1}$, característica do grupo C=O. Estas duas últimas, típicas de ácidos carboxílicos.

Os espectros mostrados nas **FIGURAS 9 - 11** apresentaram principalmente as bandas de absorção em 2925 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} (estiramentos assimétrico e simétrico de CH_2); bandas de absorção em

1377 e 1460 cm^{-1} (deformações angulares simétricas de CH_3 e CH_2 , respectivamente); e uma banda em torno de 722 cm^{-1} (deformação angular assimétrica no plano de CH_2). Todas típicas de hidrocarbonetos saturados.

No **APÊNDICE III (FIGURAS 12 -16)** encontram-se os espectros de infravermelho obtidos das amostras de rejeito / “pitch” que foram submetidas a uma extração seletiva com solventes.

Na **FIGURA 12** encontra-se o espectro da amostra extraída com hexano. As principais bandas de absorções encontradas são semelhantes as apresentadas nas **FIGURAS 9 - 11**, ou seja, é uma amostra típica de hidrocarboneto saturado. As amostras extraídas com clorofórmio (**FIGURA 13**), diclorometano (**FIGURA 14**) e acetona (**FIGURA 15**) apresentaram espectros cujas bandas de absorções equivalem as citadas nas **FIGURAS 3 - 8**, ou seja, são espectros cujas amostras apresentam uma mistura de hidrocarbonetos, ácidos e ésteres. A amostra extraída com água (**FIGURA 16**) mostrou em espectro semelhante ao apresentado na **FIGURA 1 (APÊNDICE I)**.

No **APÊNDICE IV (FIGURAS 17 - 22)** encontram-se os espectros das amostras submetidas à reação enzimática com a lipase de *Candida rugosa*. As bandas de absorções apresentadas são semelhantes às obtidas para os espectros das **FIGURAS 3 - 6**, o que indica a presença de ésteres nessas amostras. Resultados compatíveis aos obtidos com HPLC (Vide 4.3.2.).

De acordo com Silverstein e col. (1979), as bandas de absorção descritas nas **FIGURAS 3 - 22** indicam principalmente a presença de hidrocarbonetos saturados, ésteres, e ácidos monocarboxílicos de cadeias longas nos extrativos lipofílicos.

As bandas de absorção apresentadas nas **FIGURAS 1, 2 e 16**, assim como a redução apresentada na banda de $3500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ nas **FIGURAS 4 e 6 (APÊNDICE I)**, indicam eliminação de alcoóis, fenóis e provavelmente carboidratos nos extrativos hidrofílicos. Esses resultados sugerem que lavagens preliminares das polpas sob agitação com água e tampão, liberam substâncias coloidais que também poderiam contribuir para a formação do indesejado “pitch”. De acordo com Ohtani (1994), esse “pitch coloidal é liberado na água e depositado sobre os equipamentos durante operações mecânicas processadas no refinamento, devido as lavagens insuficientes pelas quais as polpas são submetidas.

4.3.3.2. Cromatografia Gasosa

Para uma melhor compreensão das substâncias presentes no “pitch”, fez-se uso do GC - MS para caracterização de algumas amostras extraídas do rejeito / “pitch”. No geral, os métodos usados para a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos envolvem uma hidrólise da amostra, seguida de esterificação dos ácidos graxos livres. O método utilizado neste trabalho foi desenvolvido por Maia (1992) a partir dos aspectos vantajosos dos Métodos de Metcalfe e col. (1966) e de Hartman e Lago (1973). Cromatogramas de ácidos graxos obtidos pelo método proposto ao serem comparados com os obtidos pelo método de Metcalfe, não apresentaram diferenças significativas (Maia, 1992).

A identificação dos principais picos presentes nos cromatogramas (**APÊNDICES V - IX**) foi feita por comparação de seus respectivos espectros de massas, com espectros de massas padrões autênticos disponíveis e armazenados no banco de dados do GC-MS (Instituto de Química - UNICAMP), assim como aqueles relatados pela literatura.

Os cromatogramas com seus respectivos espectros de massa na maioria apresentaram os seguintes resultados:

A amostra de rejeito / "pitch" **in natura** submetida a lavagem com solução de NaOH 0,1 N (**APÊNDICE V**), por ter seus ácidos extraídos, apresentou dentre os vários picos, os principais fragmentos m/e 43, m/e 57 e m/e 85 iguais aos encontrados para a amostra extraída com hexano (**APÊNDICE VI**).

De acordo com Silverstein e col. (1979), a seqüência de fragmentação para hidrocarbonetos lineares saturados se caracterizam pela aglomeração de picos afastados um dos outros por 14 unidades de massa (CH_2), onde os picos mais intensos ocorrem no C_3 (m/e 43) e C_4 (m/e 57). Os espectros para hidrocarbonetos saturados ramificados além de serem muito parecidos aos dos hidrocarbonetos lineares, apresentam os picos m/e 85 e m/e 169 correspondentes a quebra em cada lado da ramificação. A presença de um pico M-15 confirma a existência de ramificação.

As fragmentações apresentadas poderiam ser de cetonas alifáticas já que também ocorrem a m/e 43 ou 57 ou 71. Entretanto, estas fragmentações são mais comuns quando o grupo alquila é C_2 , pois quando é maior ou igual a C_3 , a quebra da ligação se dá por um rearranjo de McLafferty e produzindo picos maiores a m/e 58 ou 72 ou 86.

A amostra extraída com diclorometano (**APÊNDICE VII**) e uma das amostras submetidas a reação enzimática (1h, 45 °C) (**APÊNDICE VIII**) além de apresentarem na sua maioria os mesmos fragmentos das amostras acima, apresentaram os picos em m/e 74 ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2^+$), formado através do rearranjo de McLafferty, e m/e 87 ($\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^+$) também presentes nos fragmentos do padrão ácido oleico (**APÊNDICE IX**),

Ésteres metílicos de ácidos alifáticos não ramificados no Carbono- α , geralmente dá um pico intenso a m/e 74, considerado como pico base de ésteres metílicos lineares de $C_6 - C_{26}$. Já os ésteres metílicos nos quais a fração ácida é predominante, as fragmentações C-C devido a íons alquila ocorrem em m/e (29, 43, 57...) e aos íons contendo oxigênio ocorrem em m/e (59, 73, 87...), análogos aos dos ácidos livres.

Amostras apresentando como fragmentos principais íons com número de massa ímpar m/e (27, 29, 41, 43, 55, 57 e 59), foram identificados como sendo de hidrocarbonetos por Maia (1992) ao estudar o percentual de ácidos graxos em peixes de água doce.

Espectros de massas de substâncias padrões disponíveis no GC - MS (Instituto de Química - UNICAMP), ao serem comparados com os espectros obtidos das amostras em estudo e da amostra padrão de ácido oleico, indicaram que a maioria dos fragmentos apresentados pelos mesmos são típicos de hidrocarbonetos. Exceto pelos fragmentos apresentados pelo ácido oleico, e em menor proporção, pelas amostras provenientes do clorofórmio e da reação enzimática que apresentaram picos característicos de ácidos monoenólicos ou monoinsaturados e ésteres metílicos.

Esses resultados estão em acordo com os obtidos por Chen e col. (1994), que ao estudarem algumas espécies de madeira no Canadá, também encontraram um alto índice de ésteres e graxas e baixos percentuais em triglicerídeos; e com os obtidos por Ohtani (1994), que afirma que polpas originadas de climas temperados ou quentes, contêm hidrocarbonetos alifáticos polimerizados como causa primária para problemas de "pitch".

4.3.3.2. **Polpas**

Os ensaios realizados com amostras de polpa obtida no verão de 1996, não indicaram a presença de “pitch” nos extrativos lipofílicos, mas apresentaram substâncias coloidais semelhantes as observadas com os ensaios das amostras de rejeito /”pitch” (resultados não mostrados). Esse resultado está em acordo com Fischer e Messner (1992a) que relacionam a formação de “pitch”, entre outros fatores, com as estações do inverno e da primavera.

5. CONCLUSÕES

O fungo filamentoso, *Penicillium citrinum*, produziu lipases em ambos os meios, **MEL** e **MSA**;

Ao final da fermentação, a morfologia do *Penicillium citrinum* apresentou-se em forma esférica no **MEL** e filamentosa no **MSA**;

A lipase do *Penicillium citrinum* apresentou um máximo na sua atividade específica quando cultivada no meio **MSA** (0,7 UI / mg de proteína);

O sulfato de amônio (80 % saturação) não mostrou-se satisfatório quando usado para concentração de proteínas. Membranas de ultrafiltros da Millipore mostraram-se mais eficazes;

A lipase do *Penicillium citrinum* manteve sua atividade inalterada após 60 dias de armazenamento em temperatura de 6 °C, quando acondicionada no próprio extrato parcialmente purificado;

A lipase do *Penicillium citrinum* solúvel manteve seu pH ótimo entre 8,0 - 8,5, e sua temperatura ótima em 37 °C;

O suporte dacron-hidrazida magnetizado foi obtido com sucesso a partir de reações entre os íons férricos e ferrosos em pH alcalino, o qual foi rapidamente separado do meio reacional durante as lavagens e após a imobilização, por um campo magnético;

A lipase do *Penicillium citrinum* foi imobilizada no suporte dacron-hidrazida magnetizado, mostrando uma atividade específica de 73 % da enzima solúvel;

O pH ótimo da lipase do *Penicillium citrinum* imobilizada ficou em 8,5, e sua temperatura ótima em 37 °C;

A lipase imobilizada mostrou-se mais termoestável do que a lipase solúvel;

A lipase solúvel mostrou um K_m aparente de 235 μM , enquanto a imobilizada apresentou um K_m 281 μM , indicando que a imobilização não afeta a afinidade da enzima pelo substrato;

A variação da concentração de pNPP não afetou a atividade da enzima solúvel e imobilizada;

A variação da concentração do isopropanol afetou significativamente a atividade da enzima solúvel, enquanto a enzima imobilizada não demonstrou a mesma inibição em soluções acima de 636 μM ;

Devido ao alto percentual de isopropanol (10 %) presente na solução de pNPP, a proporção 1:9 entre as soluções **A** (pNPP/isopropanol) e **B** (Tampão/goma arábica/Triton x-100) utilizadas no método do pNPP deverá ser reduzida, ou concentrações inferiores a 795 μM , normalmente empregadas na preparação da solução **A**, deverão ser alteradas para 636 ou 477 μM ;

A atividade da enzima imobilizada apresentou 75 % de sua atividade após cinco ensaios consecutivos no mesmo dia;

A enzima imobilizada manteve 100 % de sua atividade inicial após intervalo de 10 dias;

Fortes agitações (300 rpm) podem causar hidrólise de ésteres, assim como podem causar desnaturação na lipase de *Candida rugosa* após 5 horas de reação enzimática;

O Método do Cobre (Kwon e Rhee, 1986) mostrou-se prático e eficiente na determinação de ácidos graxos livres presentes no “pitch”;

A acetona mostrou-se como um solvente alternativo para extração de “pitch”, o que a torna atrativa por seu baixo custo;

A lipase de *Candida rugosa* hidrolisou os ésteres presentes nas amostras de rejeito / “pitch”;

Lavagens adequadas da polpa com água, eliminam substâncias coloidais que contribuem para a formação do indesejado “pitch”;

Amostras de rejeito / “pitch” submetidas à lavagens com soluções de NaOH em diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 2,0 N), tiveram seus ácidos graxos livres totalmente eliminados; Soluções 0,1 N de NaOH, geralmente usadas nas lavagens das polpas para eliminação de ácidos graxos livres após hidrólise enzimática, mostraram-se eficazes na eliminação dos mesmos;

As amostras de rejeito / “pitch” obtida na primavera de 1994 apresentaram 9 % de “pitch”, com todos os ensaios realizados a partir dessa amostra apresentando ácidos graxos livres, inclusive o “pitch” **in natura**;

O “pitch” obtido a partir da amostra de rejeito / “pitch” na primavera de 1994, apresentou-se como um material complexo, composto principalmente por hidrocarbonetos e, em menor proporção, por ácidos monosaturados e ésteres de cadeias longas, assim como, por

substâncias coloidais presentes nos extrativos hidrofílicos; Na amostra de polpa obtida no verão de 1996 não observou-se a formação de pitch.

6. PERSPECTIVAS

O ótimo resultado obtido com o armazenamento da lipase do *Penicillium citrinum* no próprio filtrado do meio **MSA** poderá ser utilizado em estudos posteriores, visando a utilização dessa lipase parcialmente purificada em larga escala;

O suporte dacron-hidrazida magnetizado poderá ser melhor utilizado em escala industrial, se um estudo sobre o efeito do pH fosse realizado durante a imobilização da enzima e armazenamento do derivado enzimático imobilizado. Dessa forma, as enzimas imobilizadas nesse suporte poderão ter melhoradas suas atividades específicas e estabilidades ao armazenamento;

Resultados obtidos com os extrativos hidrofílicos nas amostras de “pitch” indicaram a presença de substâncias que não podem ser hidrolizadas por lipases. Um estudo sobre o tratamento dessas substâncias com celulasas e hemicelulasas poderiam levar a uma redução do índice das mesmas, tornando desnecessárias as lavagens prévias com água;

Como a presença de “pitch”, entre outros fatores, está relacionada com as estações, um estudo sobre a formação de “pitch” com amostras colhidas durante todas as quatro estações do ano, forneceria dados sobre as épocas de maior incidência dos mesmos. Esses dados seriam de relevância para a indústria papeleira.

5. REFERÊNCIAS

- Al-Duri, B.; Robinson, E.; Mcnerlan, S. e Bailei, P., **JAOCs**, 1995, 2, 1351 - 1359.
- Akoh, C.C.; Cooper, C. e Nwosu, C.V., **JAOCs**, 1992, 69, 257 - 260.
- Arroyo, M. e Sinisterra, J.V., **J. Org. Chem.**, 1994, 59, 4410 - 4417.
- Baldessari, A.; Iglesias, L.E. e Gros, E.G., **Biotechnol. Lett.**, 1994, 16, 479 - 484.
- Bamber, R.K. **APPITA**, 1985, 38, 210 - 216.
- Barreto, S. P.D O.; Melo, E. H. M.; Lima Filho, J. L.; Duarte Coelho, A.C. e Kennedy, J. F., **Cellulosics: Pulp, Fibre and Environmental Aspects**, eds: J. F. Kennedy; G. O., Phillips and P.A., Williams, 1993, 31 - 36.
- Basri, M.; Ampon, K.; Wan Yunes, W.M.Z.; Razak, C.N.A. e Salleh, A.B., **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 1994, 59, 37 - 44.
- Basri, M.; Ampon, K.; Wan Yunes, W.M.Z.; Razak, C.N.A. e Salleh, A.B., **JAOCs**, 1995, 72, 407 - 411.
- Bendikene, V. G.; Juodka, B. A.; Kazlauskas, R. M.; Tautkus, C. A.; Matulionis, E. A. e Sudavichius, A. A., **Appl. Biochem. Microbiol.**, 1995, 31, 393 - 399.
- Benzonana, G. e Desnuelle, P., **Biochim. Biophys. Acta**, 1965, 105, 121 - 136.
- Bezborodov, A.M., **Appl. Biochem. Microbiol.**, 1995, 31, 18 - 23.
- Bisht, K.S. e Parmar, V., **Tetrahedron:Asymmetry**, 1993, 4, 957 - 958.
- Björkling, F.; Erik, S. e Kirk, O., **TIBTECH**, 1991, 9, 360 - 363.
- Blanchette, R.A.; Farrell, R.L.; Burnes, T.A.; Wendler, P.A.; Zimmerman, W.; Brush, T.S. e Snyder, R.A., **TAPPI J.**, 1992, 75, 102 - 106.
- Brahimi-Horn, M.C.; Guglielmino, M.L.; Elling, L. and Sparrow, L.G., **Biochim. Biophys. Acta**, 1990, 1042, 51 - 54.

- Carneiro Leão, A.M.A.; Oliveira, E.A. e Carvalho Jr., L.B. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 1991, 31, 53 - 58.
- Carneiro Leão, A.M.A., **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica, UFPE, 1992.
- Carta, G.; Gainer, J.L. e Gibson, M.E., **Enzyme Microb. Technol.**, 1992, 14, 904 - 910.
- Chang, M.K.; Conkerton, E.J.; Chapital, D. and Wan, P.J., **JAACS**, 1994, 71, 1173 - 1175.
- Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T.; Mori, T., **Methods Enzymol.**, 1976, 44, 746 - 759.
- Chen, T.; Wang, Z.; Gao, Y.; Breuil, C. e Hatton, J.V., **APPITA**, 1994, 47, 463 - 466.
- Colton, I.J.; Ahmed, S.N. e Kazlauskas, R.J., **J. Org. Chem.**, 1995, 60, 212 - 217.
- Coughlan, M. P.; Kierstan, M.P.; Border, P.M.; Turner, A.P.F., **J. Microbiol. Methods**, 1988, 8, 1 - 50.
- Dugas, H., **Biorganic Chemistry - A Chemical Aproach to Enzyme Action**, 2nd Ed., Springer-Verlag, 1989, 651p.
- Durán, N. e Esposito, E., **Quím & Ind. (Chile)**, 1992, 17 - 23.
- Durán, N.; Esposito, E. e Araújo Neto, J.S., **O Papel**, 1995, 12, 68 - 85.
- Dreishbach, D. e Michalopoulos, D.L., **TAPPI J.**, 1989, 72, 129 - 134.
- Ebüke, H. e Achiwa, K., **Tetrahedron:Asymmetry**, 1994, 5, 1447 - 1450.
- Esau, K. **Plant Anatomy**, N.Y., J.Wiley, 1965, 767p.
- Esau, K., **Anatomia das Plantas com Sementes**. São Paulo, Edgard Blücher / EDUSP, 1974, 293p.
- Faber, K., **Biotransformation in Organic Chemistry**, Springer - Verlag, New York, 1992, 315p.
- Farrel, R.L.; Blanchette, R.A.; Brush, T.S.; Hadar, Y.; Iverson, S.; Krisa, K.; Wendler, P.A. e Zimmerman, W., **J. Biotechnol.**, 1993, 30, 115 - 122.

- Fengel, D. e Wegener, G., **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter, N.Y., USA, 1984, 613p.
- Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A. e Santaniello, E., **Tetrahedron: Asymmetry**, 1994, 5, 691 - 698.
- Ferraboschi, P.; Casati, S.; Verza, E. e Santaniello, E., **Tetrahedron: Asymmetry**, 1995, 6, 519 - 524.
- Fischer, K. e Messner, K., **TAPPI J.**, 1992a, 75, 130 - 134.
- Fischer, K. e Messner, K., **Enzyme Microb. Technol.**, 1992b, 14, 470 - 473.
- Fischer, K.; Puchinger, L.; Schloffer, K.; Kreiner, W. e Messner, K., **J. Biotechnol.**, 1993, 27, 341 - 348.
- Fujita, Y.; Awaji, H.; Taneda, H.; Matsukura, M.; Hata, K.; Shimoto, H.; Sharyo, M.; Sakaguchi, H. e Gibson, K., **TAPPI J.**, 1992, 75, 117 - 122.
- Gaspar, J. e Guerrero, J., **Tetrahedron:Asymmetry**, 1995, 6, 231 - 238.
- Guesdom, J.L. e Avrameas, S., **Immunochemistry**, 1977, 14, 443 - 447.
- Guesdom, J.L. e Avrameas, S., **Appl. Biochem. Bioeng.**, 1981, 3, 207 - 232.
- Hartman, L. e Lago, R.C.A., **Lab. Prac.**, 1973, 94, 475 - 476.
- Hartmeier, W.; Hermann, T.; Kox, G.; Grello, J., **Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.**, 1995, 60, 1843.
- Hansen, T.V.; Waagen, V.; Partali, V.; Anthonsen, H.W. e Anthonsen, T., **Tetrahedron: Asymmetry**, 1995, 6, 499 - 504.
- Haraldsson, G.G.; Gudmundsson, B. Ö. e Almarson, O., **Tetrahedron**, 1995, 51, 941 - 952.
- Hedrich, H.C. e Spener, F., **Enzyme Microb. Technol.**, 1991, 3, 840 - 847.
- Hof, R.P. e Kellog, R.M., **Tetrahedron:Asymmetry**, 1994, 5, 691 - 698.
- Hoga, M.E.T. In: **Celulose e Papel. Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**. IPT, São Paulo, Brazil, 1988.
- IPT. In: **Celulose e Papel. Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**. 2nd Ed. São Paulo, Brazil, 1988.

- Inada, Y.; Ohwada, K.; Yoshimoto, T. ; Kojima, S., Takahashi, K.; Kodera, Y.; Matsushima, A.; Saito, Y., **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1987, 148, 392 - 396.
- Jordão, R.C.C., **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica, UFPE, 1994.
- Kalaratis, P.; Regenye, R.W.; Portridge, J.J.; Coffen, D.L., **J. Org. Chem.**, 1990, 55, 812 - 815.
- Kantelinem, A.; Jokinen, O.; Sarkki, M.L.; Pettersson, C.; Sundberg, K.; Eckerman, C.; Ekman, R. e Holmbom, B., **8th International Symposium on Wood and Pulping, Chemistry**, Helsinki, Finland, vol. 1, 1995.
- Kemeny, D.M. e Challacombe, S.J.In: **Elisa and Other Solid Phase Immunoassays**, N.Y., John Wiley & Sons Ltda, 1988.
- Kennedy, J.F. e Cabral, J.M.S., **In: Biotechnology**, Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1987, 7a, 349 - 404.
- Kosugi, Y.; Takahashi, K.; Lopez, C., **JAOCs**, 1995, 72, 1281-1285.
- Kwon, D. Y. e Rhee, J.S., **JAOCs**, 1986, 63, 89 - 92.
- Kwon, D. Y. e Rhee, J. S., **Korean J. Chem. Engin.**, 1987, 9, 709 - 714.
- Leemputten, E.V. e Horisberger, M., **Biotechnol. Bioeng.**, 1974, 16, 385 - 396.
- Lindley, D.H. **In: Oxide Minerals, Reviews in Mineralogy**, Michigan, Brookcrafters, Inc., 1976.
- Linko, Y.Y e Yan Wu, X., **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 1996, 65, 163 - 170.
- Lovey, R.G.; Saksena, A.K. e Girijavallabham, **Tetrahedron Lett.**, 1994, 35, 6047 - 6050.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.V.; Farr, R.V. e Randall, R.V., **J. Bio. Chem.**, 1951, 193, 265 - 275.
- Macrae, A.R., Extracellular Microbial Lipases **In: Microbial Enzymes and Biotechnol.**, Fogarty, W.M. (Ed) Appl. Sci. Publishers, London, 1983, 225 - 250

- Maia, E. L., **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1992.
- Malcata, F. X.; Reyes, H.R.; Garcia, H.S.; Hell, C.G. e Amundson, C.H., **Enzyme Microb. Technol.**, 1992, 14, 426 - 446.
- Maliszewska, I. e Mastalerz, P., **Enzyme Microb. Technol.**, 1992, 14, 190 -193.
- Margolin, A.L., **Enzyme Microb. Technol.**, 1993, 15, 226 - 280.
- Melo, E.H.M., **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica, UFPE, 1984.
- Metcalfe, L. D.; **Anal. Chem.**, 1966, 38, 514 - 515.
- Mizuguchi, E.; Achiwa, K.; Wakamatsu, H. e Terao, Y., **Tetrahedron: Asymmetry**, 1994, 5, 1407-1410.
- Montero, S.; Blanco, A.; Virto, M.D.; Landeta, L.C.; Agud, I.; Solozabal, R.; Lascaray, J.M. de Renobales, M.; Llama, M.J. e Serra, J.L., **Enzyme Microb. Technol.**, 1993, 15, 239 - 247.
- Mukerjee, K.D.; Kiewitt, I. and Hills, M.J., **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 1993, 40, 489 - 493.
- Mustranta, A.; Forsseli, P. e Poutanem, K., **Enzyme Microb. Technol.**, 1993, 15, 133 -139.
- Nadruz, W.; Leão, I.C.; Krieger, N.; Pimentel, M.C.B.; Lendighan, W.; Melo, E.H.M.; Lima Filho, J.L. e Kennedy, J.F., **Gen. Engin. Biotechnol.**, 1994, 14, 143 -148.
- Nair, M.S. e Anilkumar, A.T., **Biotechnol. Lett.**, 1994, 16, 161-162.
- Nicolosi, G.; Patti, A.; Piattelli, M. e Sanfilippo, C., **Tetrahedron : Asymmetry**, 1995, 6, 519 - 524.
- Nothenberg, M., **Química e Derivados**, 1991, 5, 283.
- O'Connor, K. C. e Bailey, J. E., **Enzyme Microb. Technol.**, 1988, 10, 352 - 356.
- Oliveira, E.A.; Silva, M.P.C.; Figueiredo, Z.M.B.; Carvalho Jr., L.B., **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 1989, 22, 109 -114.

- Oliveira, E.A. e Carvalho Jr., **Brazilian J. Med Biol. Res.**, 1989, 22, 29 - 30.
- Okahata, Y.; Tujimoto, Y. e Ijiro, K., **J. Org. Chem.**, 1995, 60, 2244 - 2250
- Ohtani, Y., **APPITA**, 1993, 46, 39 - 43.
- Ohtani, Y. e Shigimoto, T., **APPITA**, 44, 1991, 29 - 44.
- Park, Y.K. e Pastore, G.M., **Cienc. Tecnol. Aliment.**, 1989, 9, 163 -171.
- Patel, M. T.; Nagarajan, R. e Kilara, a., **Biotechnol. Appl. Biochem**, 1995, 22, 1-14.
- Pimentel, M.C.B.; Krieger, N.; Coelho, L.C.C.B.; Fontana, J.; Melo, E.H.M.; Ledinghan, W.N. e Lima Filho, J.L., **Appl. Biochem. Biotechnol**, 1994, 49, 59 - 74.
- Pimentel, M.C.B., **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, UNICAMP, 1995.
- Powell, L.W., **In: Microbial Enzymes and Biotechnology**, london, Elsevier Science Publishers, 1990.
- Quax, W.J. e Broekhuizen, C.P., **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 1994, 15, 266 - 280.
- Rapp, P. e Backhauss, S., **Enzyme Microb. Technol.**, 1992, 14, 938 - 943.
- Ratto, M.; Kantelinen, A.; Bailey, M. e Vukari, L., **TAPPI J.**, 1993, 76, 125 -128.
- Ratlledge, C., **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 1992, 55, 397- 414.
- Rawn, J.D., **Biochemistry**, Neil Patterson Publ., Burlingtom, N.C. USA, 1989, 1105pp.
- Robin, S.; Zhu, J., Galons, H.; Pham-Huy, C.; Claude, J.R.; Tomas, a. e Viossat, B., **Tetrahedron: Asymmetry**, 1995, 6, 1249 -1252.
- Rucka, M. e Turkiewicz, B., **Enzyme Microb. Technol.**, 1990, 12, 52 - 55.
- Ruckenstein, E. e Wang, X., **Biotechnol. Techniques**, 1993, 7, 117-122.
- Santaniello, E.; Ferroboshi, P. e Grisenti, P., **Enzyme Microb. Technol.**, 1993, 15, 266 - 280.

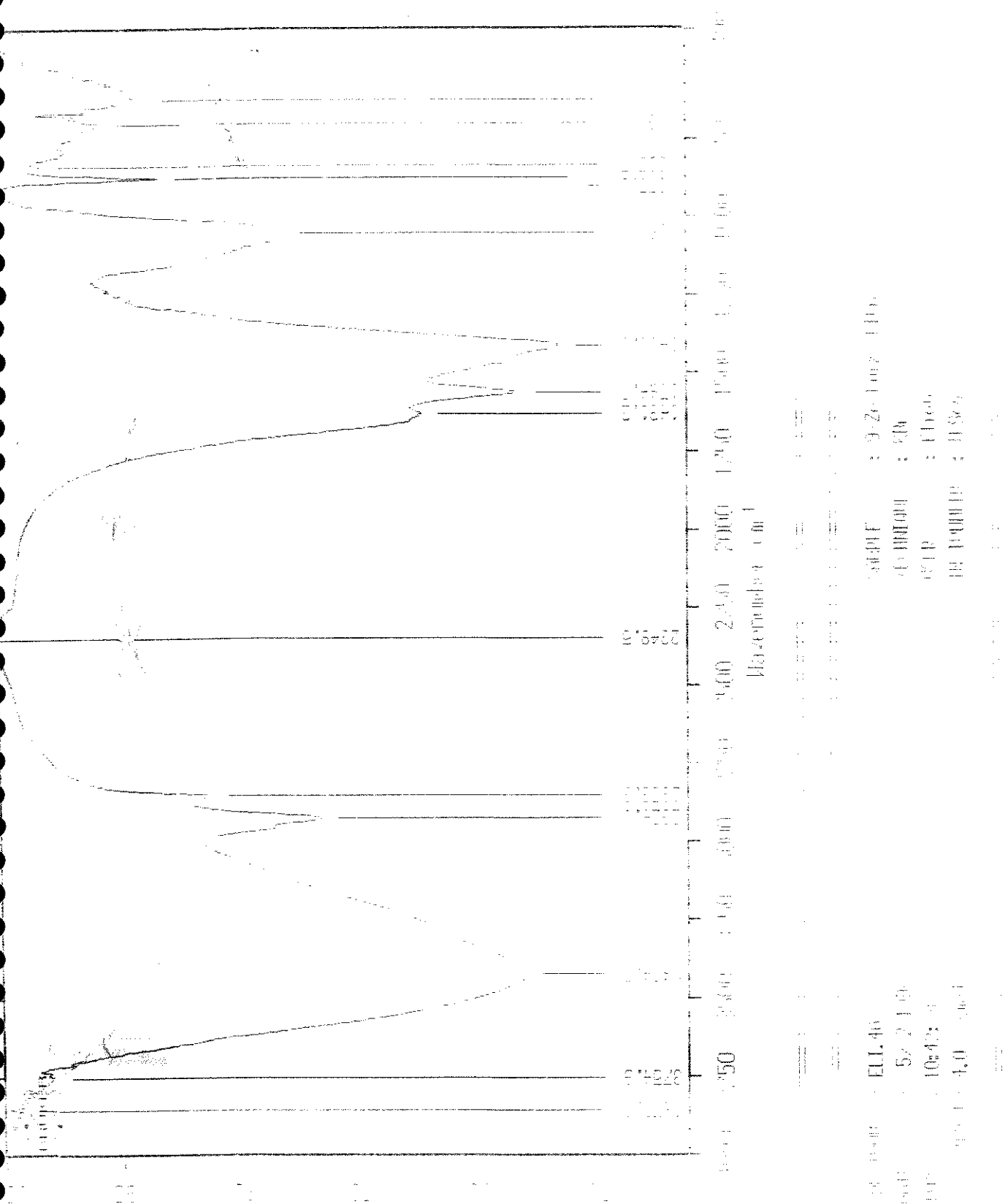
- Santiago, M.F.S., **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- Sidaway, S., **TAPPI J.**, 1988, 761, 47 - 51.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G.C. e Morrell, T. C., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, Guanabara, RJ, 1979, 299p.
- Shetty, C. S.; Greer, C. S. e Laubach, G. D., **TAPPI J.**, 1994, 77, 91- 96.
- Sonnet, P.E., **JAOCs.**, 1988, 65, 900 - 904.
- Stamatis, H.; Xenakis, A.; Kolisis, F.N., **Biotechnol. Lett.**, 1993, 15, 471 - 476.
- Stinson, S.C., **Chem. Eng. News**, 1994, 19, 38 - 72.
- Sundberg, A.; Ekman, R.; Holmbom, B.; Sundberg, K. e Thornton, J., **Appl. Paper Chem.**, 1993, 1, 226 - 231.
- Suzuki, M.; Yamamoto, H. e Mizugaki, M., **J. Biochem.**, 1986, 100, 1207 - 1213.
- Sztajer, H. e Maliszewska, I., **Enzyme Microb. Technol.**, 1988, 10, 492 - 497.
- Tamura, Y.; Takahashi, K.; Koder, Y.; Saito, Y.; Inada, Y., **Biotechnol. Lett.**, 1986, 12, 877 - 880.
- Van der Deen, H.; Hof, R. P.; Oeveren, A. V.; Feringa, B. L. e Kellog, R.M., **Tetrahedron Lett.**, 1994, 35, 8441 - 8444.
- Vinãs, I.; Dadon, J. e Sanchis, V., **Intern. J. Food Microb.**, 1993, 19, 153 - 156.
- Virto, M. D.; Agud, I.; Montero, S.; Blanco, A.; Solozabal, R. Lascaray, J. M.; Llama, M. J.; Serra, J. L.; Landeta, L. C. e de Renobales, M., **Enzyme Microb. Technol.**, 1994, 15, 239 - 247.
- Voderwülbecke, T.; Kieslich, K. and Erdmann, H., **Enzyme Microb. Technol.**, 1992, 14, 631 - 639.
- Voet, D. e Voet, J.G., **Biochemistry**, John Wiley e Sons, New York, 1995.
- Vulfson, E.N., **Trends Food Sci. Technol.**, 1993, 4, 209 - 215.

- Walter, T.; Augusta, J.; Mueller, R.J.; Widdecke, H.; Klein, J., **Enzyme Microb. Technol.**, 1995, 17, 218 - 224.
- Warmuth, W., Wenzig, E. e Mersmann, A., **Chem. Engin. Science**, 1994, 49, 5087 - 5095.
- Weetall, H.H., **J. Biomed. Materials Res.**, 1970, 4, 597 - 599.
- Weidner, J.; Theil, F. e Schick, H., **Tetrahedron:Asymmetry**, 1994, 5, 751 - 754.
- Winkler, U.K. e Stuckmam, M., **J. Bacteriol.**, 1979, 138, 663 - 670.
- Wingender, J.; Voltz, S.; Winkler, V.K., **Applied Microb. Biotechnol.**, 1987, 27, 139 -145.
- Woodward, J. **Immobilised Enzymes**, Oxford, Irl Press, 1985.
- Yamazaki, M.; Itokawa, H.; Kinoshita, H., **Trans. Mycol. Soc. Jap.**, 1979, 20, 203 - 210 in **Microbiology Abstracts**, 1980, 24, 35.

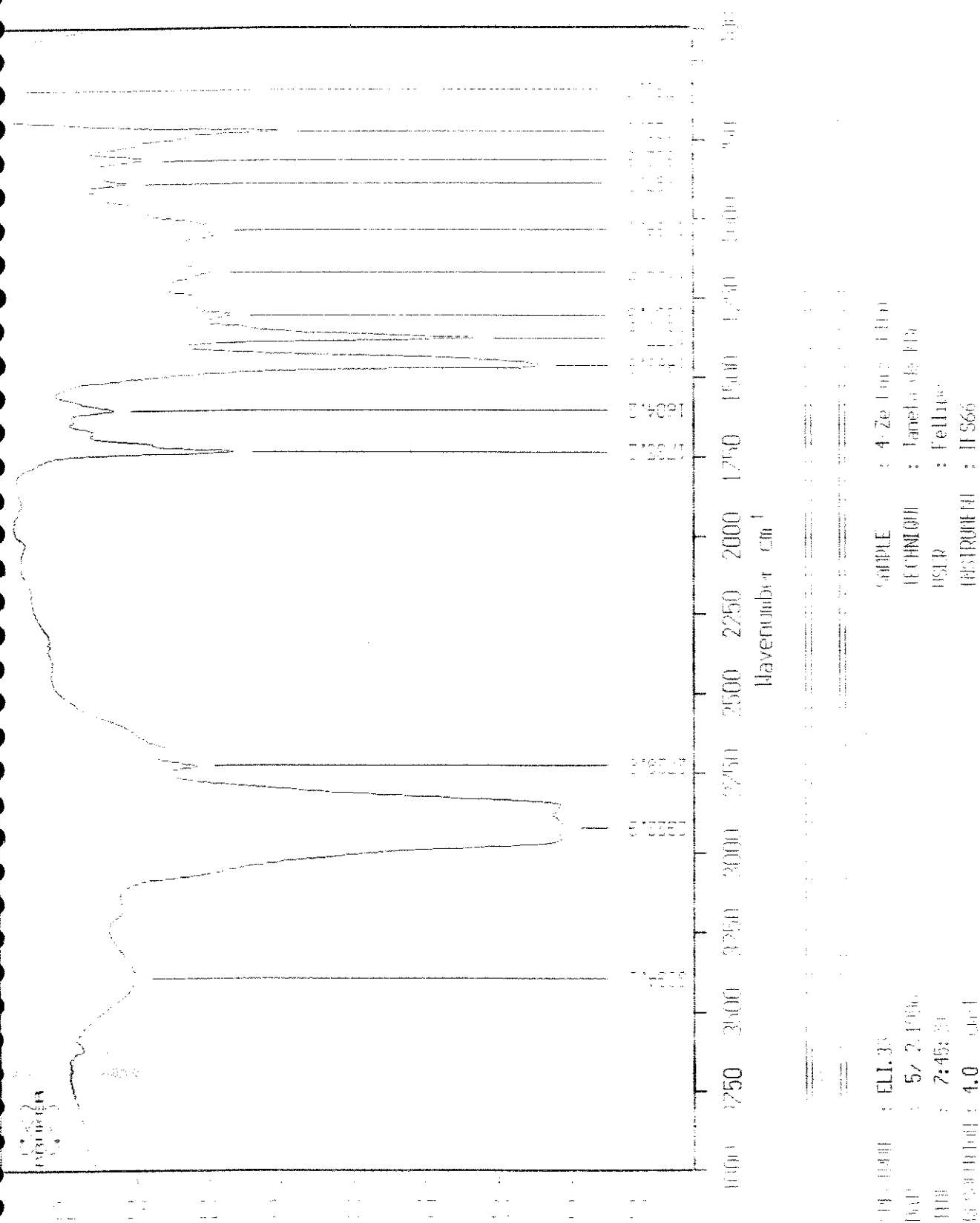
A P Ê N D I C E S

APÊNDICE I

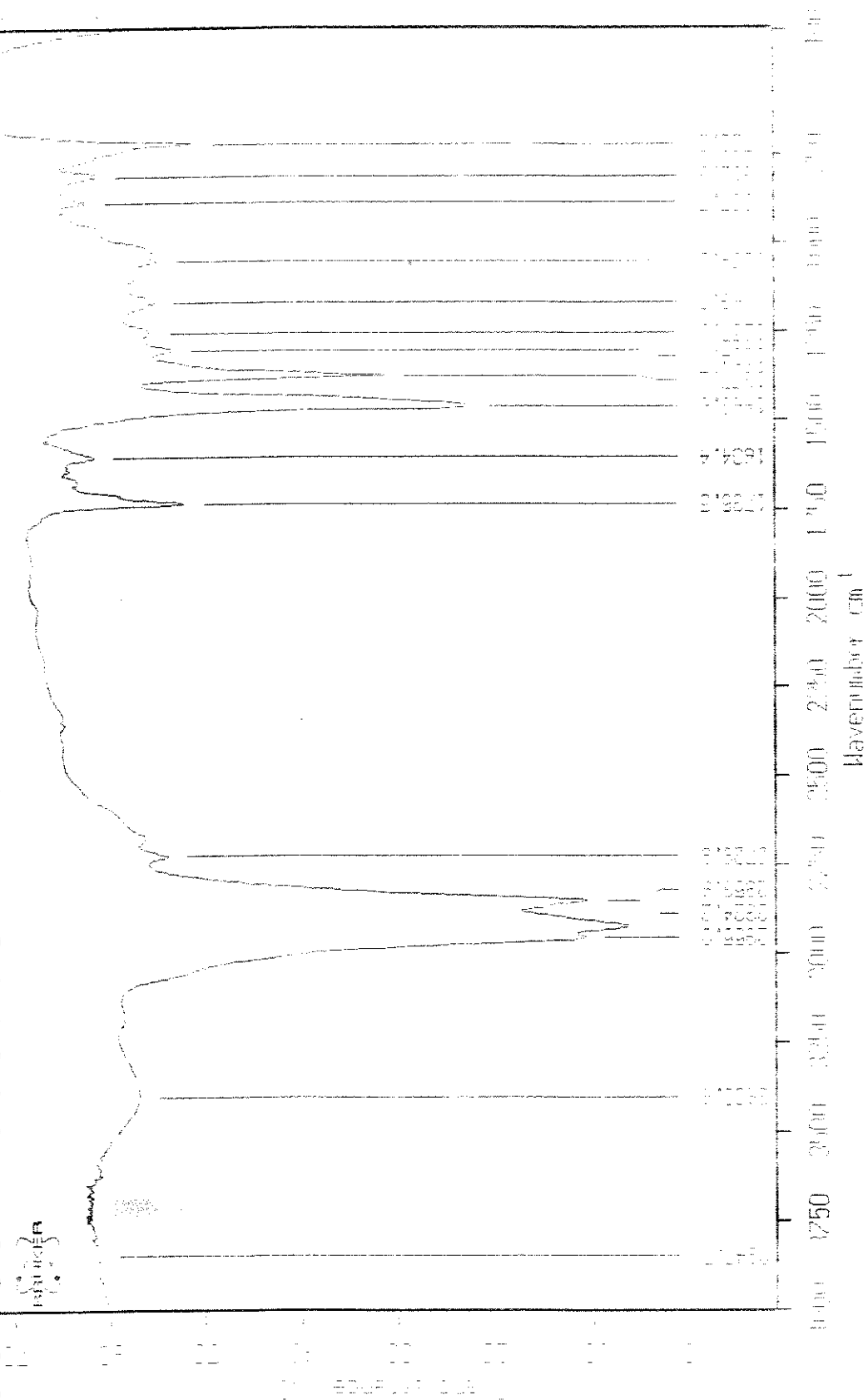
ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS A PARTIR DOS EXTRATIVOS HIDROFÍLICOS E LIPOFÍLICOS PROVINIENTES DAS AMOSTRAS DE REJEITO / “ PITCH “ . CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.21 E 3.2.25.



A.I. FIGURA 1 - Espectro de infravermelho da amostra rejeito / "pitch" in natura extraída sob agitação com água destilada à temperatura ambiente. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



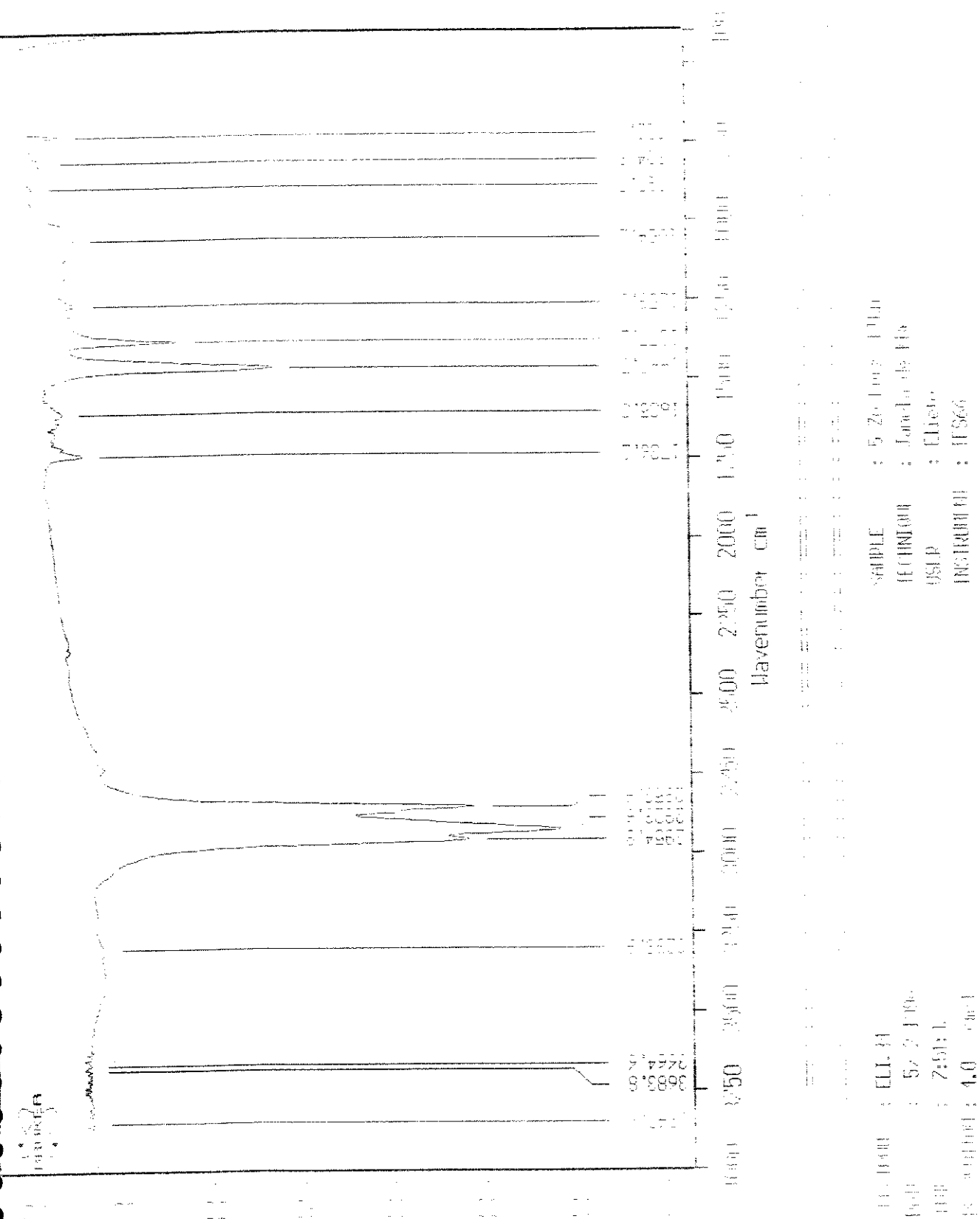
A.I. FIGURA 4 - Espectro de infravermelho da amostra rejeito / "pitch" in natura extraída sob agitação com acetona e submetida a lavagem prévia com tampão. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



SAMPLE : 6-Ze 107-110
 TECHNIQUE : Janelas Pb
 USER : Elton
 INSTRUMENT : F566

WAVELENGTH : 4.0 cm⁻¹
 WAVELENGTH : 7.50 cm⁻¹
 WAVELENGTH : 5.21 cm⁻¹
 WAVELENGTH : 4.17 cm⁻¹

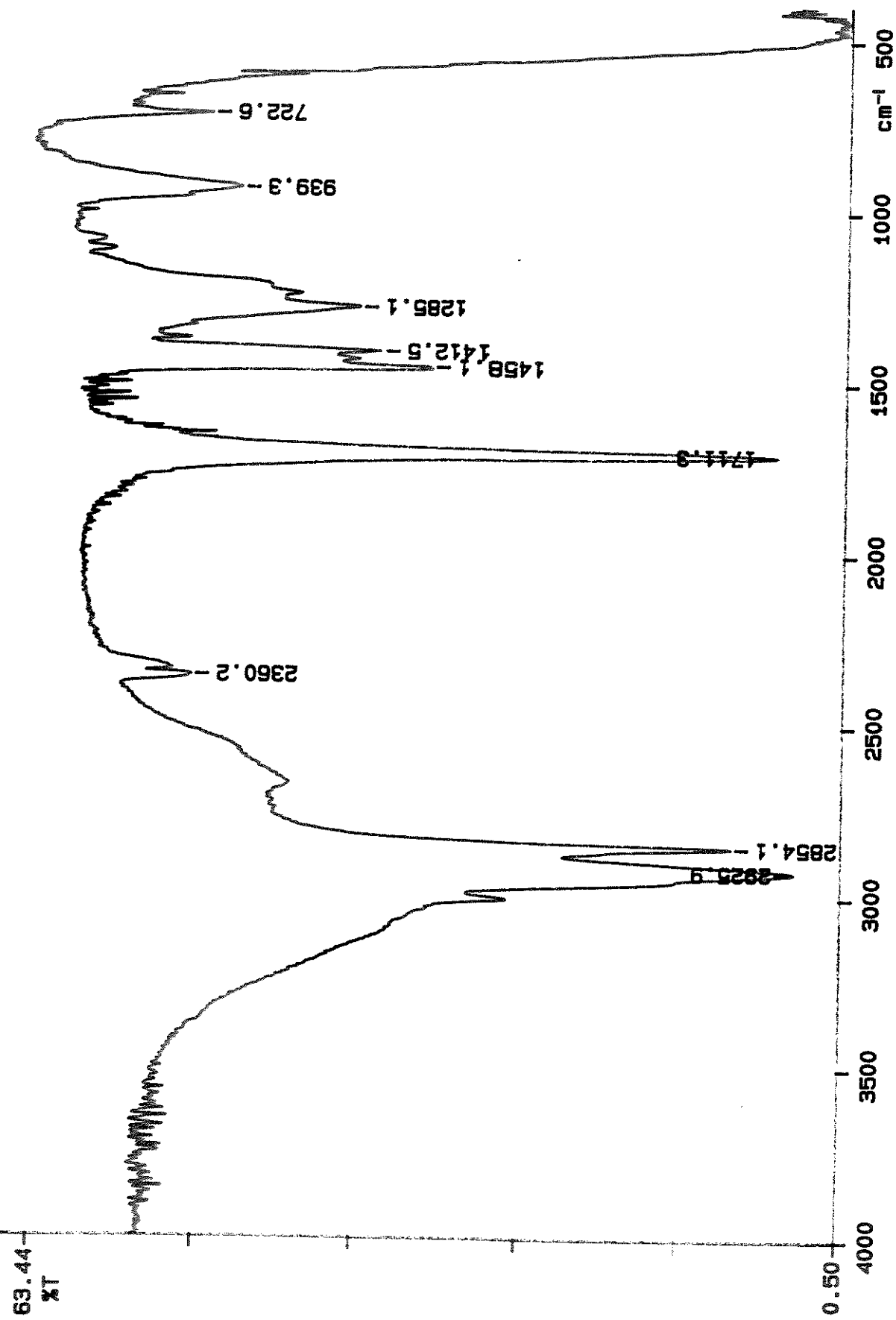
A.I. FIGURA 5 - Espectro de infravermelho da amostra rejeito / "pitch" *in natura* extraída com diclorometano sem agitação e sem lavagens prévias com água e tampão. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



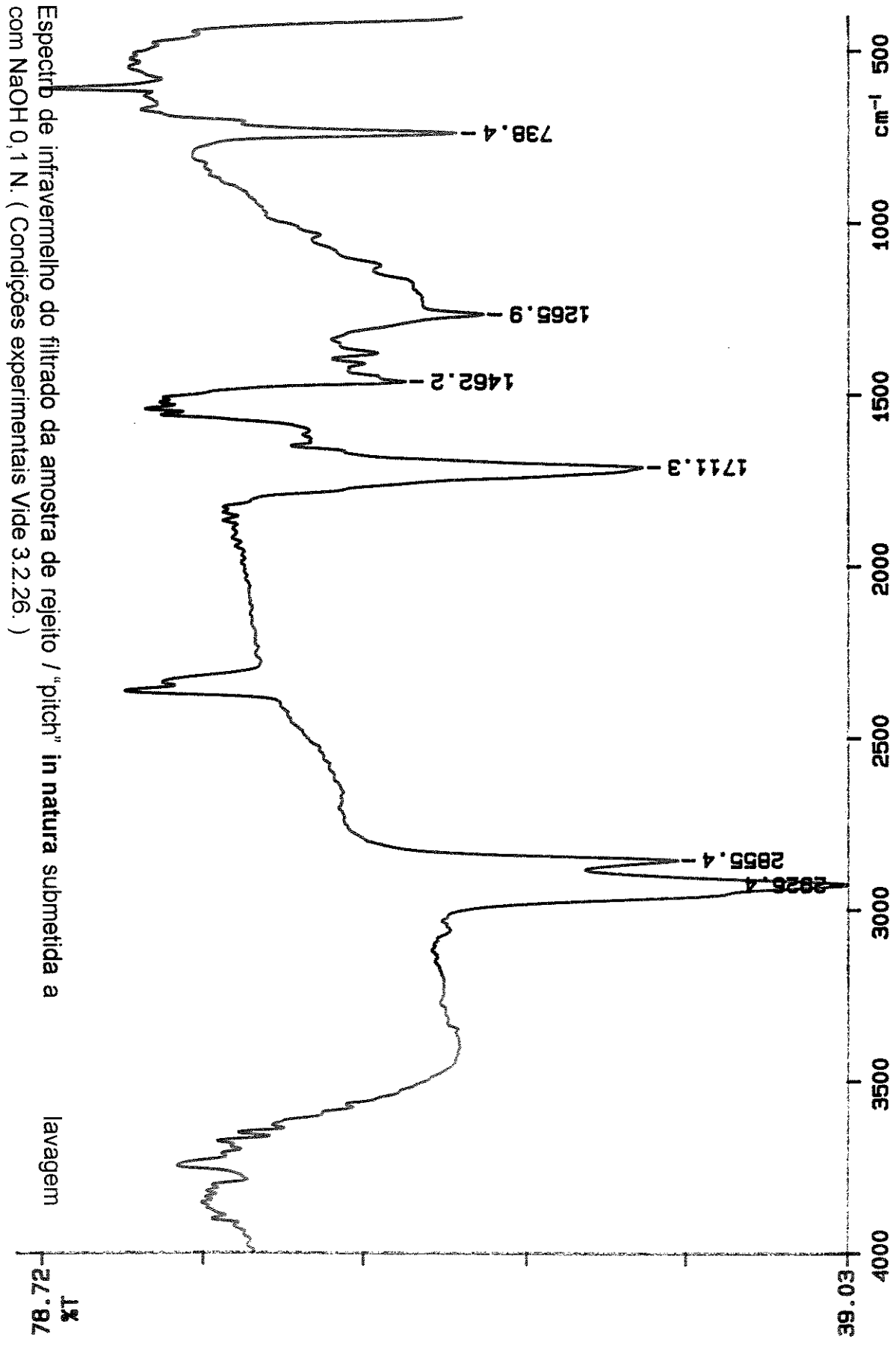
A.I. FIGURA 6 - Espectro de infravermelho da amostra rejeito / "pitch" in natura extraída sob agitação com diclorometano e submetida a lavagem prévia com tampão. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)

APÊNDICE II

ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS A PARTIR DO PADRÃO ÁCIDO OLEICO, DAS AMOSTRAS DE REJEITO / " PITCH " LAVADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaOH (0,1; 0,5 E 2,0 N) E DO FILTRADO APÓS LAVAGEM COM NaOH 0,1 N. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.21 E 3.2.25.

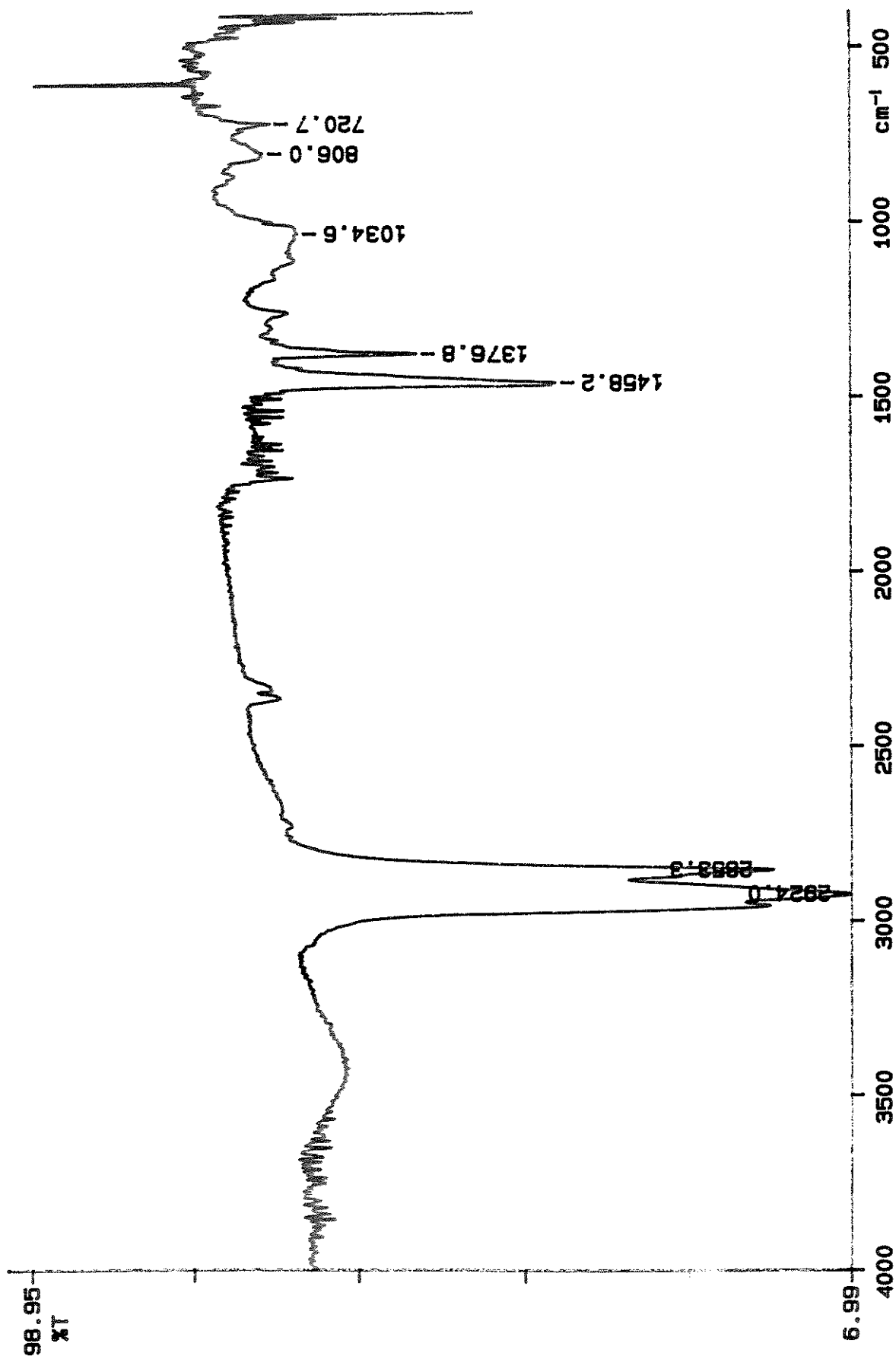


A.II. FIGURA 7 - Espectro de infravermelho do padrão ácido oleico. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)

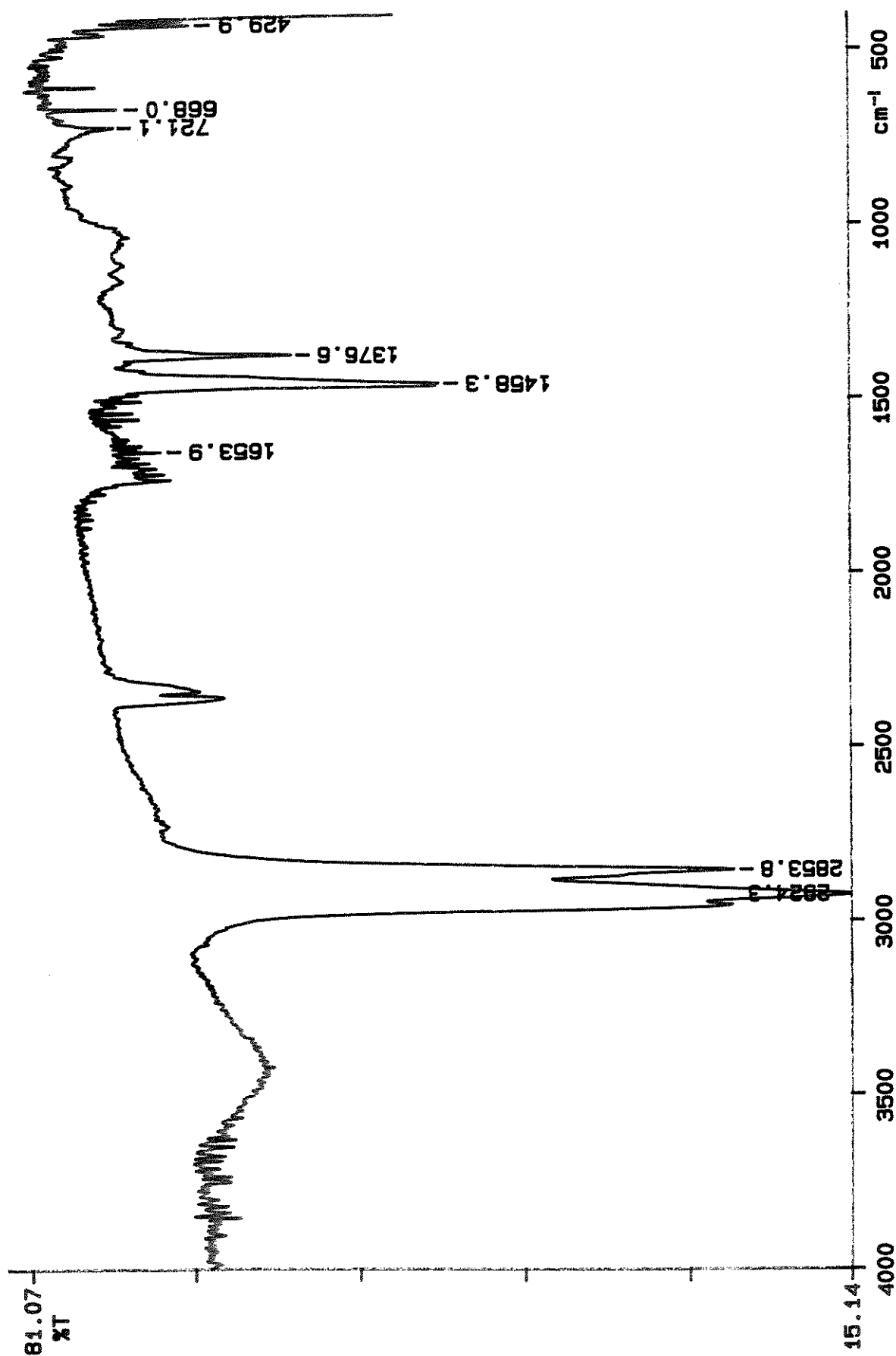


A.II. FIGURA 8 - Espectro de infravermelho do filtrado da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a lavagem com NaOH 0,1 N. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)

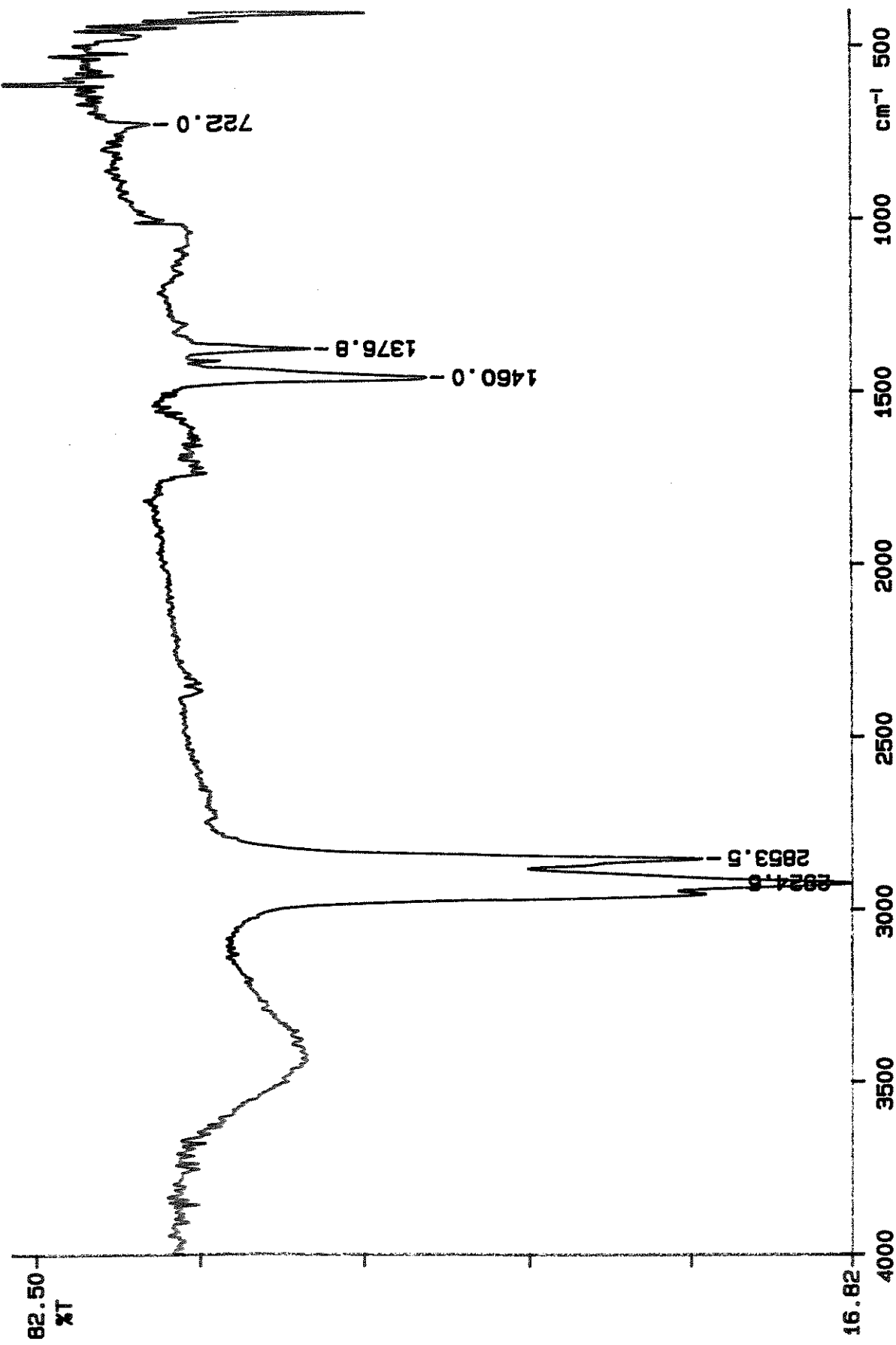
A.II. FIGURA 8 - Espectro de infravermelho do filtrado da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a lavagem com NaOH 0,1 N. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



A.II. FIGURA 9 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "piñón" in natura submetida a lavagem NaOH 0,1 N e re-extraída com diclorometano. (Condições experimentais de 3.2.26.)



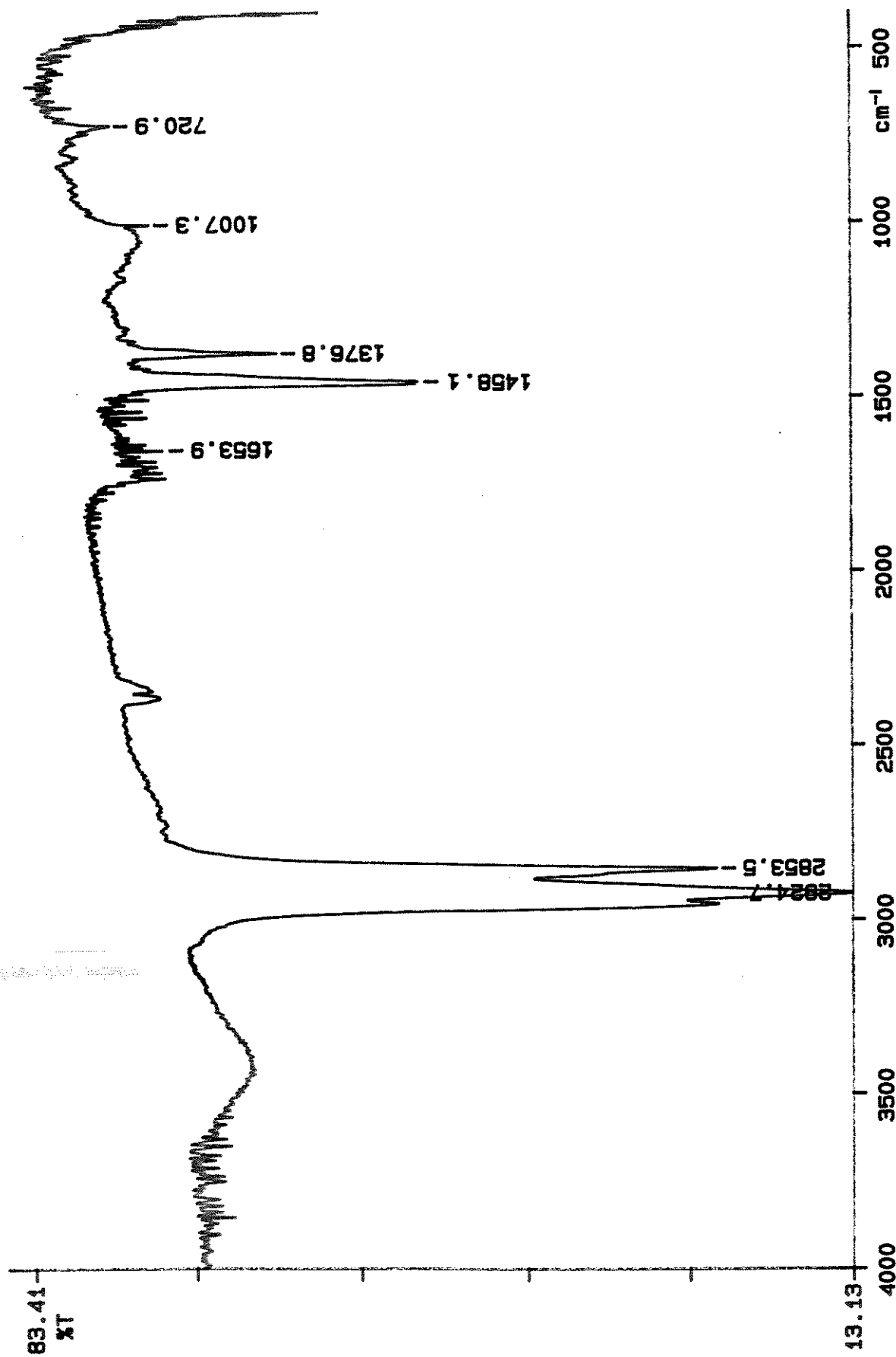
A.II. FIGURA 10 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a lavagem NaOH 0,5 N e re-extraída com diclorometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



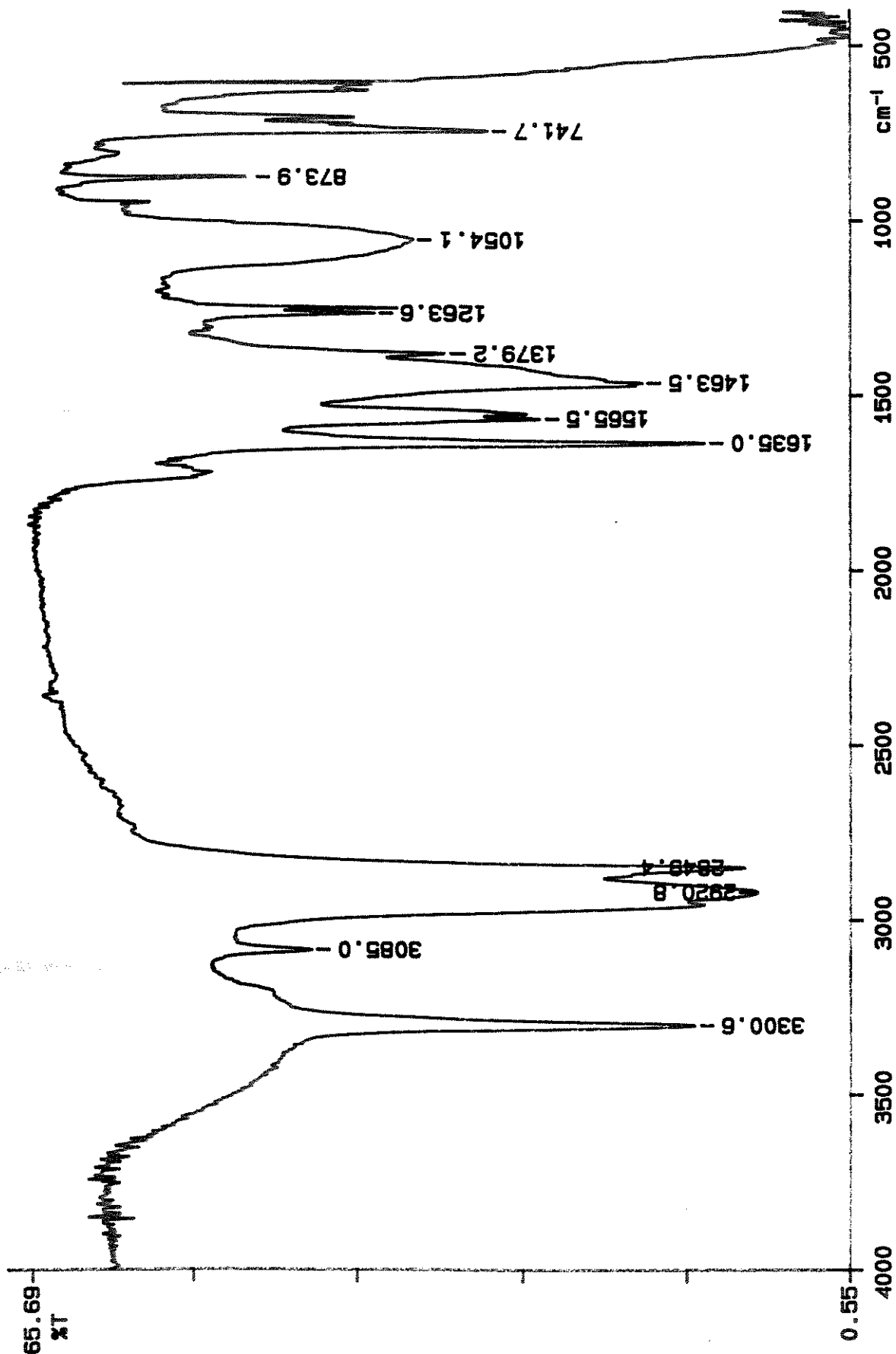
A.II. FIGURA 11 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a lavagem NaOH 2,0 N e re-extraída com diclorometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)

APÊNDICE III

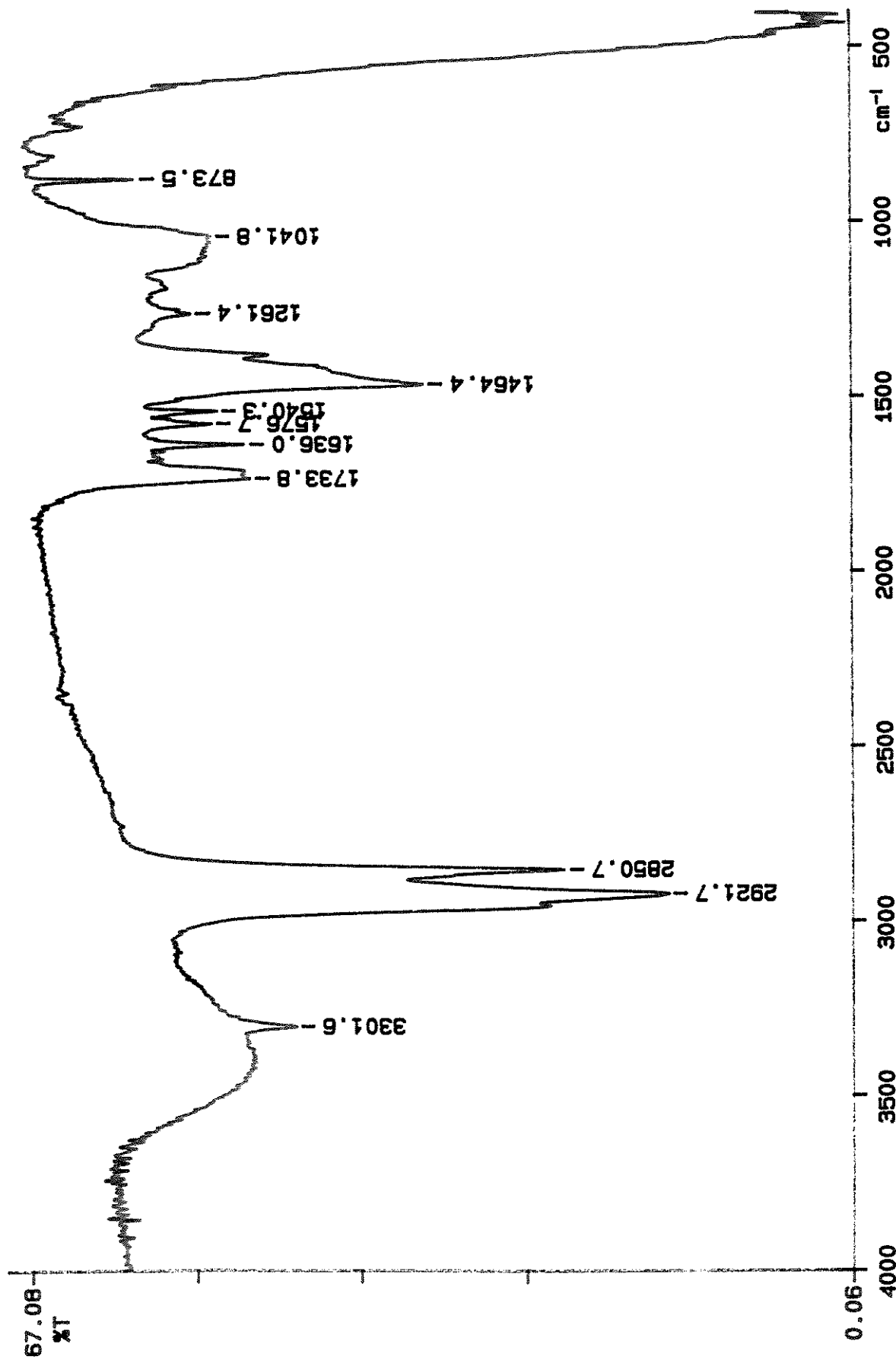
ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS DAS AMOSTRAS DE REJEITO / “ PITCH ” SUBMETIDAS A UMA EXTRAÇÃO SELETIVA COM SOLVENTES . CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.21 E 3.2.25.



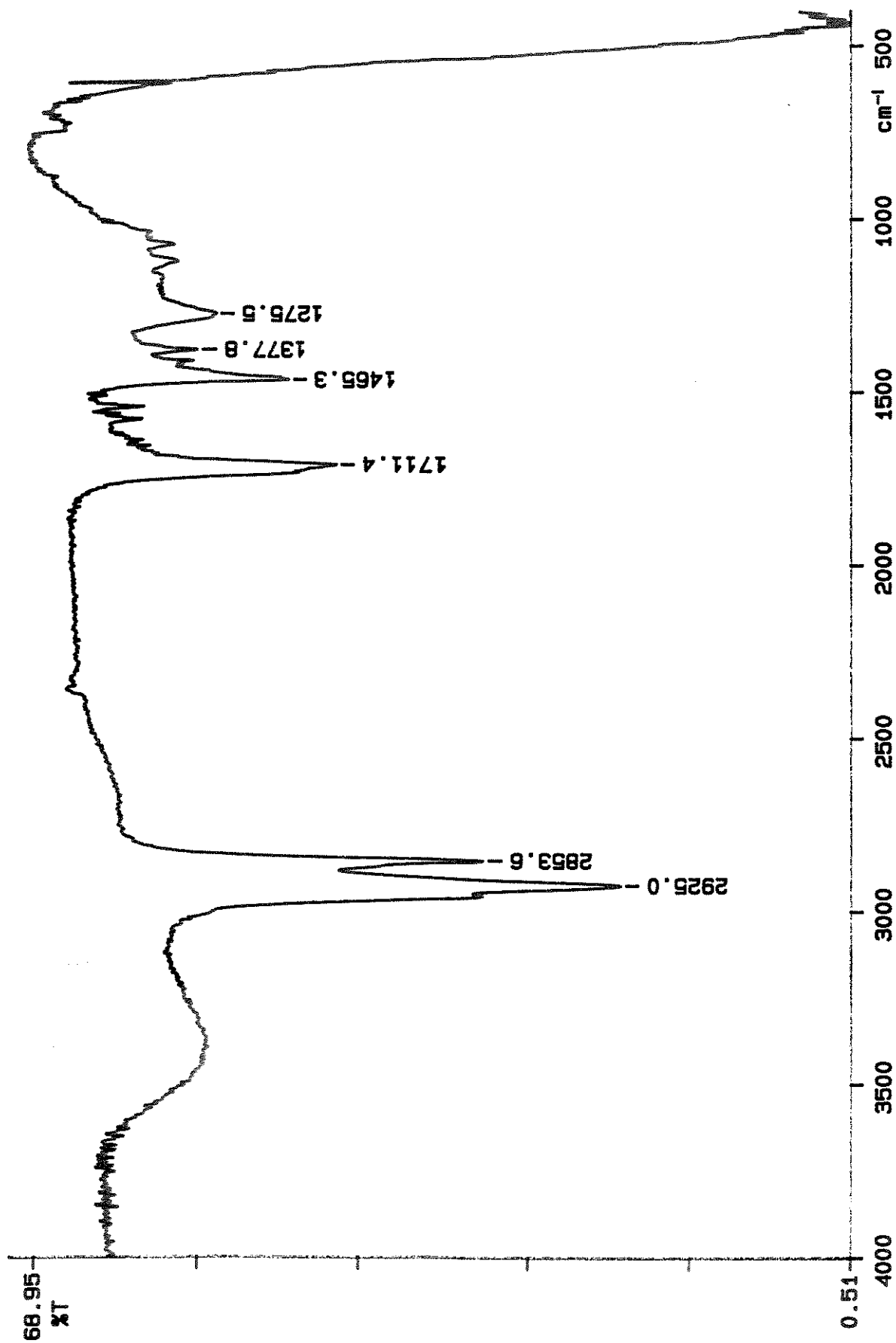
A.III. FIGURA 12 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura extraída com hexano.
(Condições experimentais Vide 3.2.26.)



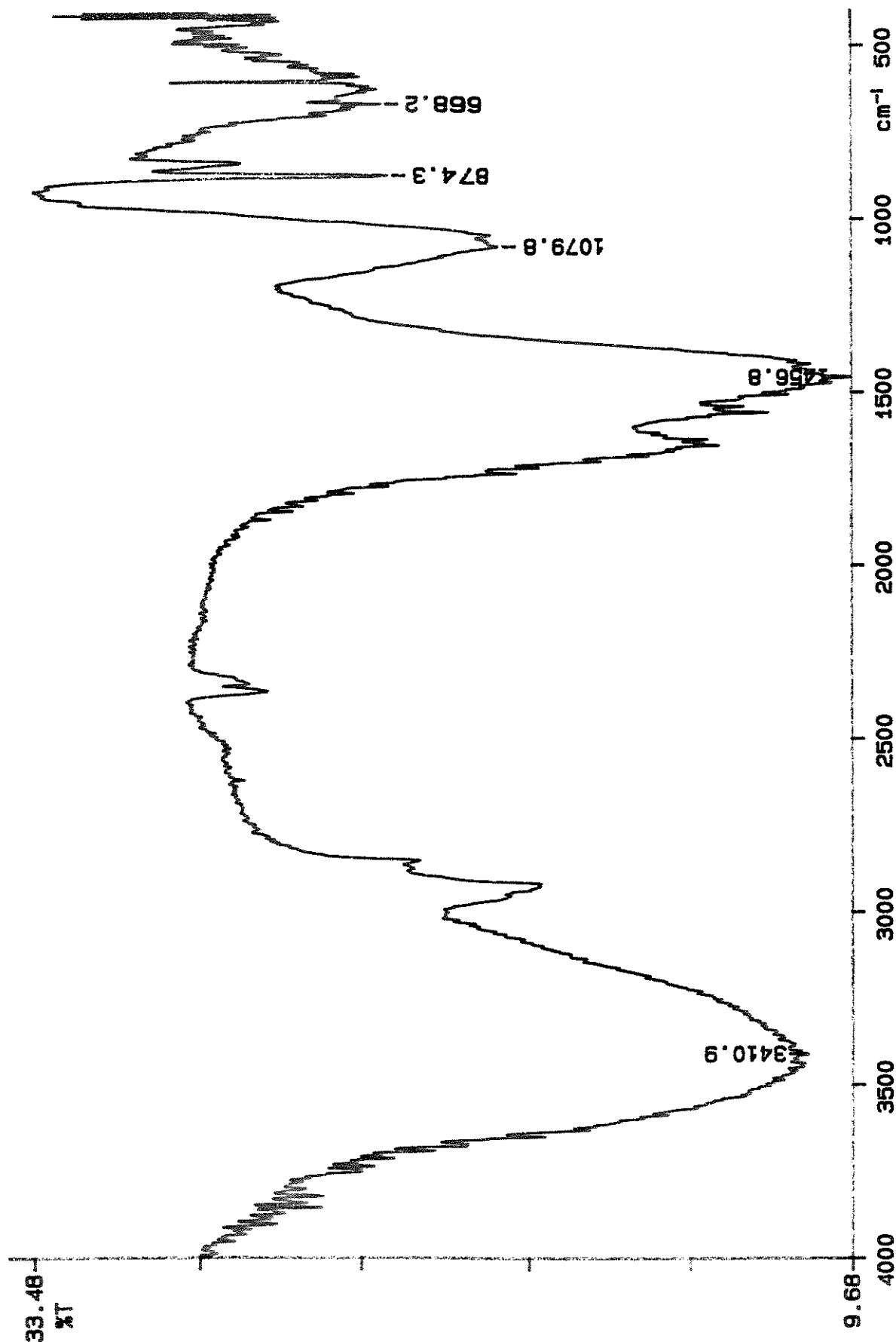
A.III. FIGURA 13 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura extraída com clorofórmio.
(Condições experimentais Vide 3.2.26.)



A.III. FIGURA 14 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito/ "pitch" in natura extraída com diclorometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26)



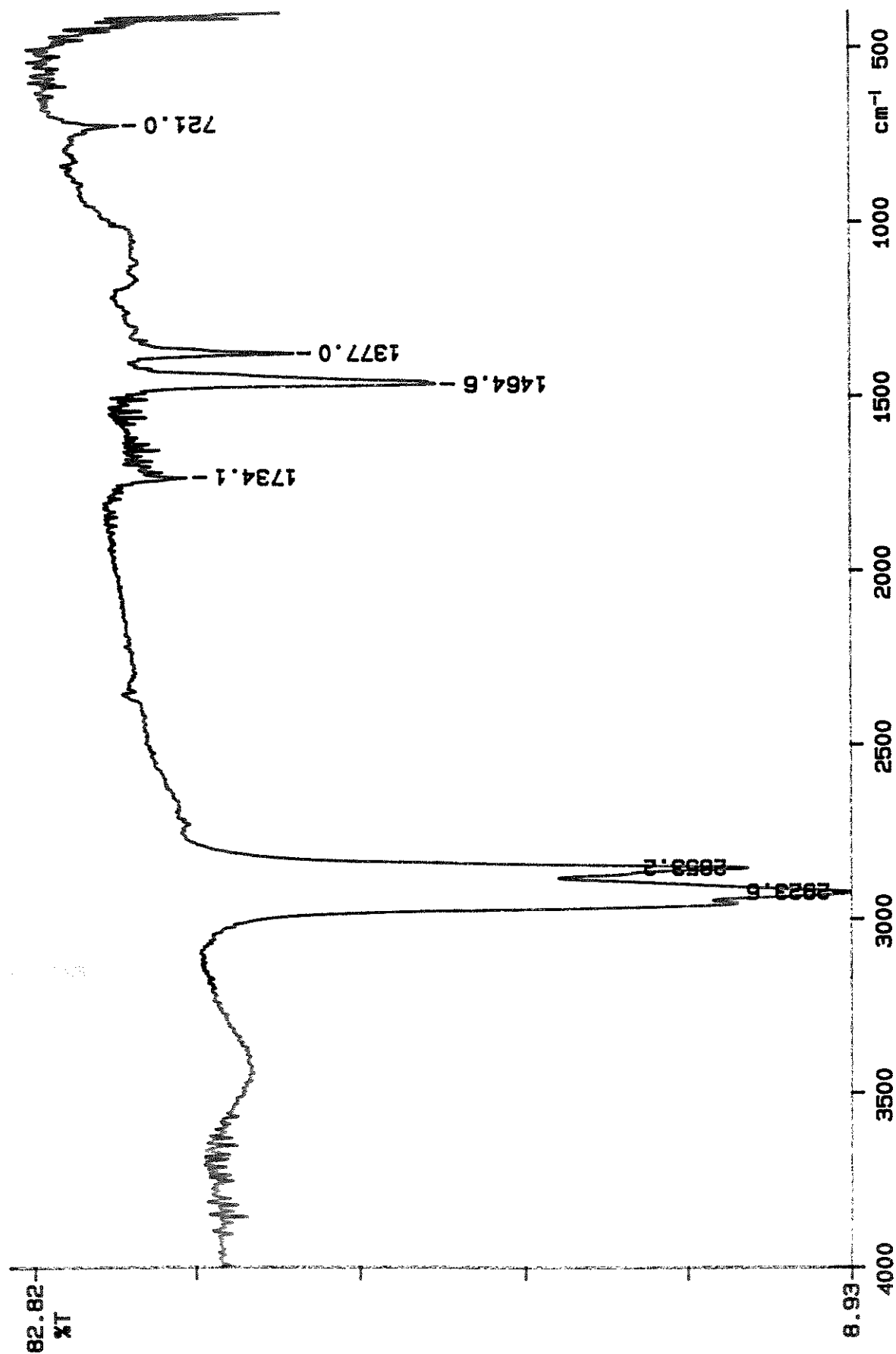
A.III. FIGURA 15 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura extraída com acetona.
(Condições experimentais Vide 3.2.26.)



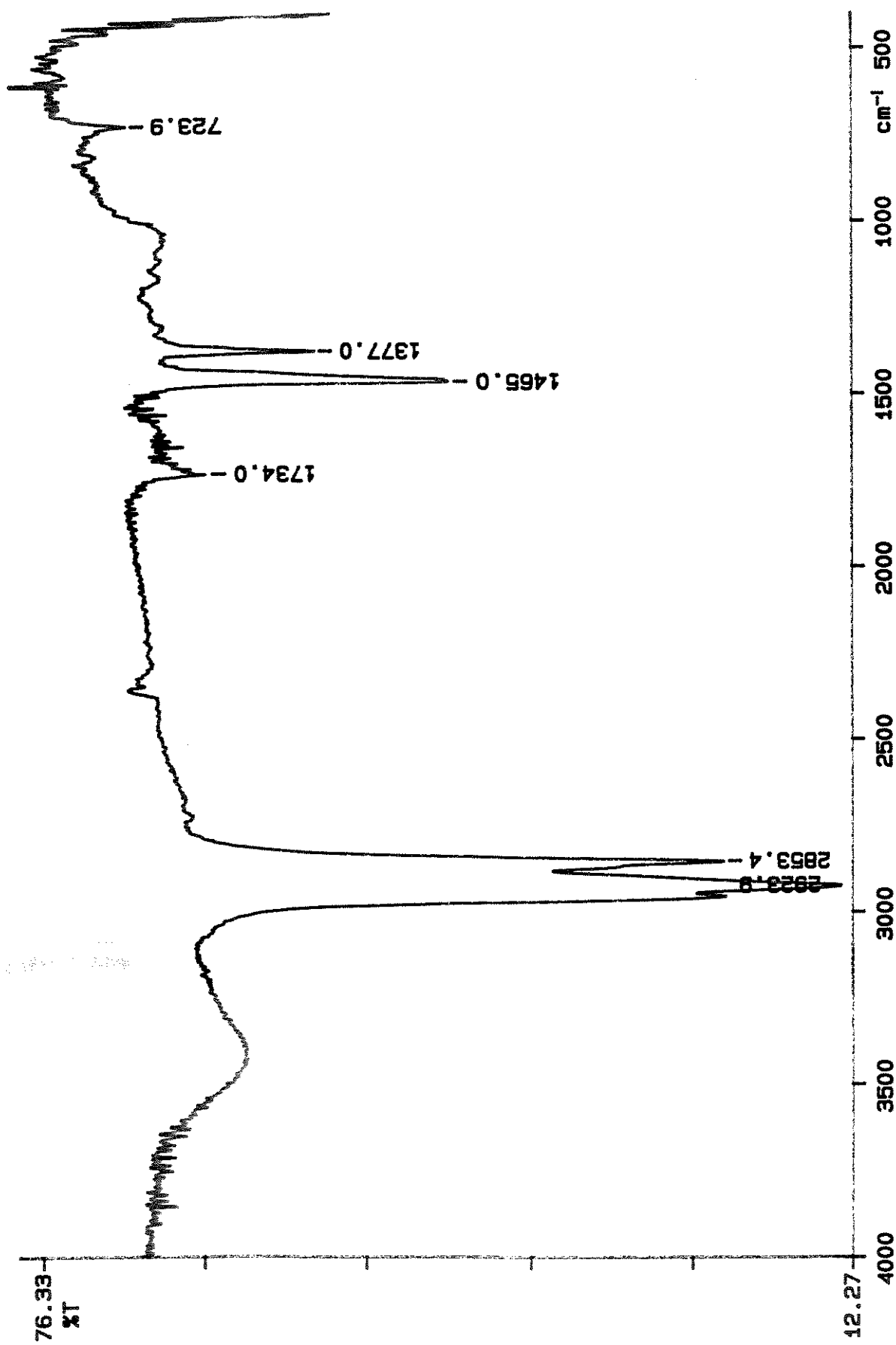
A.III. FIGURA 16 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura extraída com água.
(Condições experimentais Vide 3.2.26.)

APÊNDICE IV

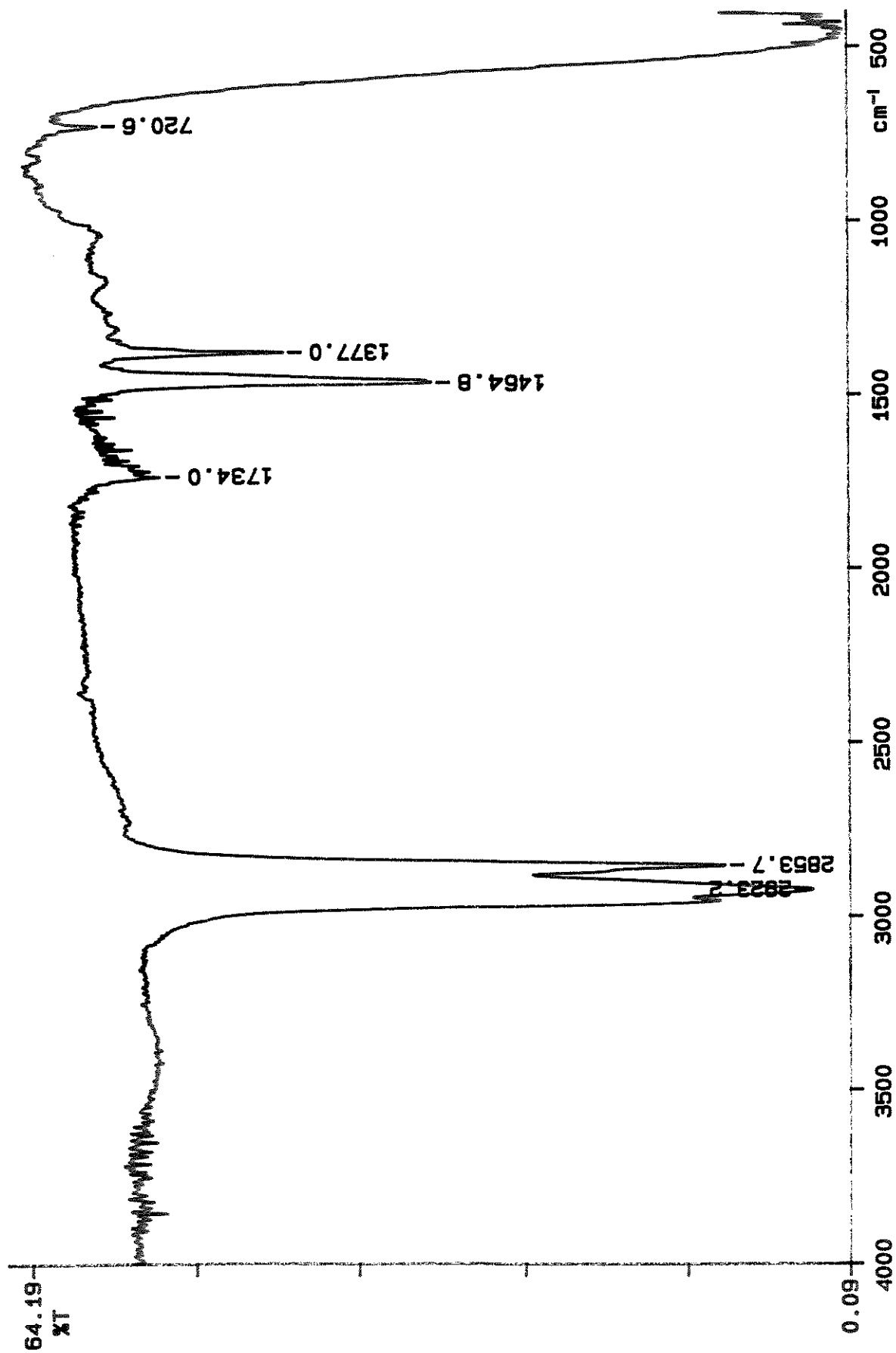
ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE REJEITO /
“ PITCH ” SUBMETIDAS À REAÇÃO ENZIMÁTICA COM A LIPASE DE
Candida rugosa. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.26.



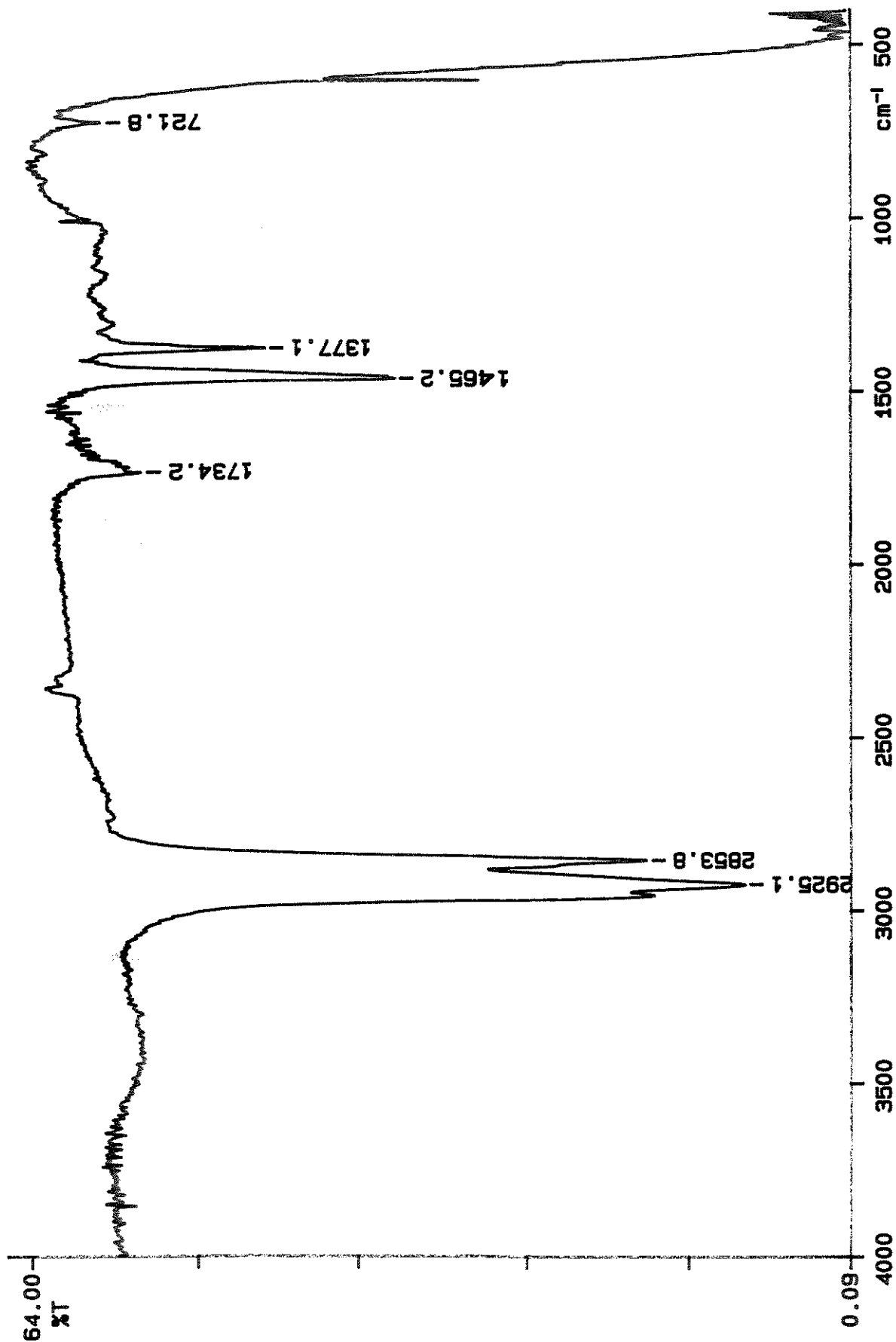
A.IV. FIGURA 17 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a reação enzimática (1h, 45 °C) com lipase de *Candida rugosa* e extraída posteriormente com diclo ometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26.).



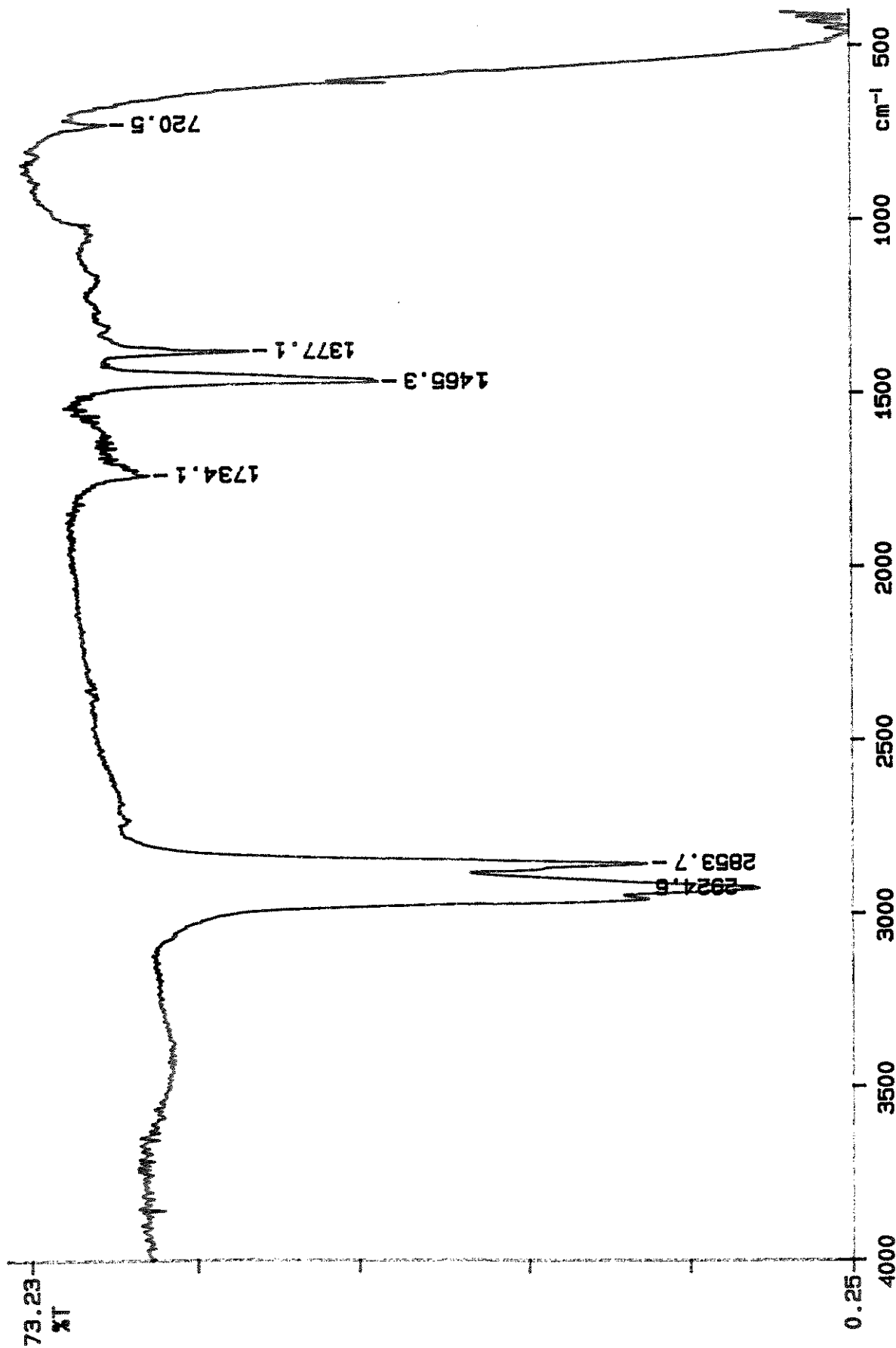
A.IV. FIGURA 18 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a reação enzimática (6h, 45 °C) com lipase de *Candida rugosa* e extraída posteriormente com diclo ometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



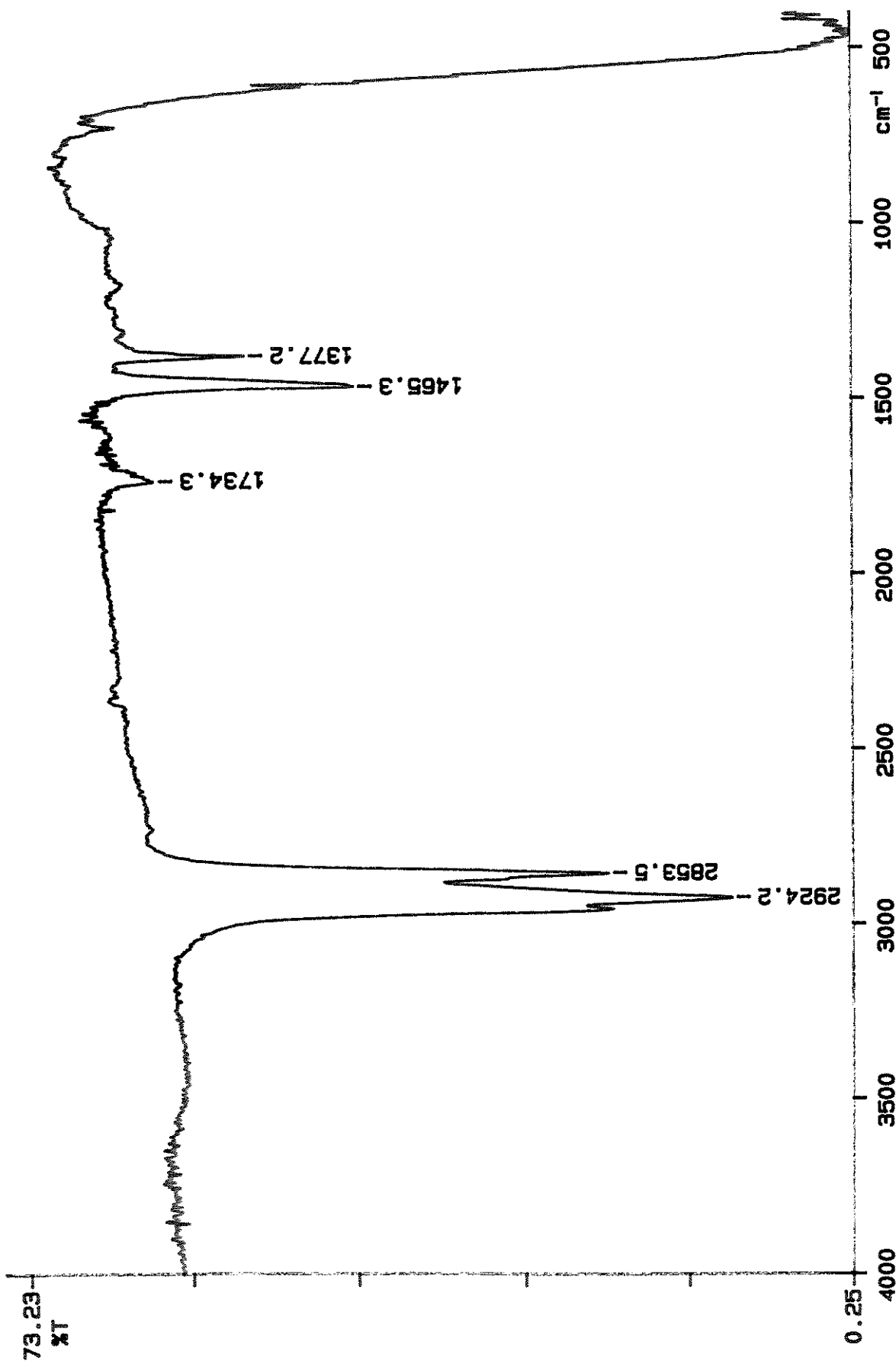
A.IV. FIGURA 19 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a reação enzimática (12h, 45 °C) com lipase de *Candida rugosa* extraída posteriormente com diclo ometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



A.IV. FIGURA 20 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a reação enzimática (1h, 30 °C) com lipase de *Candida rugosa* e extraída posteriormente com diclo ometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



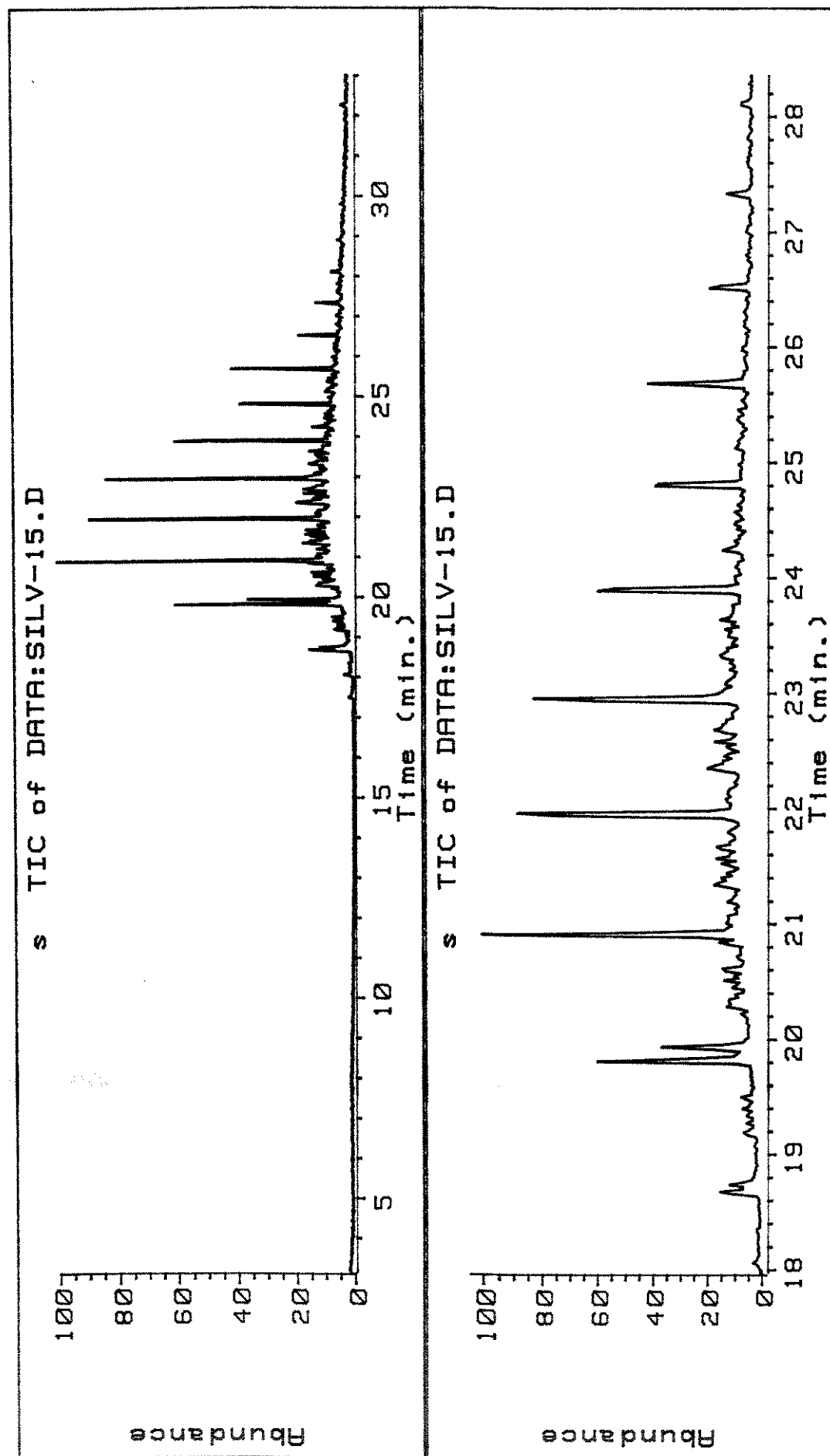
A.IV. FIGURA 21 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a reação enzimática (6h, 30 °C) com lipase de *Candida rugosa* e extraída posteriormente com diclo ometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)



A.IV. FIGURA 22 - Espectro de infravermelho da amostra de rejeito / "pitch" in natura submetida a reação enzimática (12h, 30 °C) com lipase de *Candida rugosa* e extraída posteriormente com diclo ometano. (Condições experimentais Vide 3.2.26.)

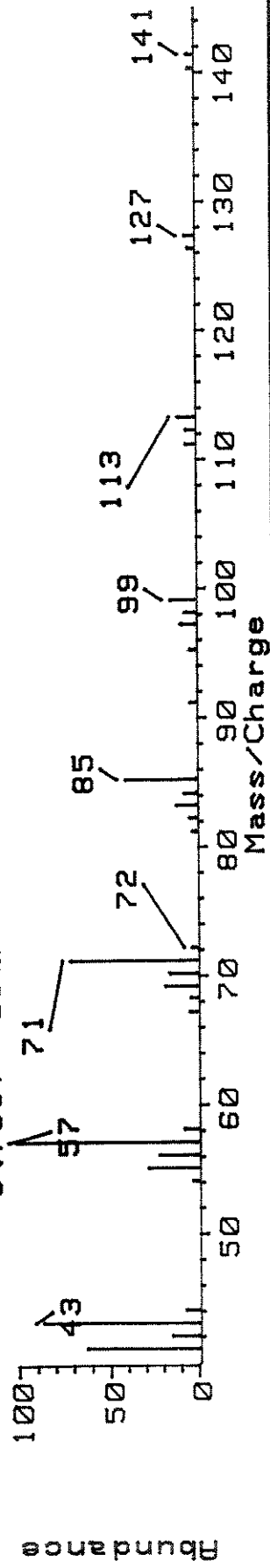
APÊNDICE V

CROMATROGRAMA COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA OBTIDO DA AMOSTRA DE REJEITO / “ PITCH ” SUBMETIDA A LAVAGEM COM NaOH 0,1 N. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.27 E 3.2.28.

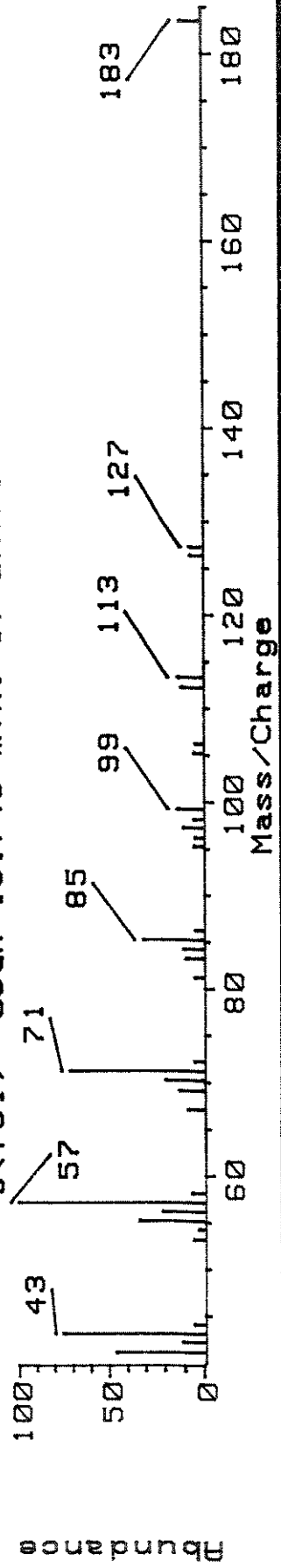


A.V. FIGURA 23 - Cromatograma com seus respectivos espectros de massa da amostra rejeito / "pitch" in natura submetida a lavagem com NaOH 0,1 N. (Condições experimentais Vide 3.2.27. e 3.2.28.)

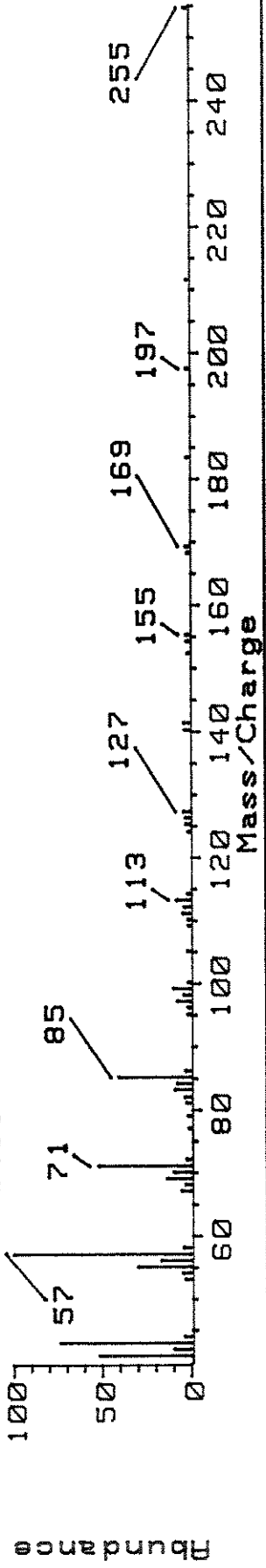
s(758) Scan 18.683 min. of DATA:SILV-15.D



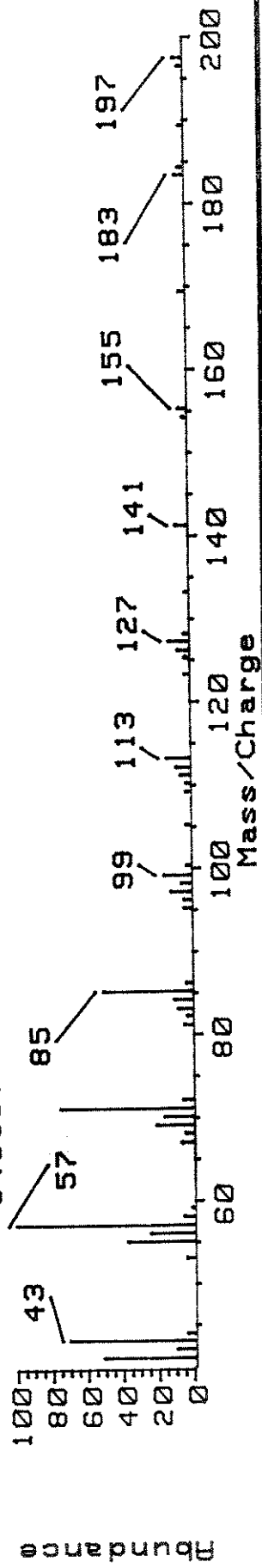
s(761) Scan 18.745 min. of DATA:SILV-15.D



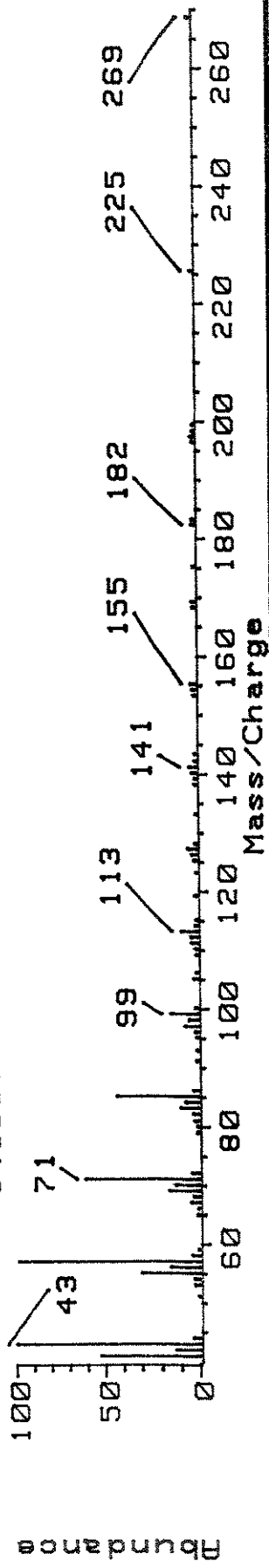
s(813) Scan 19.814 min. of DATA:SILV-15.D



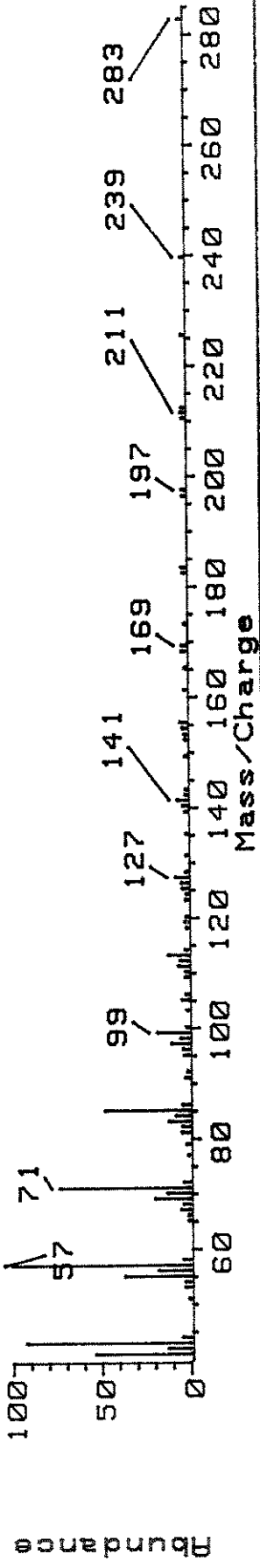
s(819) Scan 19.939 min. of DATA:SILV-15.D

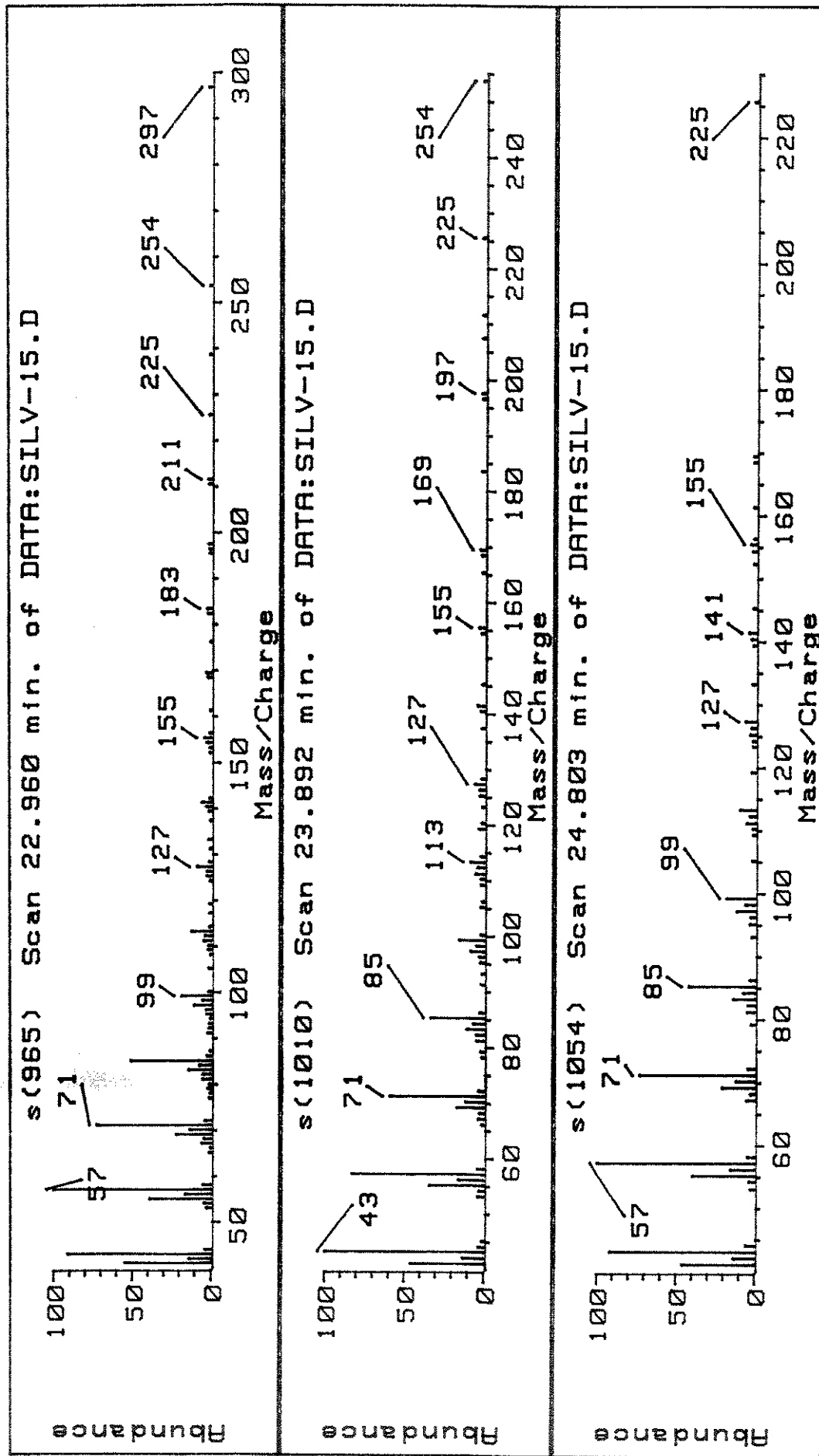


s(866) Scan 20.910 min. of DATA:SILV-15.D

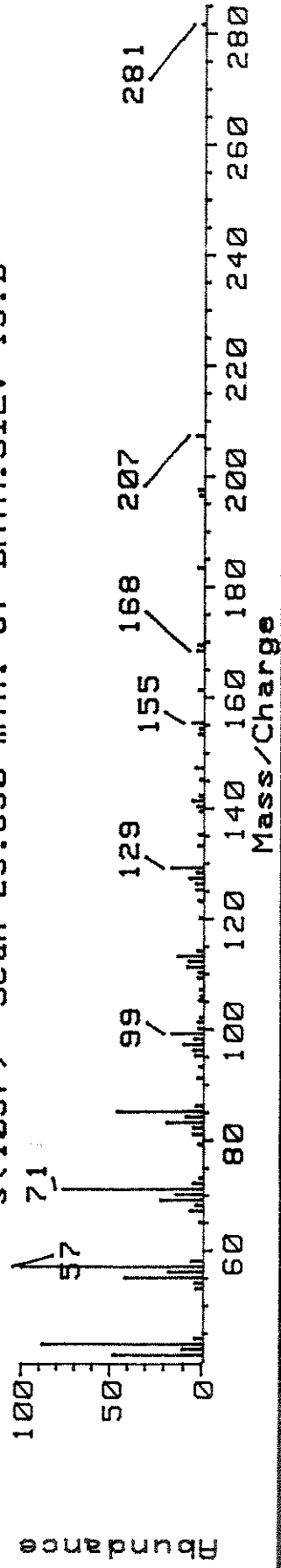


s(917) Scan 21.965 min. of DATA:SILV-15.D

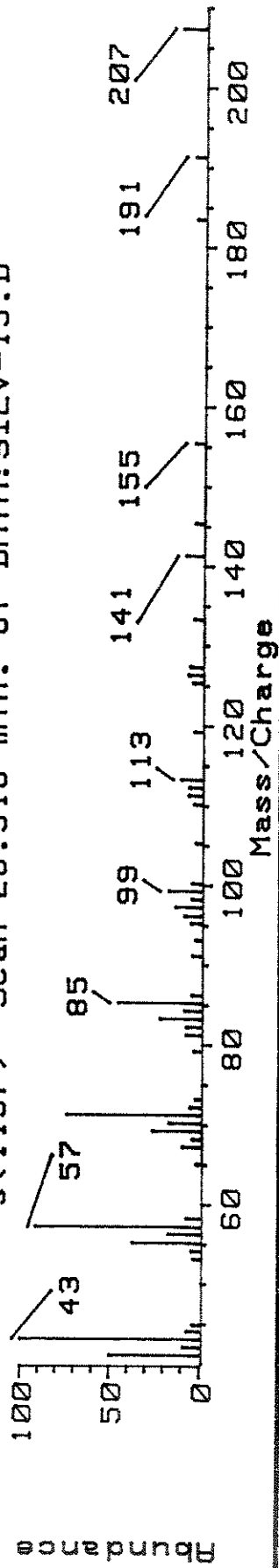




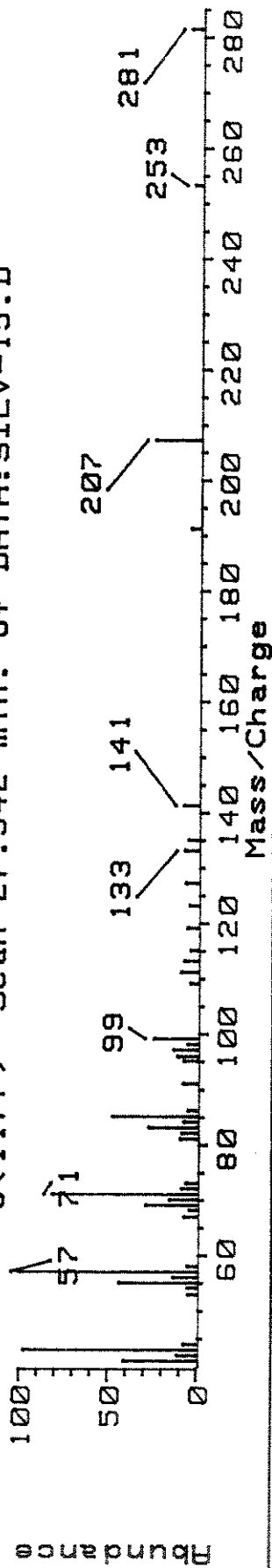
s(1097) Scan 25.690 min. of DATA:SILV-15.D

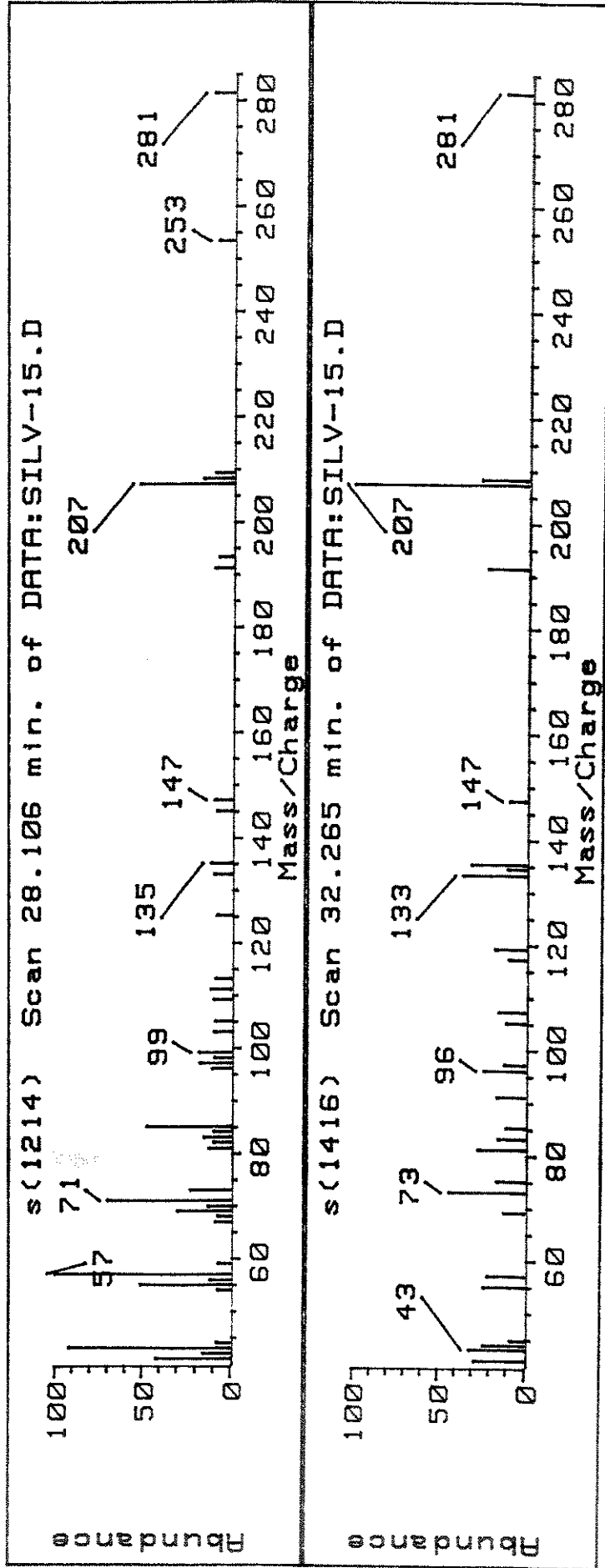


s(1137) Scan 26.518 min. of DATA:SILV-15.D



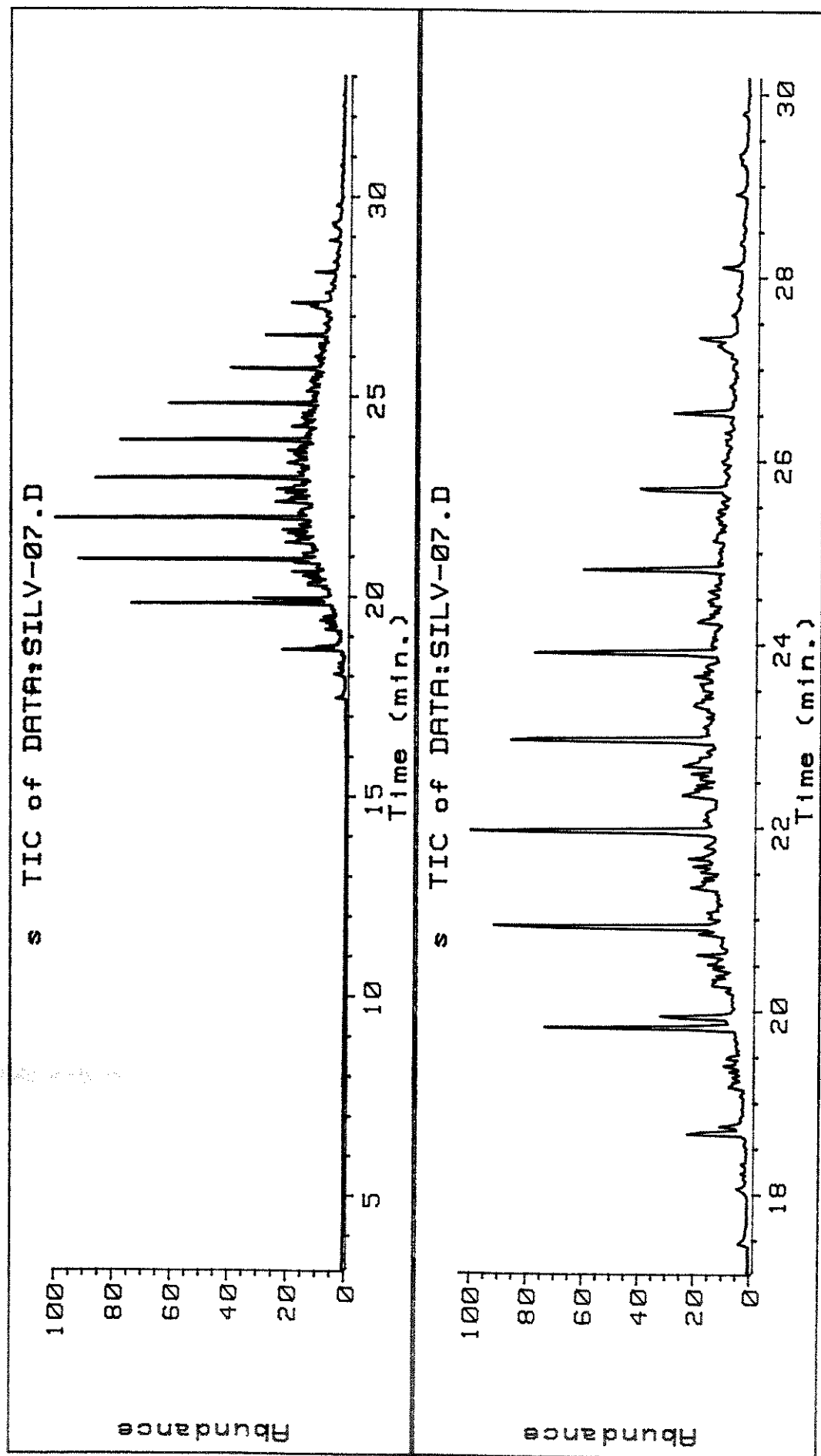
s(1177) Scan 27.342 min. of DATA:SILV-15.D



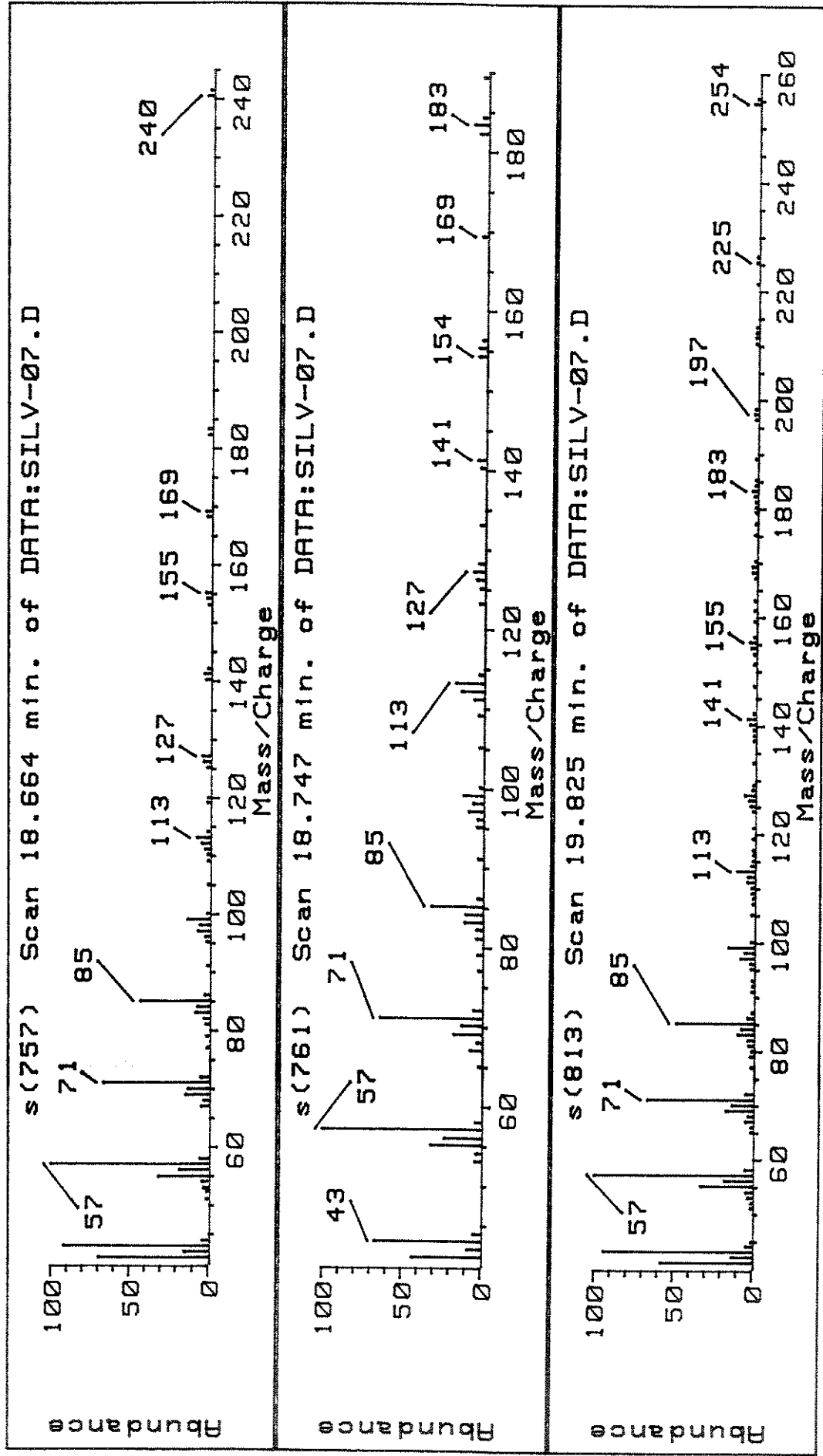


APÊNDICE VI

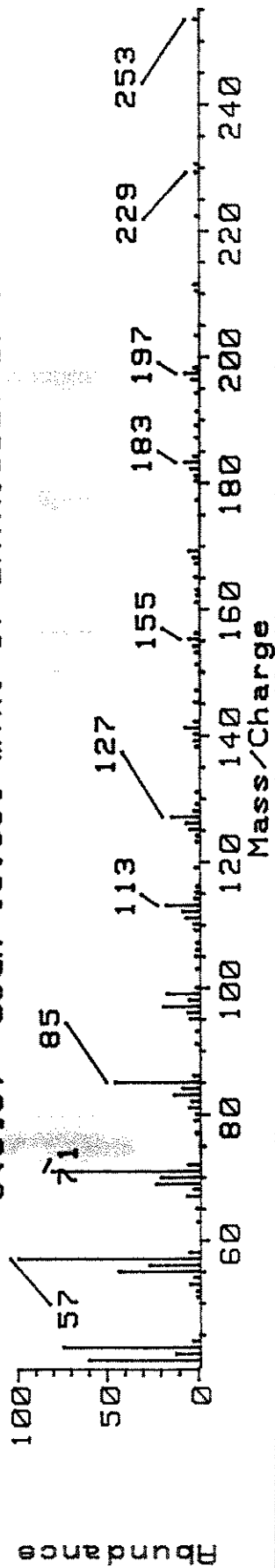
CROMATROGRAMA COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA OBTIDO DA AMOSTRA DE REJEITO / “ PITCH ” SUBMETIDA A EXTRAÇÃO COM HEXANO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.27 E 3.2.28.



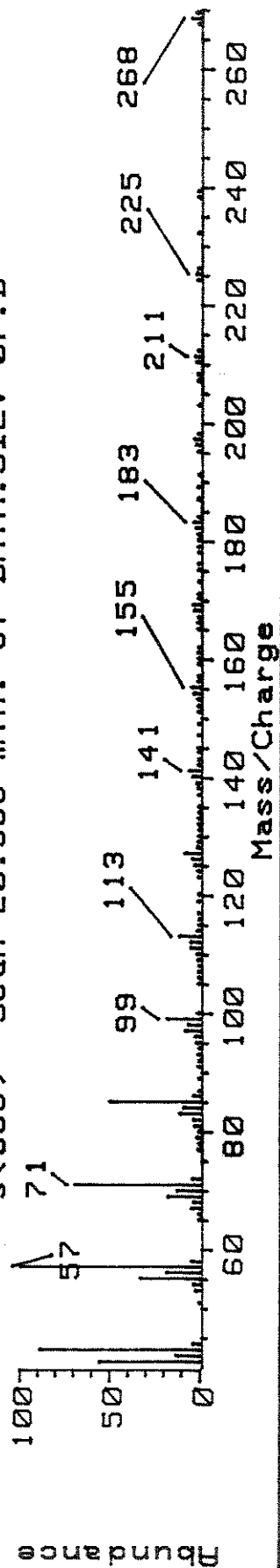
A.VI. FIGURA 24 - Cromatograma com seus respectivos espectros de massa da amostra rejeito / "pitch" in natura submetida a extração com hexano. (Condições experimentais Vide 3.2.27. e 3.2.28.)



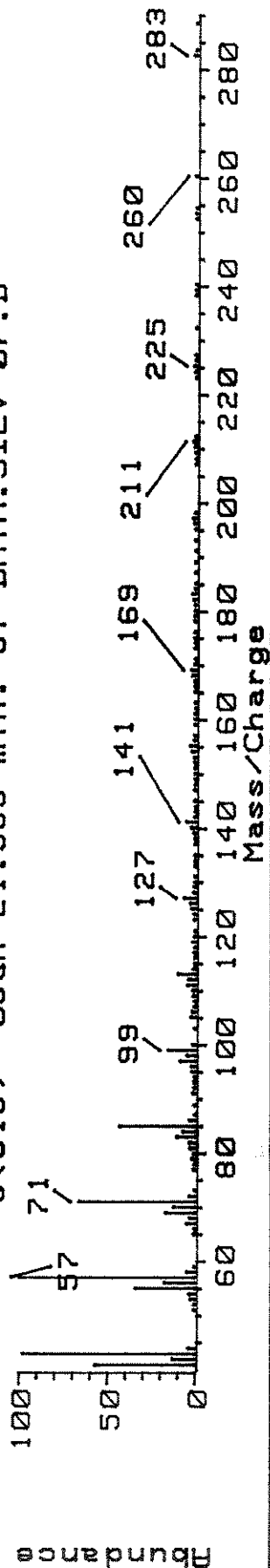
s(819) Scan 19.951 min. of DATA:SILV-07.D



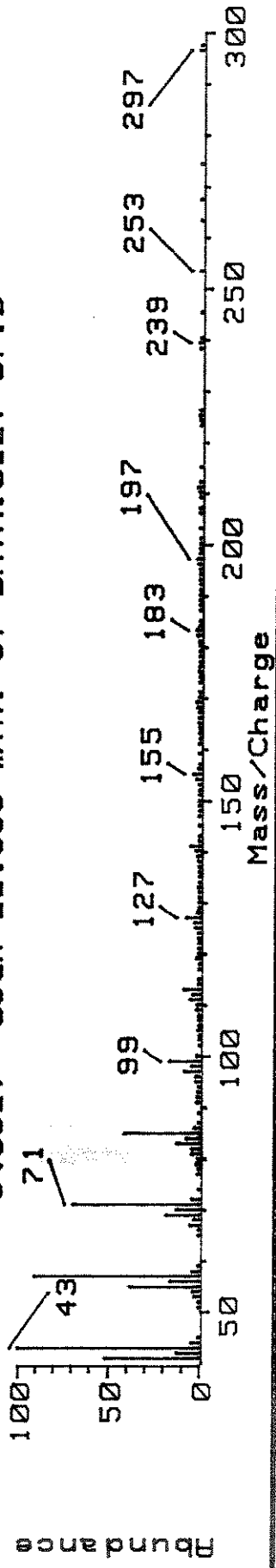
s(866) Scan 20.936 min. of DATA:SILV-07.D



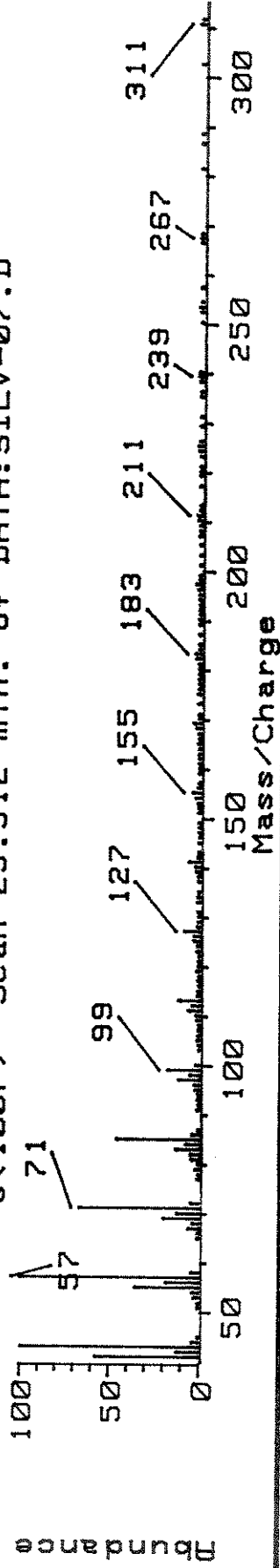
s(915) Scan 21.965 min. of DATA:SILV-07.D



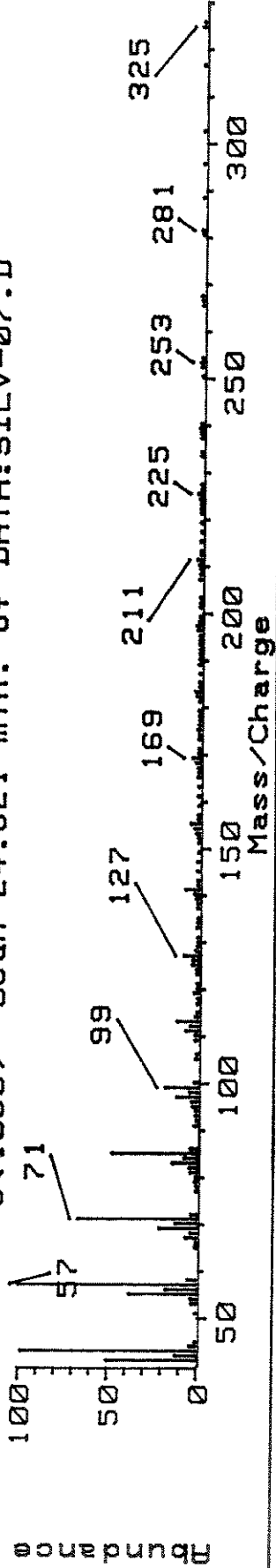
s(962) Scan 22.959 min. of DATA:SILV-07.D



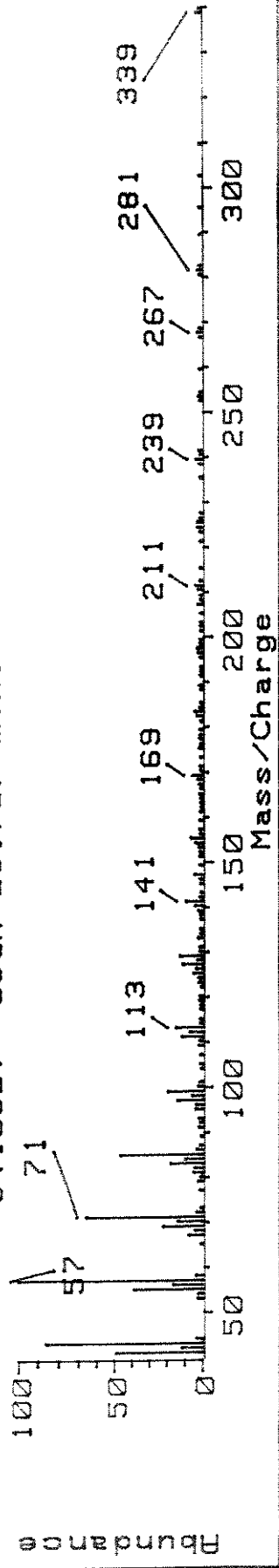
s(1007) Scan 23.912 min. of DATA:SILV-07.D



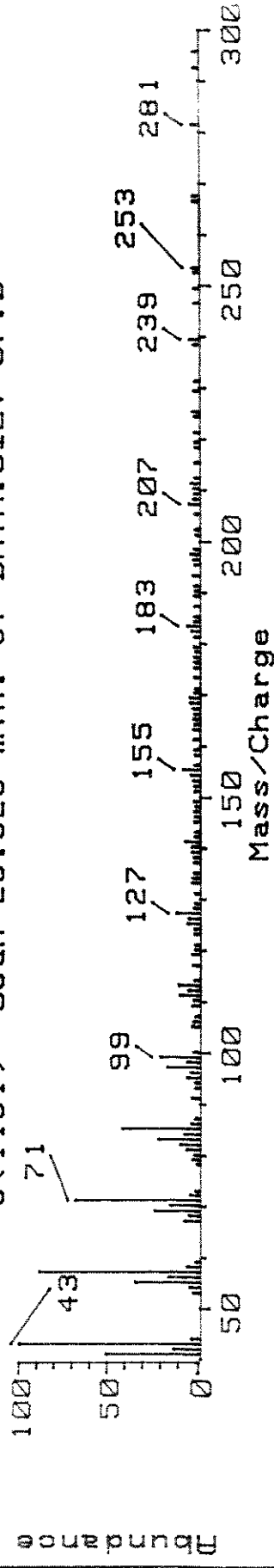
s(1050) Scan 24.821 min. of DATA:SILV-07.D



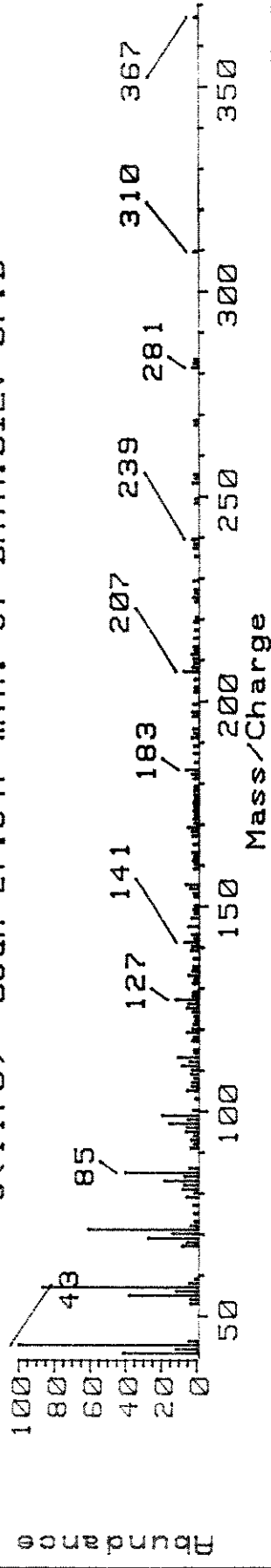
s(1092) Scan 25.707 min. of DATA:SILV-07.D



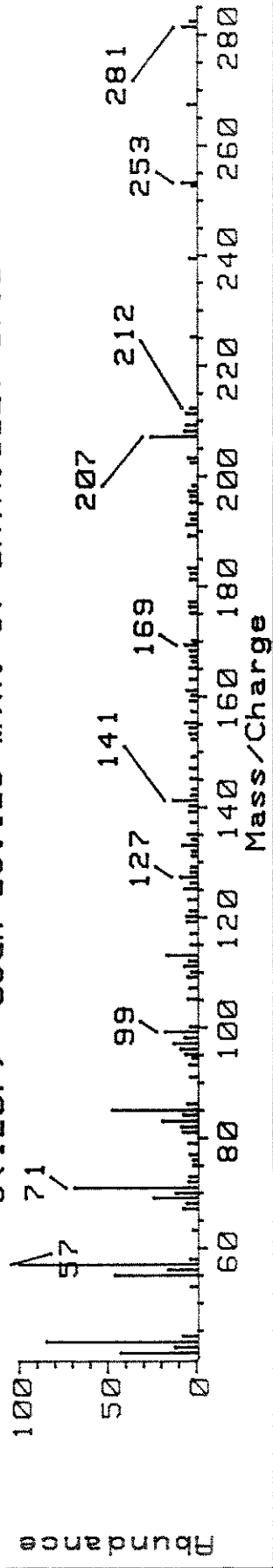
s(1131) Scan 26.528 min. of DATA:SILV-07.D



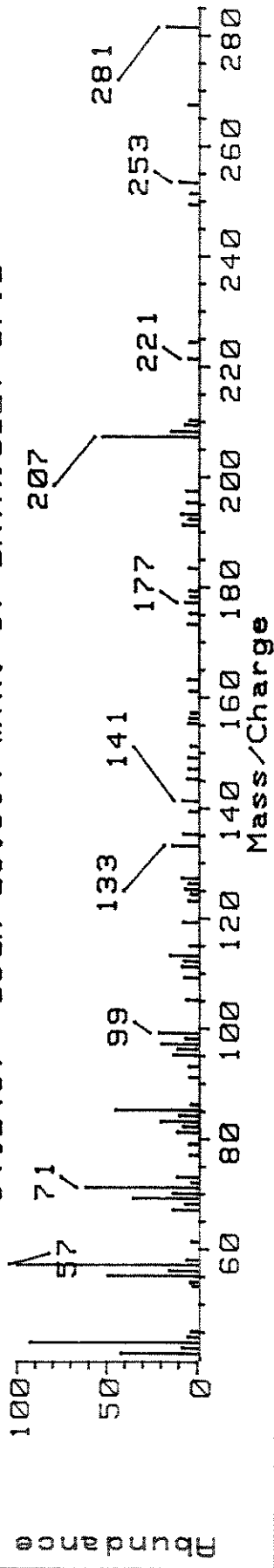
s(1170) Scan 27.347 min. of DATA:SILV-07.D



s(1207) Scan 28.123 min. of DATA:SILV-07.D

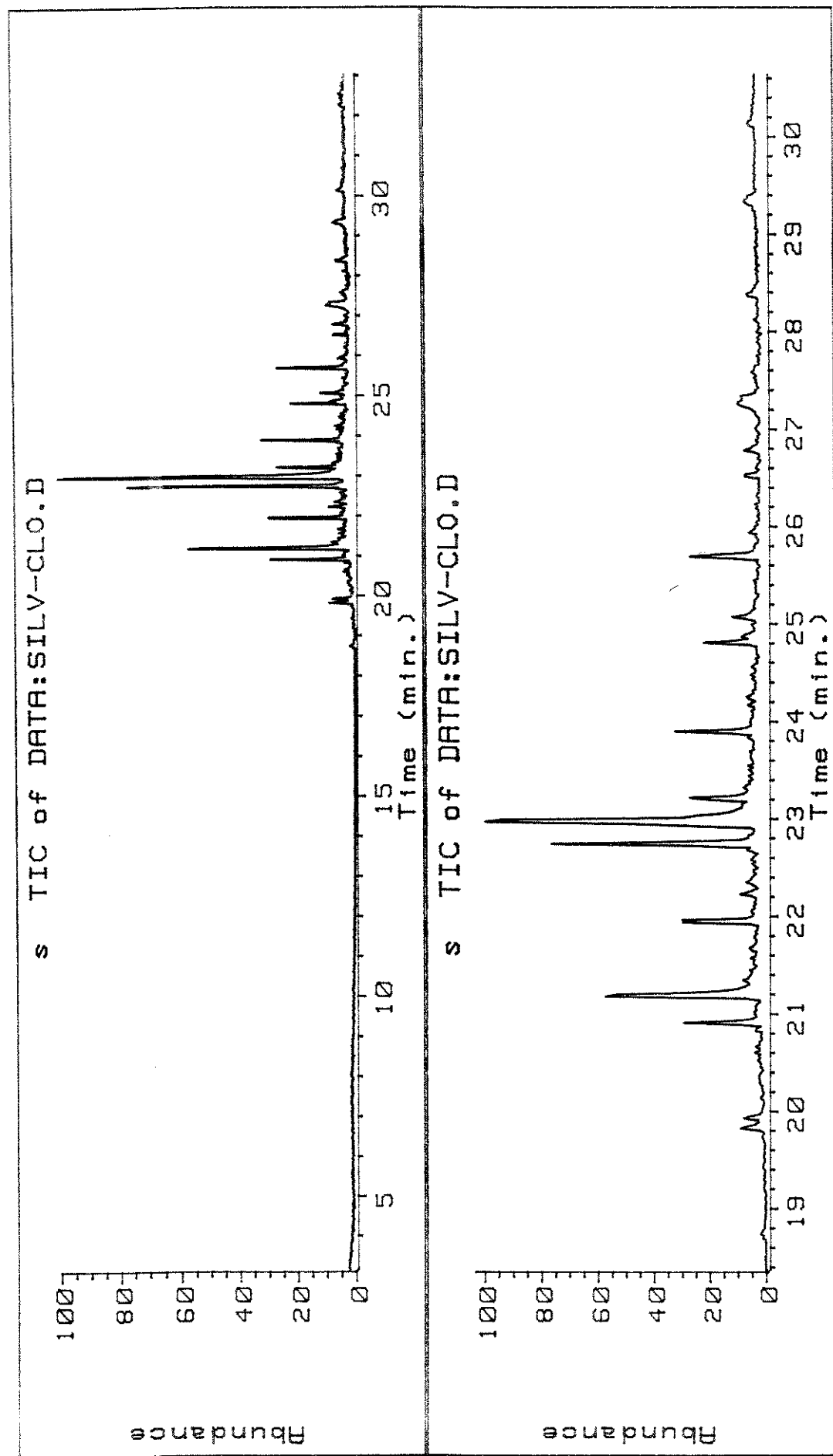


s(1245) Scan 28.914 min. of DATA:SILV-07.D



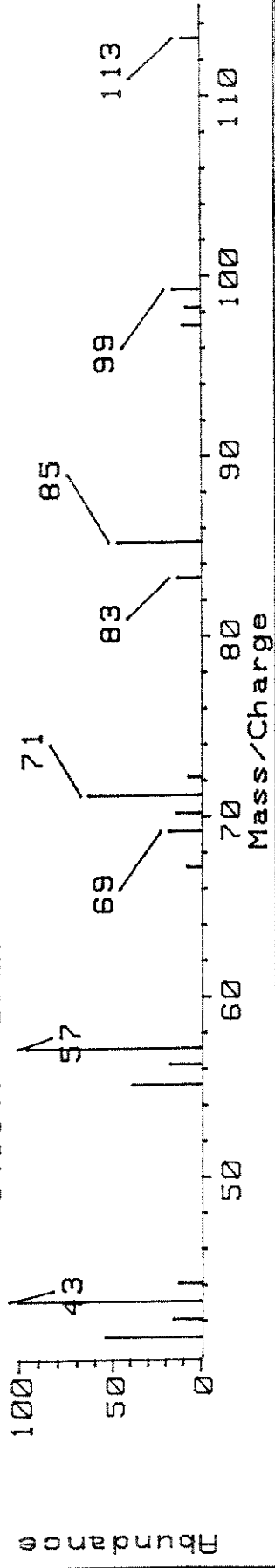
APÊNDICE VII

CROMATOGRAMA COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA OBTIDO DA AMOSTRA DE REJEITO / “ PITCH “ SUBMETIDA A EXTRAÇÃO COM DICLORO METANO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.21 E 3.2.25.

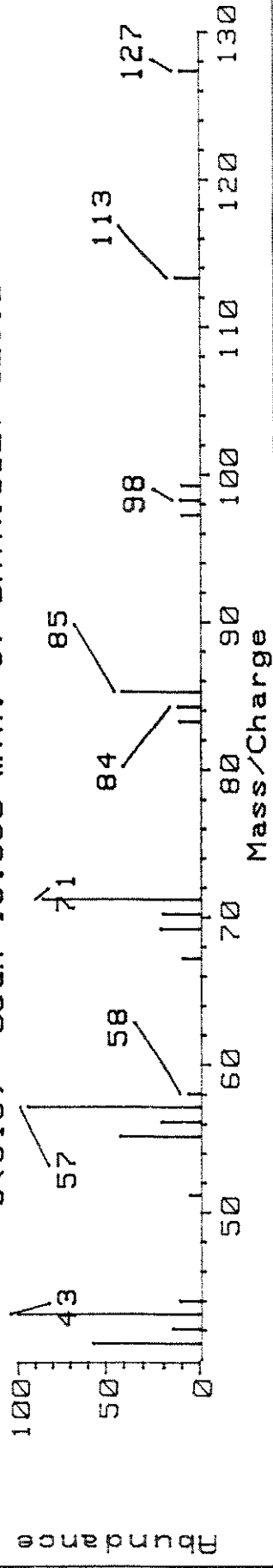


A.VII. FIGURA 25 - Cromatograma com seus respectivos espectros de massa da amostra rejeito / "pitch" in natura submetida a extração com diclorometano. (Condições experimentais Vide 3.2.27. e 3.2.28.)

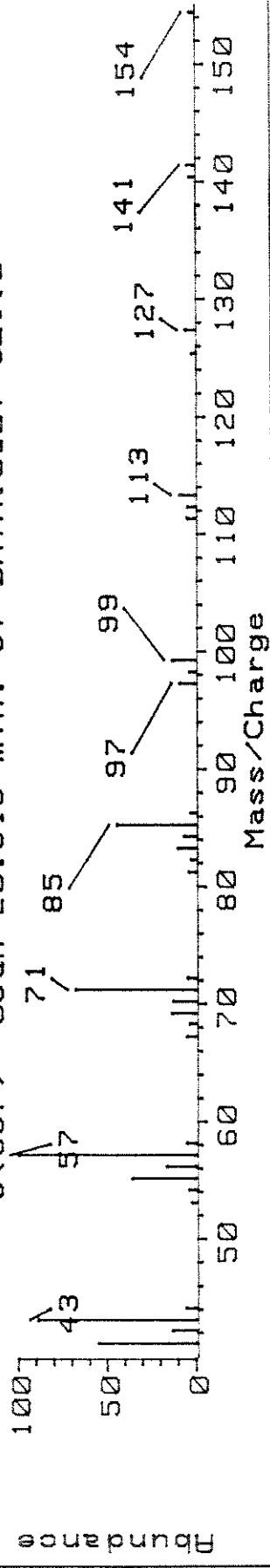
s(814) Scan 19.828 min. of DATA:SILV-CLO.D

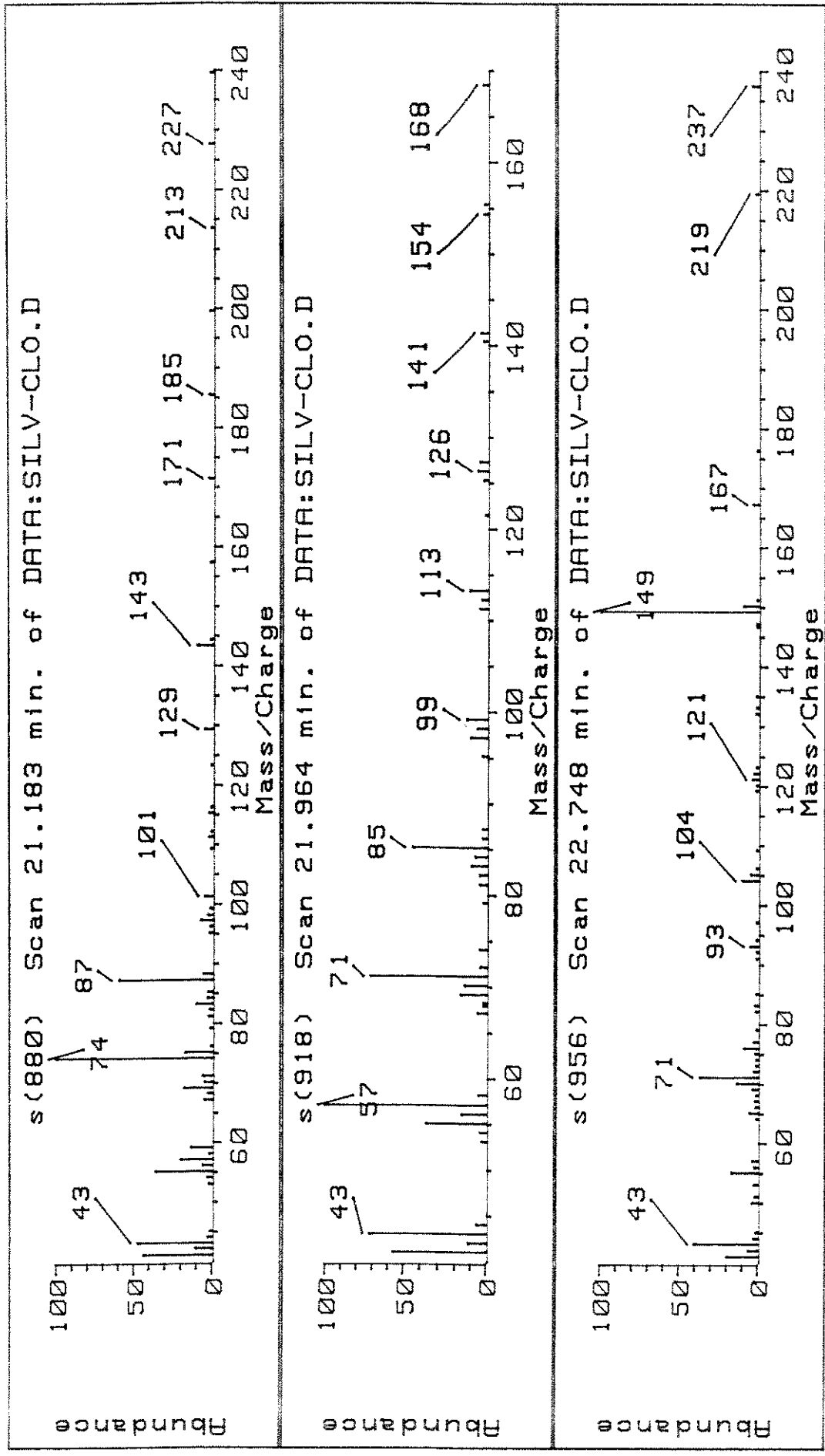


s(819) Scan 19.930 min. of DATA:SILV-CLO.D

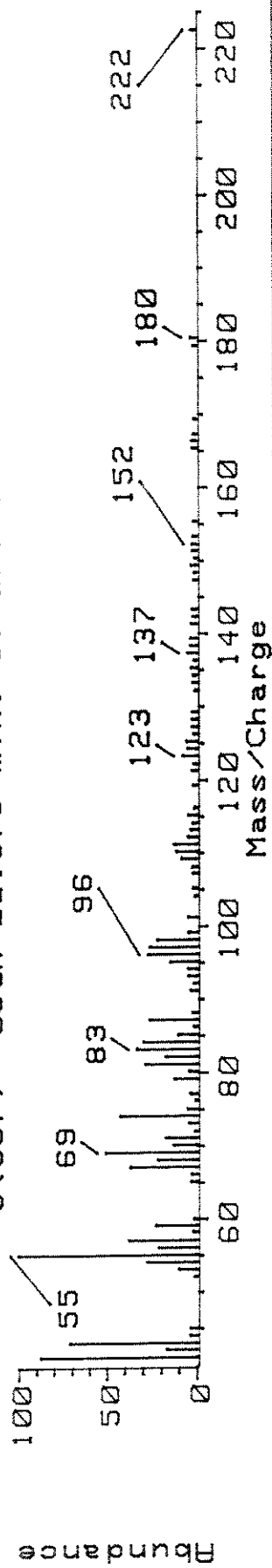


s(867) Scan 20.916 min. of DATA:SILV-CLO.D

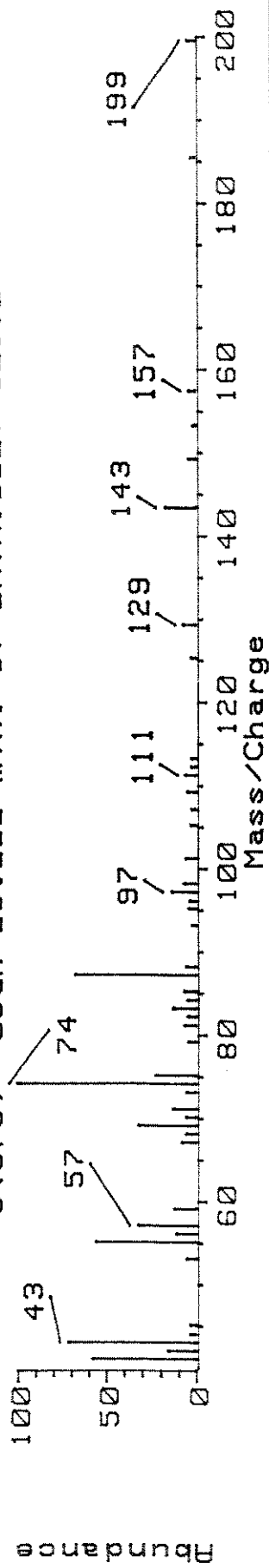




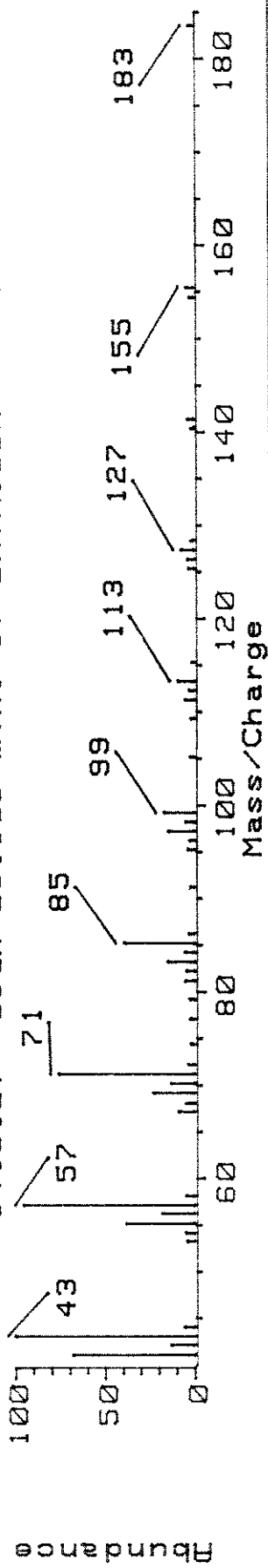
s(967) Scan 22.975 min. of DATA:SILV-CLO.D



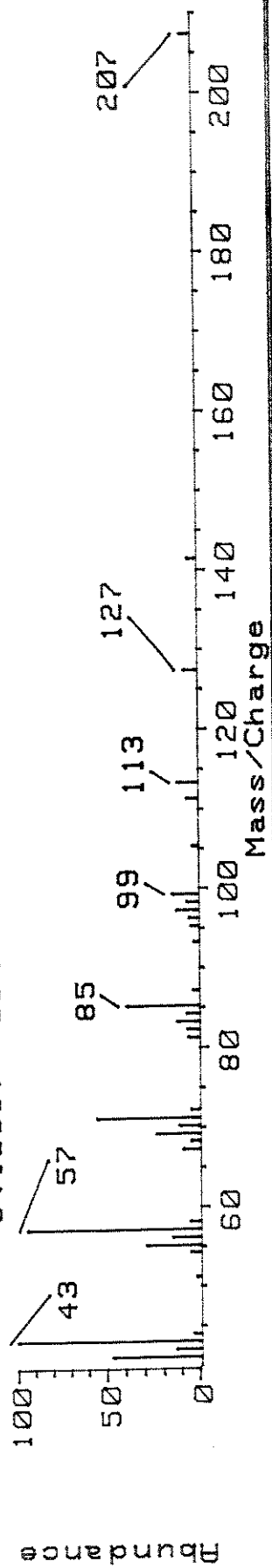
s(979) Scan 23.222 min. of DATA:SILV-CLO.D



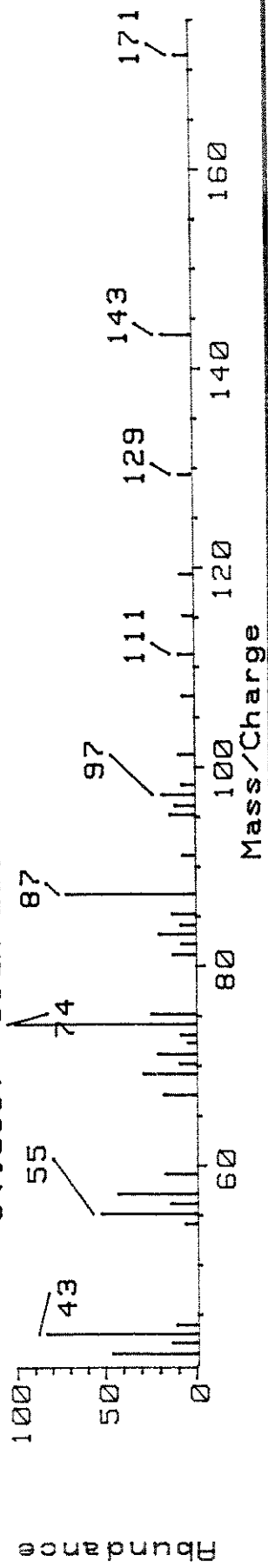
s(1012) Scan 23.903 min. of DATA:SILV-CLO.D



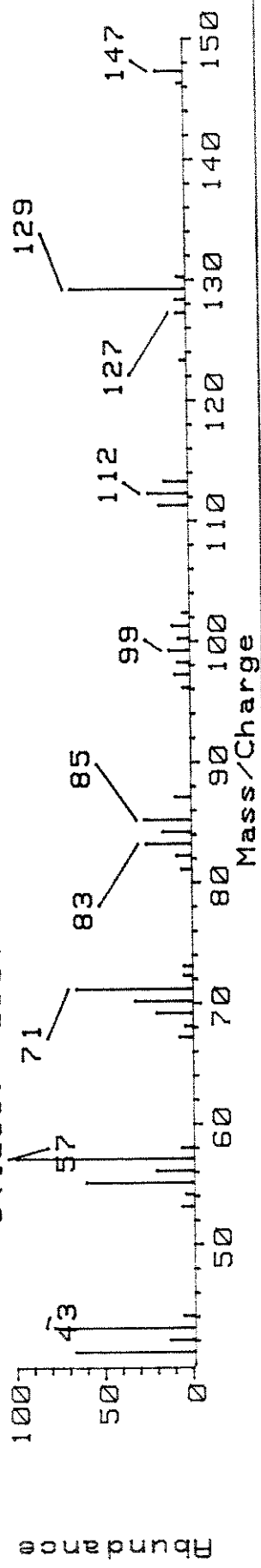
s(1056) Scan 24.808 min. of DATA:SILV-CLO.D



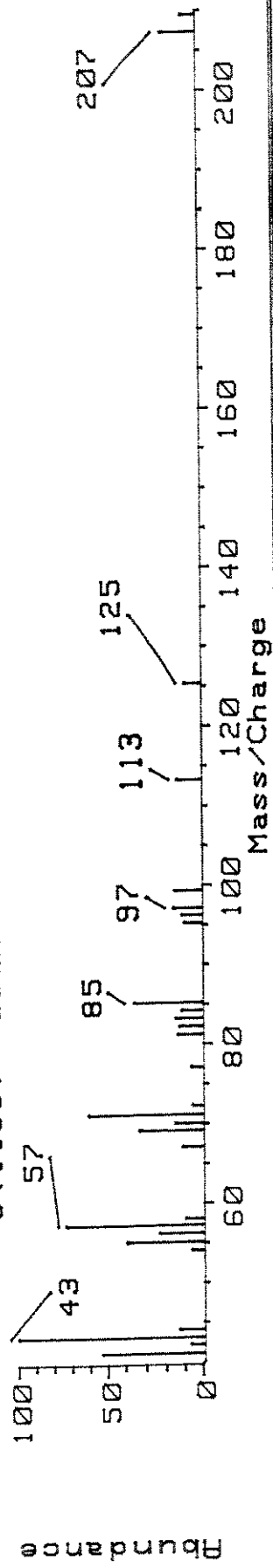
s(1069) Scan 25.076 min. of DATA:SILV-CLO.D



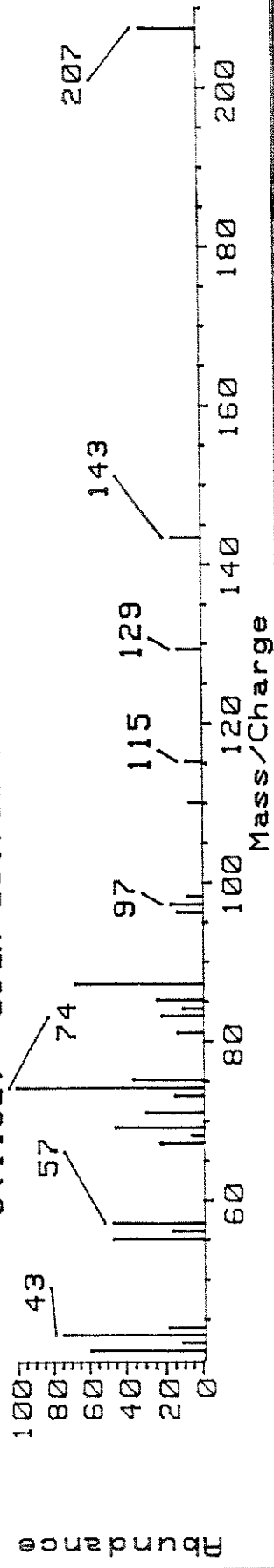
s(1099) Scan 25.694 min. of DATA:SILV-CLO.D



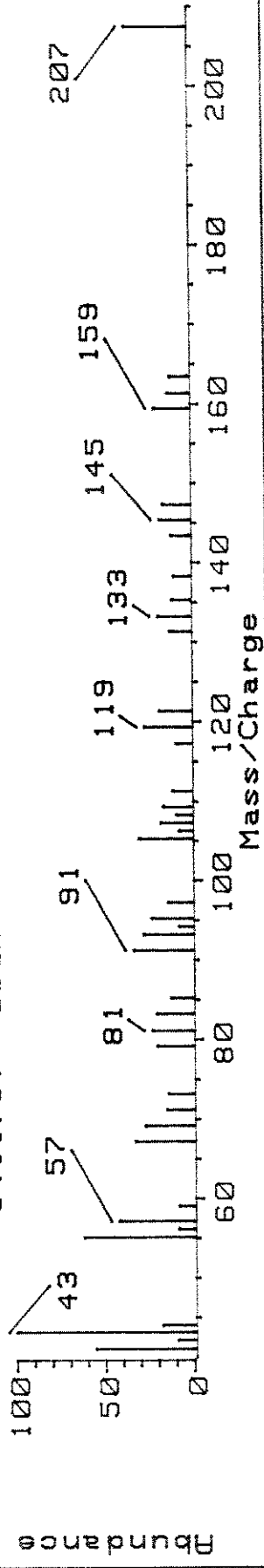
s(1139) Scan 26.517 min. of DATA:SILV-CLO.D



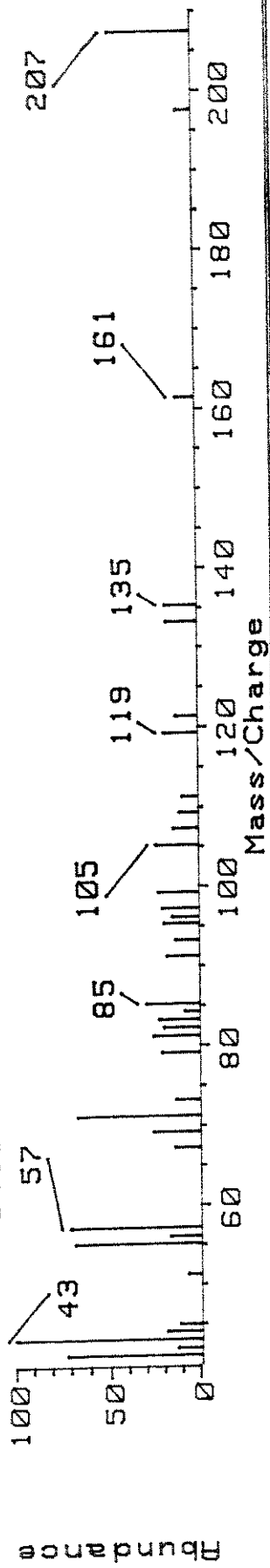
s(1152) Scan 26.786 min. of DATA:SILV-CLO.D



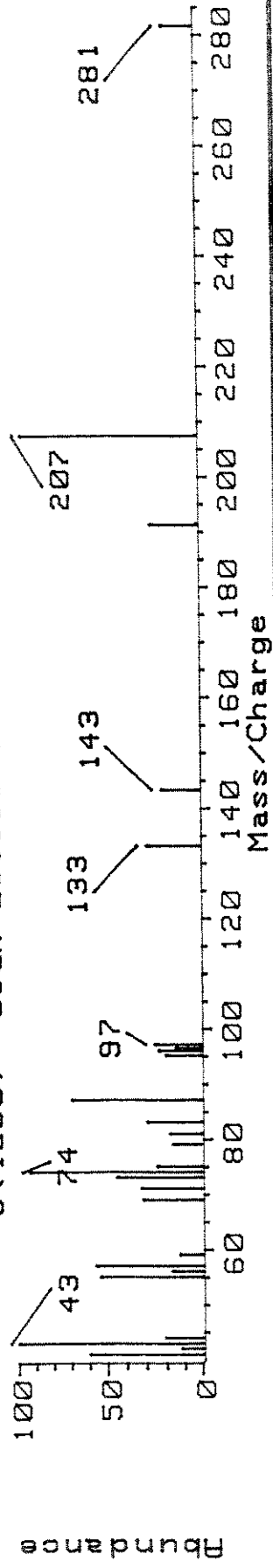
s(1175) Scan 27.258 min. of DATA:SILV-CLO.D



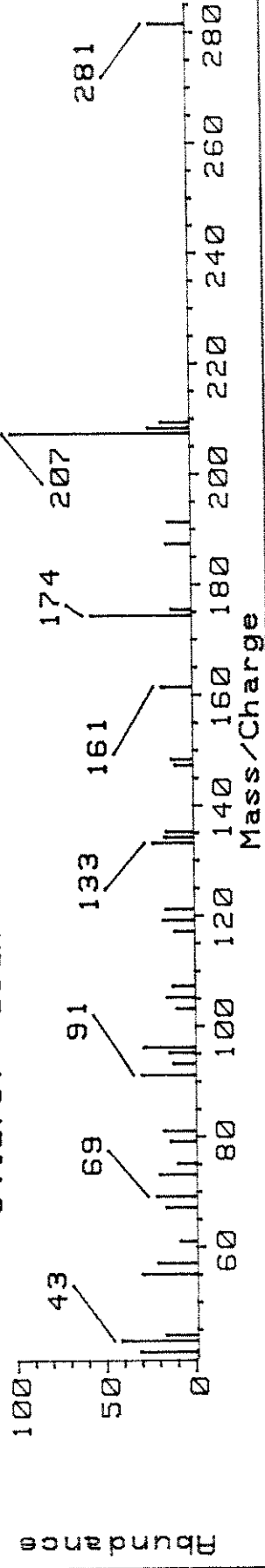
s(1179) Scan 27.340 min. of DATA:SILV-CLO.D



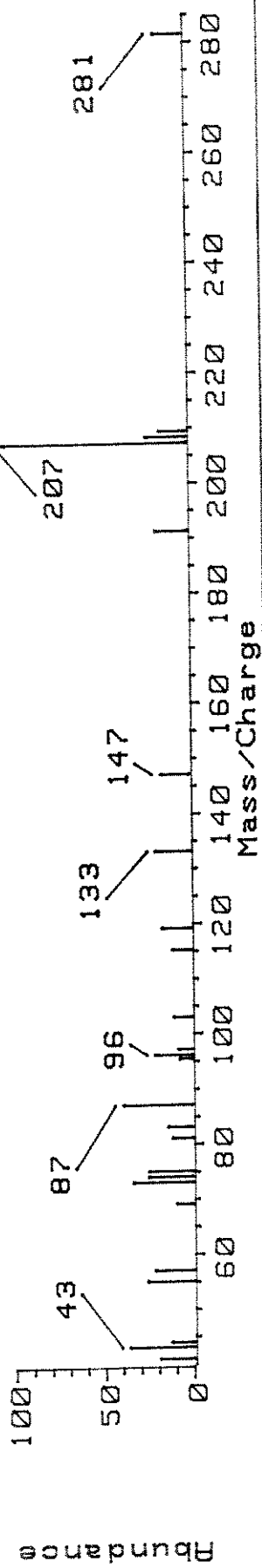
s(1230) Scan 28.389 min. of DATA:SILV-CLO.D



s(1276) Scan 29.335 min. of DATA:SILV-CLO.D

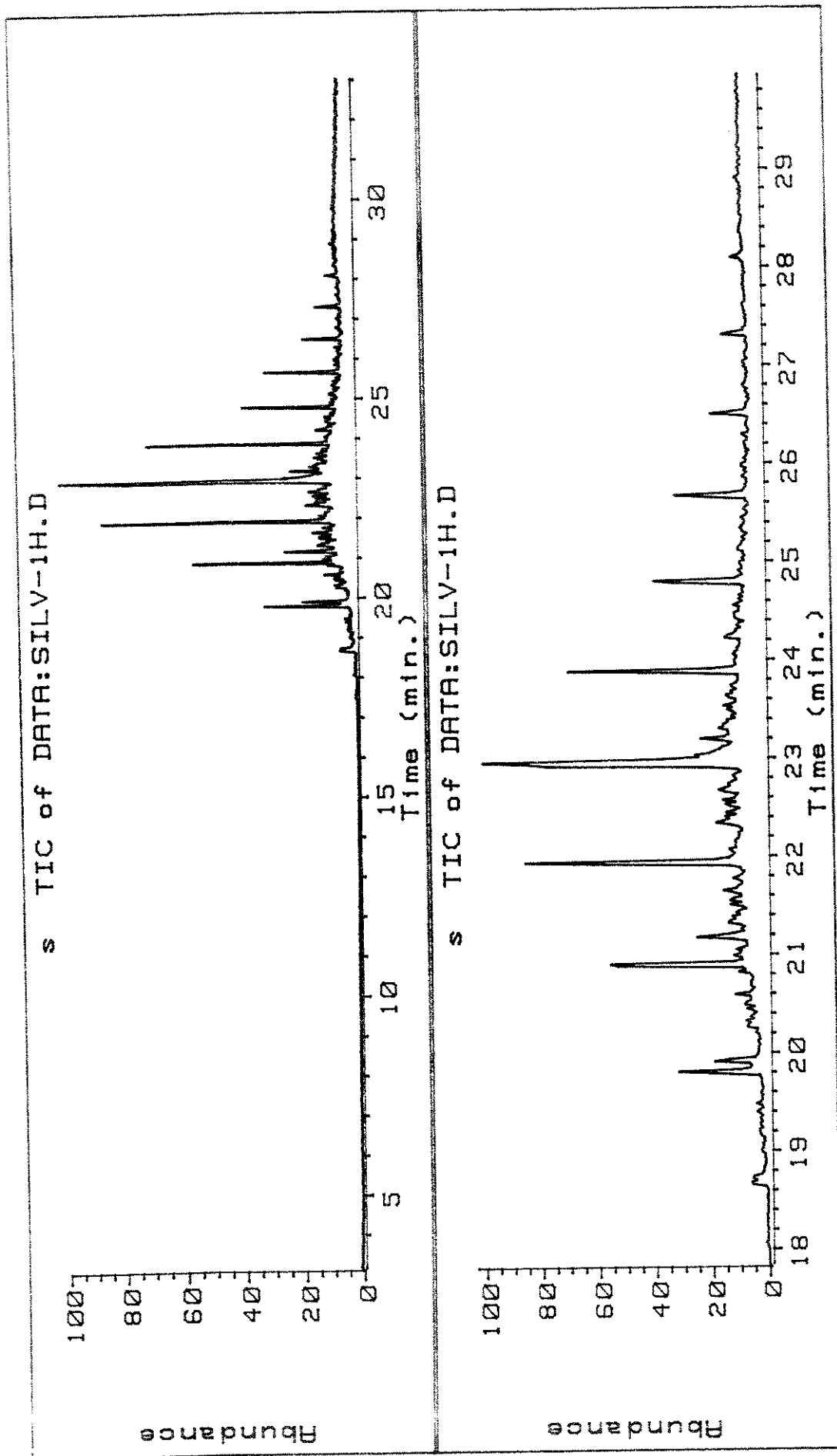


s(1315) Scan 30.139 min. of DATA:SILV-CLO.D



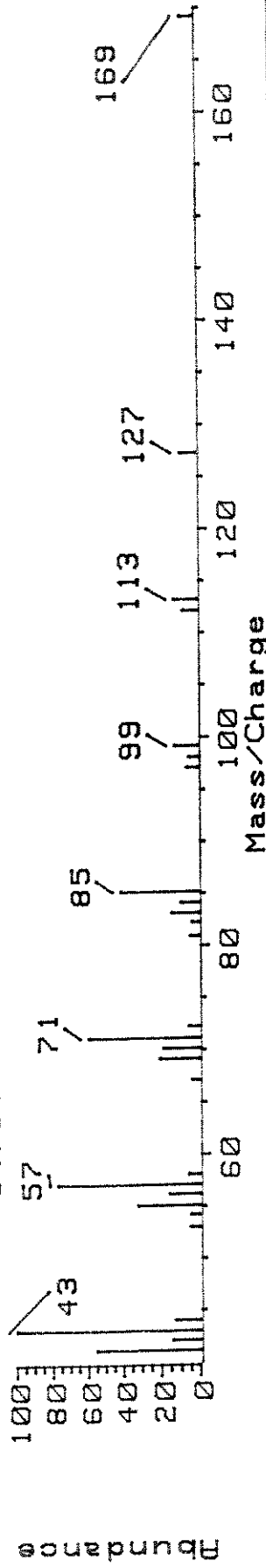
APÊNDICE VIII

CROMATROGRAMA COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA OBTIDO DA AMOSTRA DE REJEITO / " PITCH " SUBMETIDA A REAÇÃO ENZIMÁTICA (1 h , 45 °C) COM A LIPASE DE *Candida rugosa*. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.27 E 3.2.28.

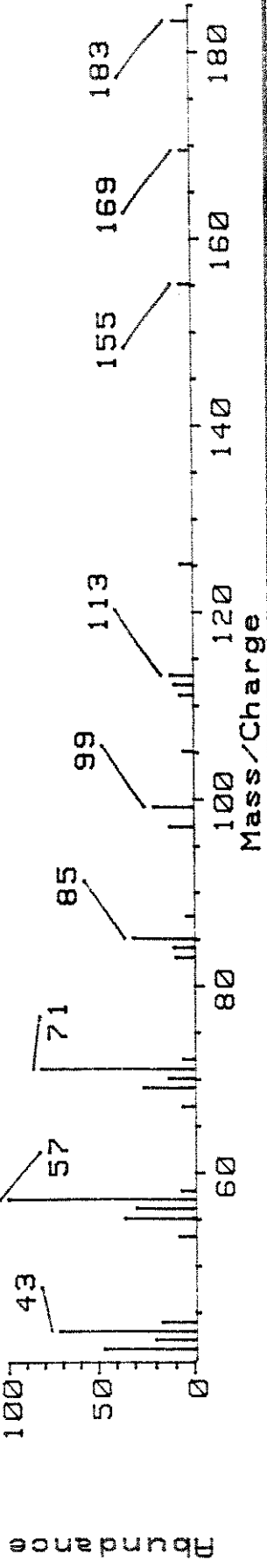


A.VIII. FIGURA 26 - Cromatograma com seus respectivos espectros de massa da amostra rejeito / "pitch" in natura submetida a reação enzimática com a lipase de *Candida rugosa* (1h, 45 °C) e extraída posteriormente com diclorometano. (Condições experimentais Vide 3.2.27. e 3.2.28.).

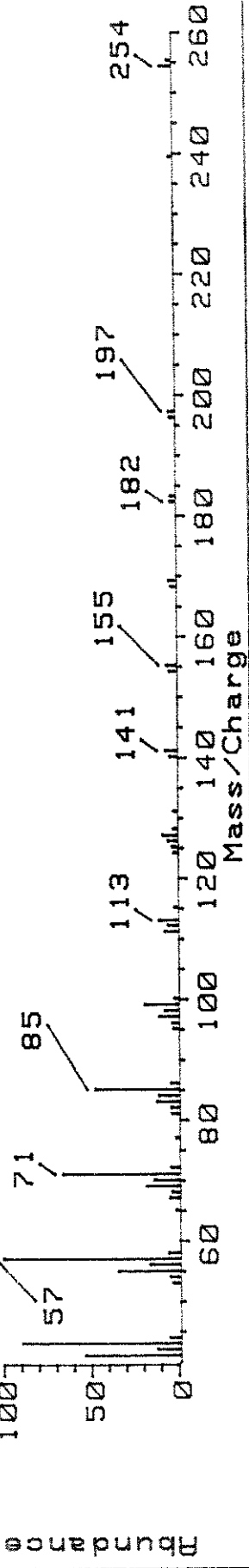
s(758) Scan 18.679 min. of DATA:SILV-1H.D



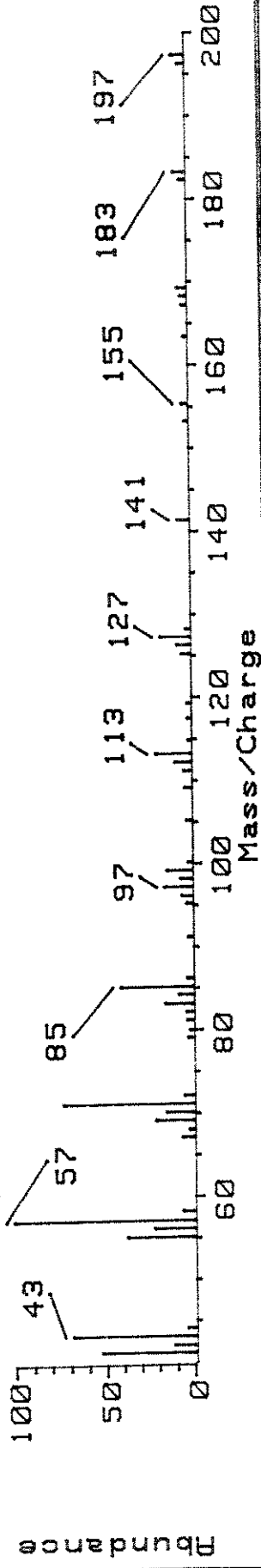
s(760) Scan 18.720 min. of DATA:SILV-1H.D



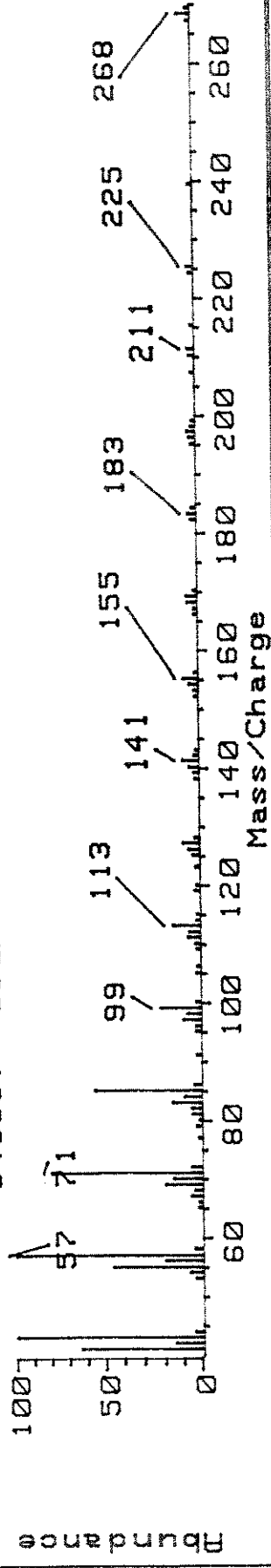
s(813) Scan 19.811 min. of DATA:SILV-1H.D



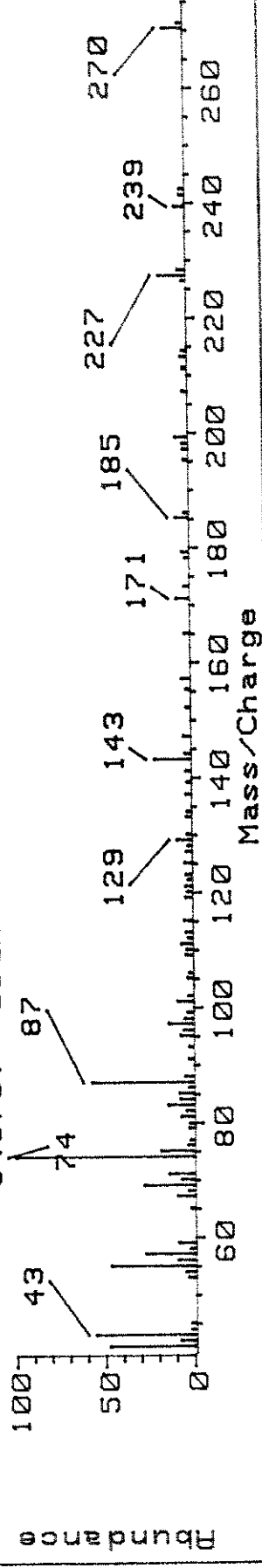
s(818) Scan 19.914 min. of DATA:SILV-1H.D



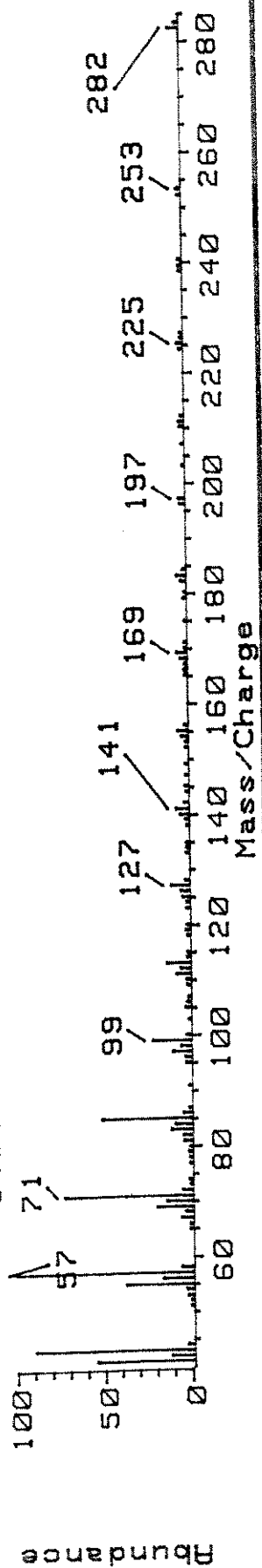
s(866) Scan 20.907 min. of DATA:SILV-1H.D



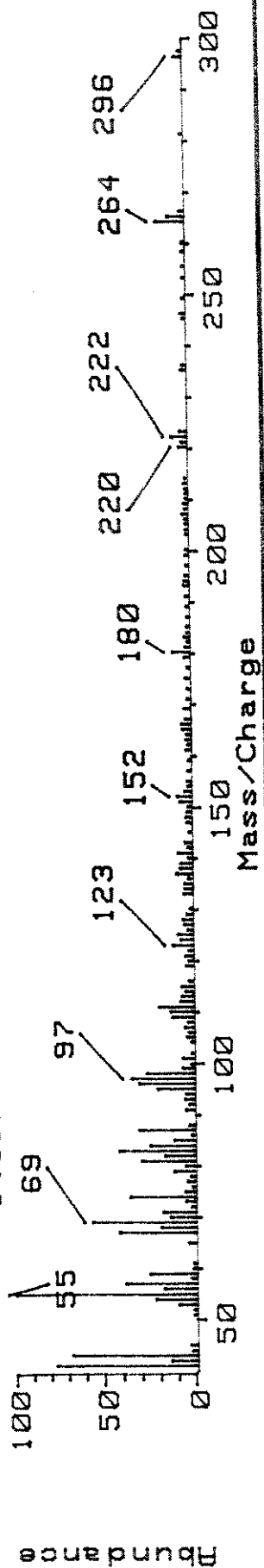
s(879) Scan 21.177 min. of DATA:SILV-1H.D



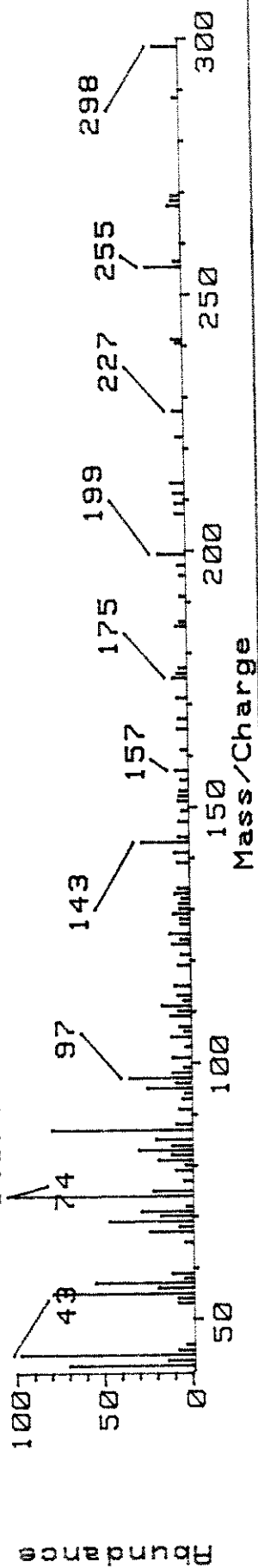
s(916) Scan 21.946 min. of DATA:SILV-1H.D



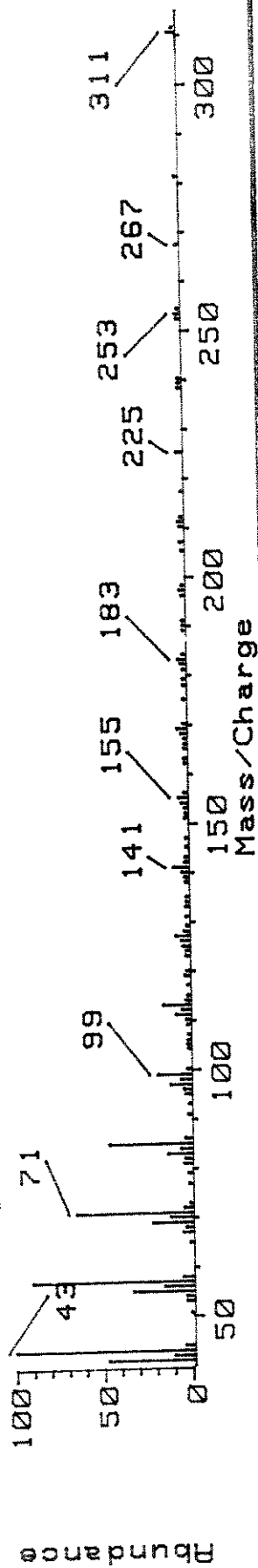
s(965) Scan 22.969 min. of DATA:SILV-1H.D



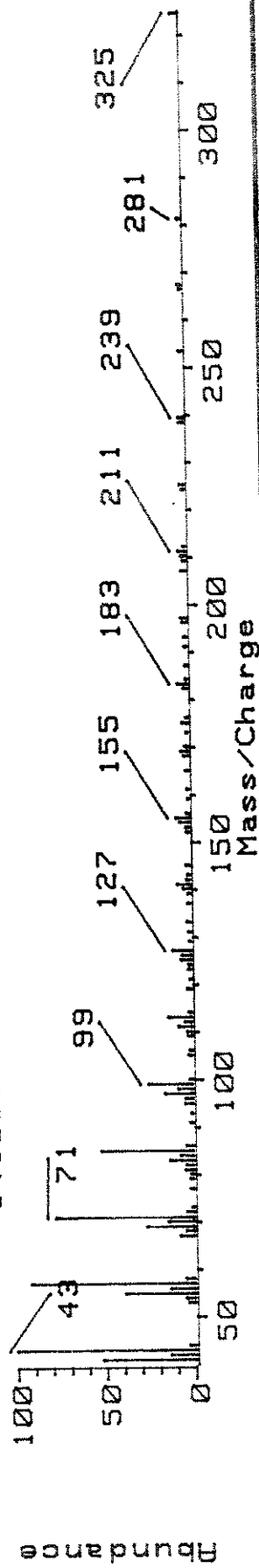
s(976) Scan 23.200 min. of DATA:SILV-1H.D



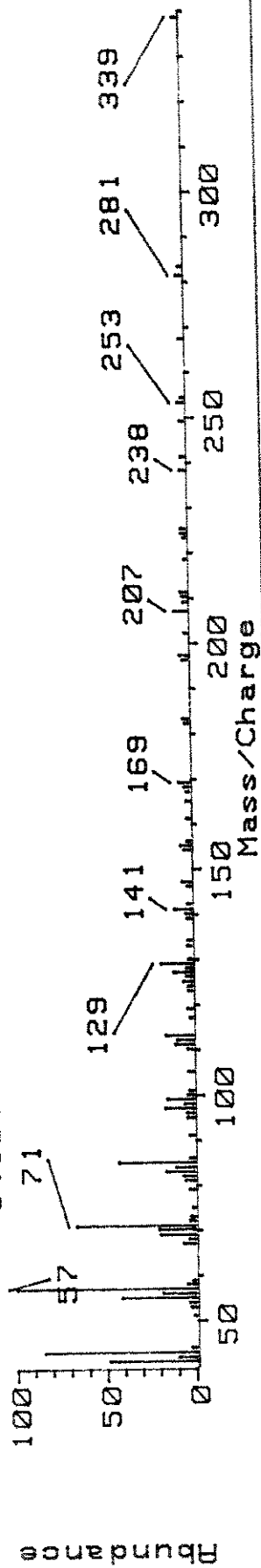
s(1009) Scan 23.888 min. of DATA:SILV-1H.D



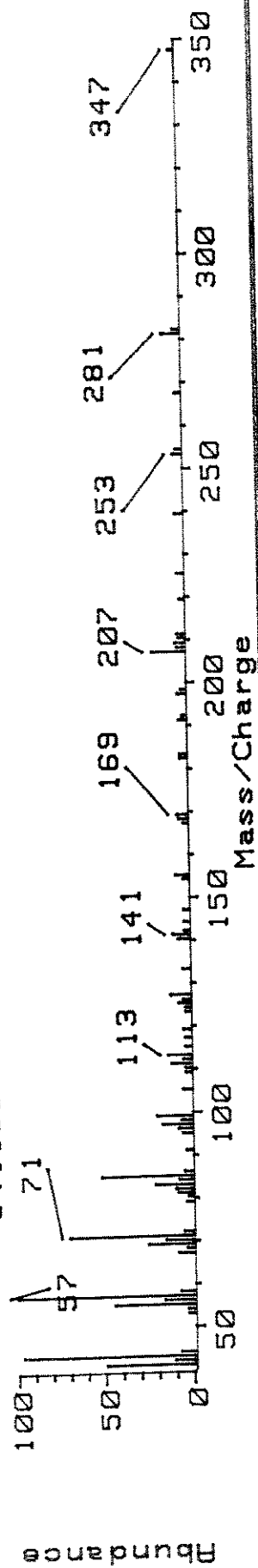
s(1053) Scan 24.805 min. of DATA:SILV-1H.D



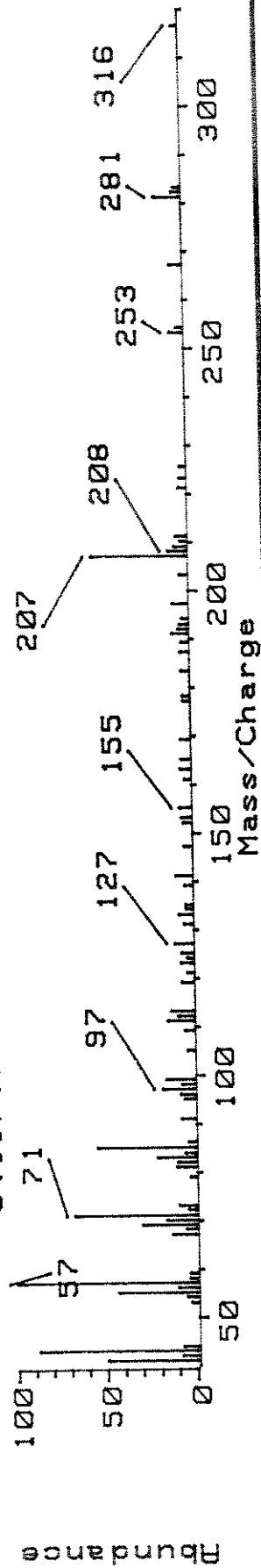
s(1095) Scan 25.676 min. of DATA:SILV-1H.D



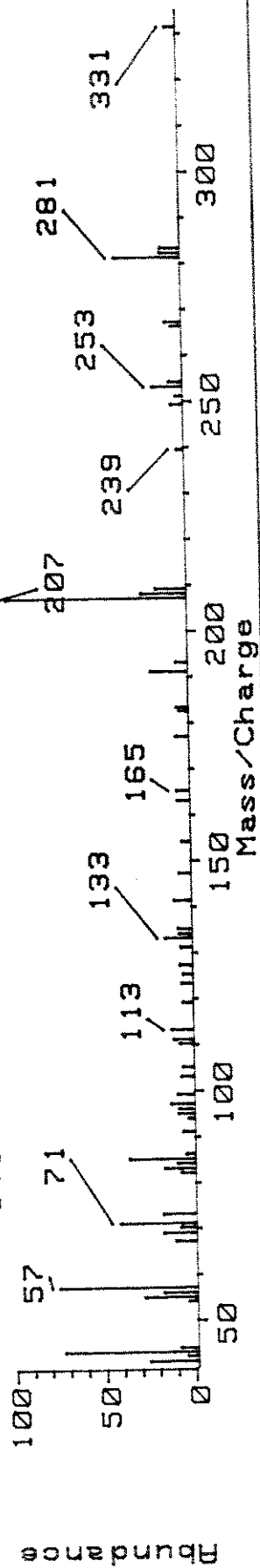
s(1135) Scan 26.505 min. of DATA:SILV-1H.D



s(1174) Scan 27.311 min. of DATA:SILV-1H.D

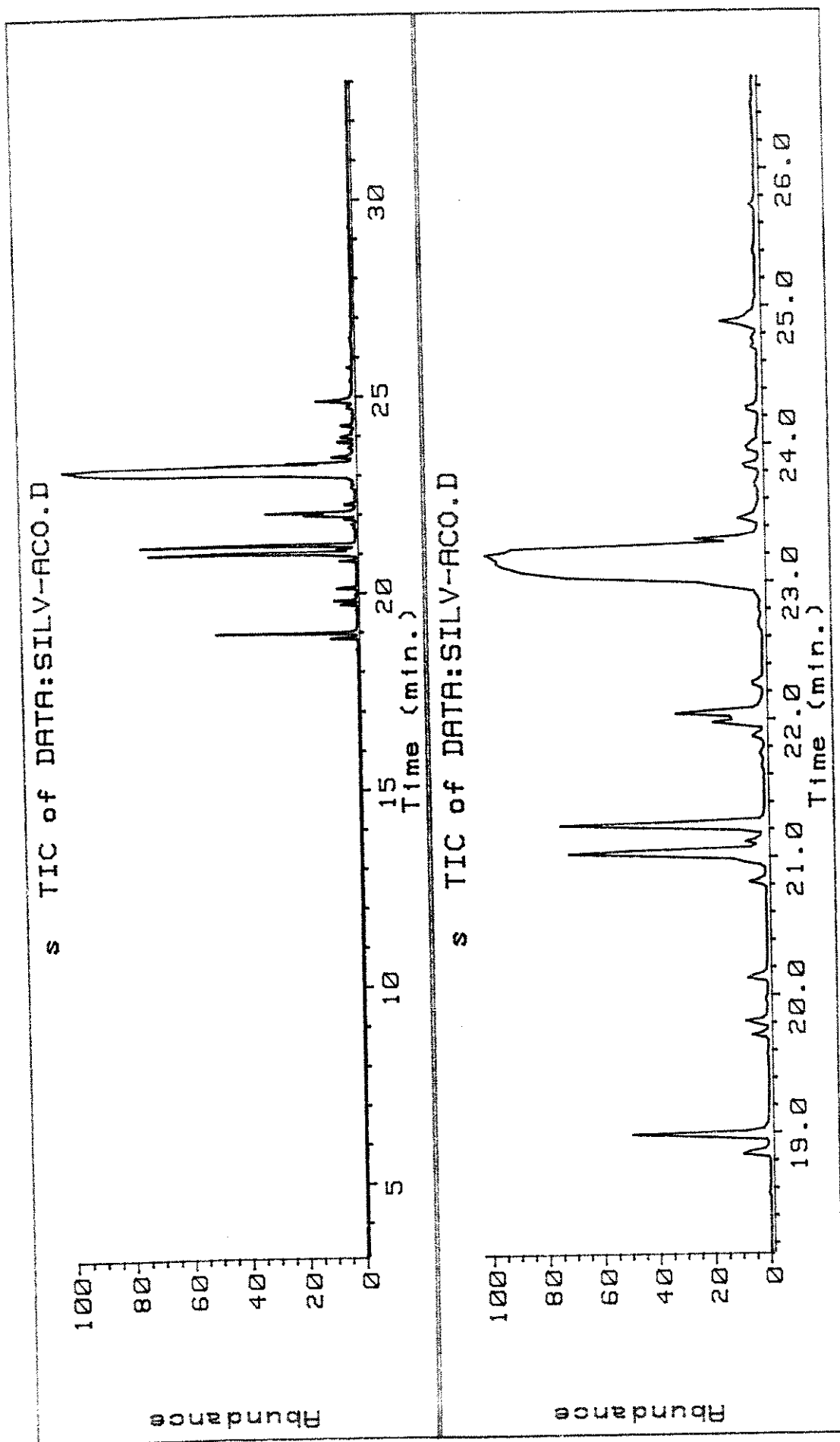


s(1212) Scan 28.099 min. of DATA:SILV-1H.D



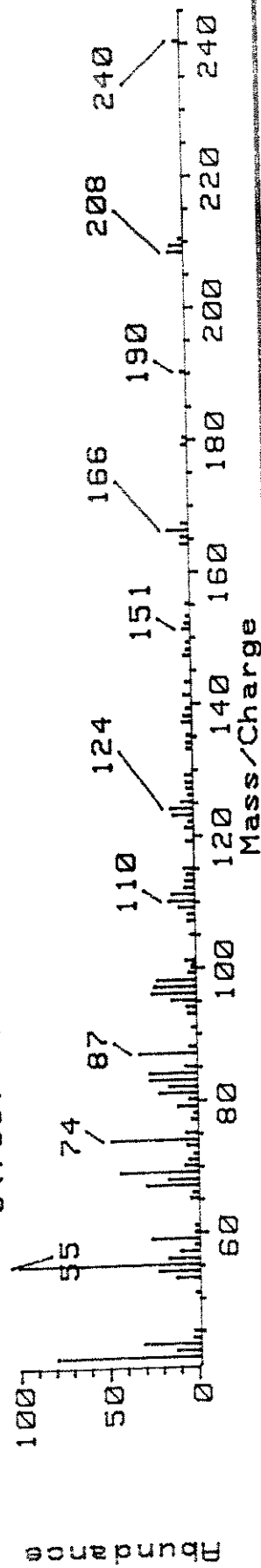
APÊNDICE IX

CROMATOGRAMA COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA OBTIDO DA AMOSTRA PADRÃO DE ÁCIDO OLEICO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS VIDE 3.2.27 E 3.2.28.

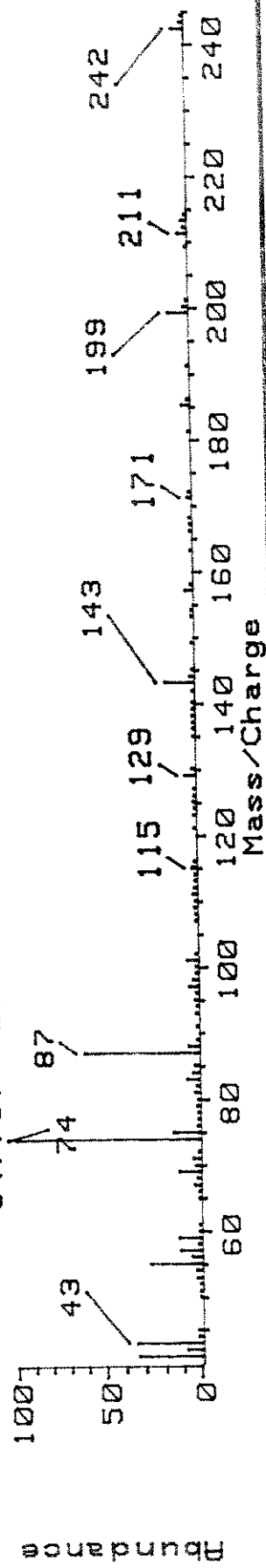


A.IX. FIGURA 27 - Cromatograma com seus respectivos espectros de massa da amostra do padrão ácido oleico.
(Condições experimentais Vide 3.2.27. e 3.2.28.)

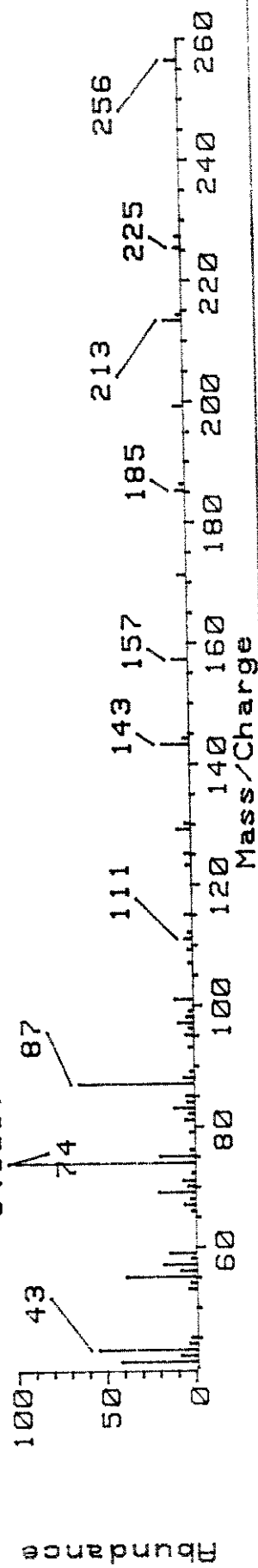
s(766) Scan 18.845 min. of DATA:SILV-ACO.D



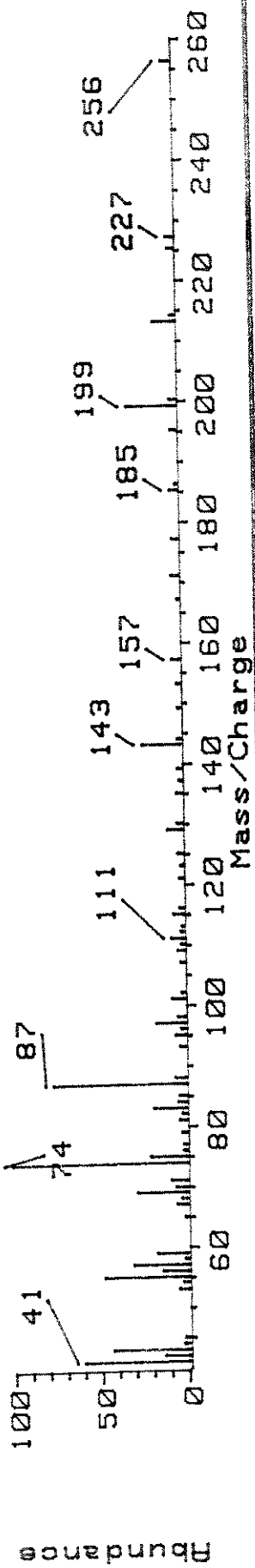
s(773) Scan 18.990 min. of DATA:SILV-ACO.D



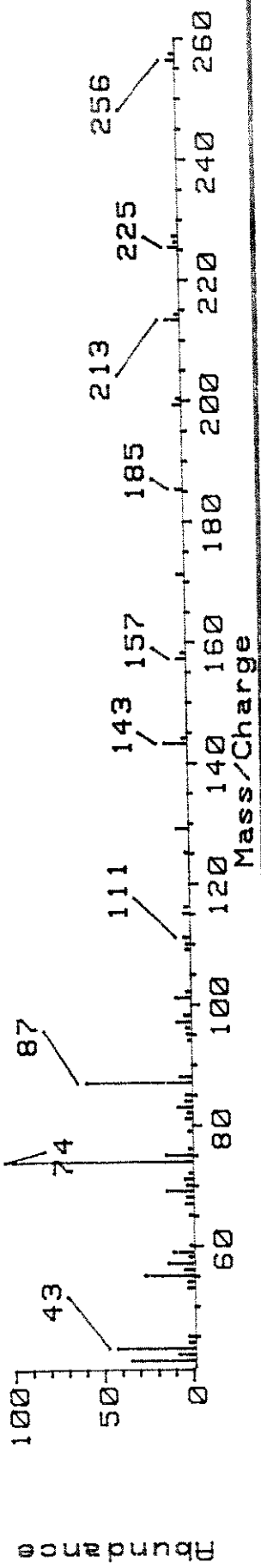
s(808) Scan 19.710 min. of DATA:SILV-ACO.D



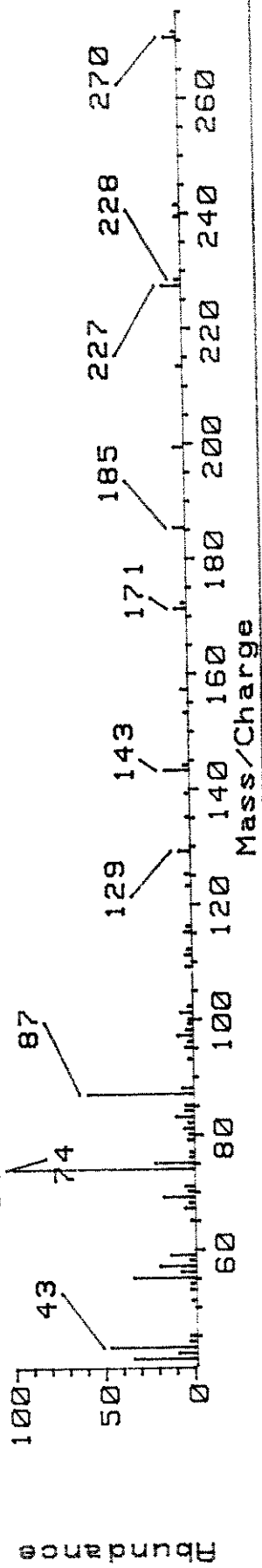
s(813) Scan 19.813 min. of DATA:SILV-ACO.D



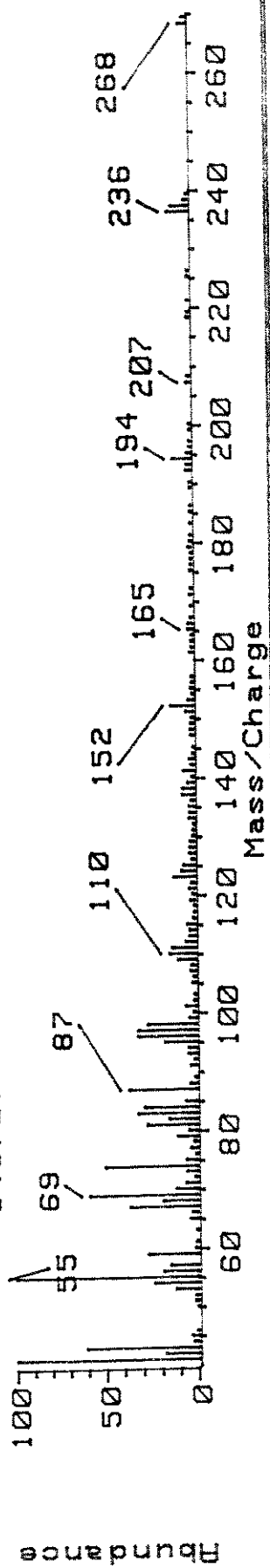
s(828) Scan 20.121 min. of DATA:SILV-ACO.D



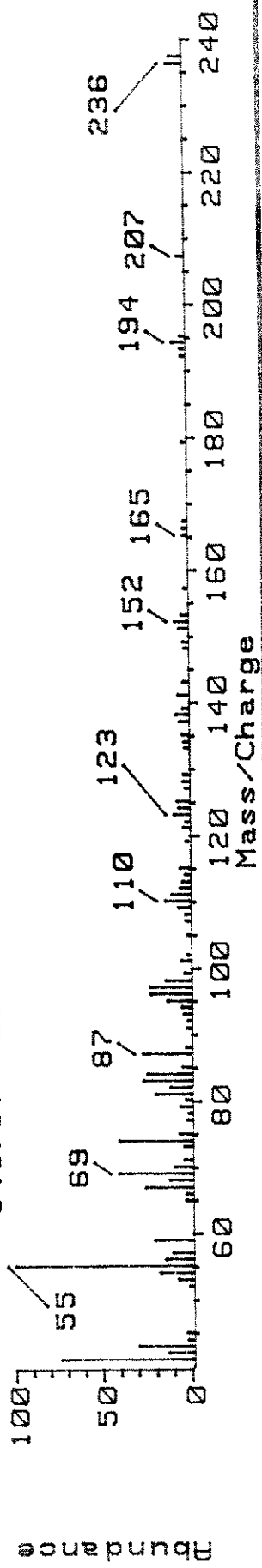
s(862) Scan 20.819 min. of DATA:SILV-ACO.D



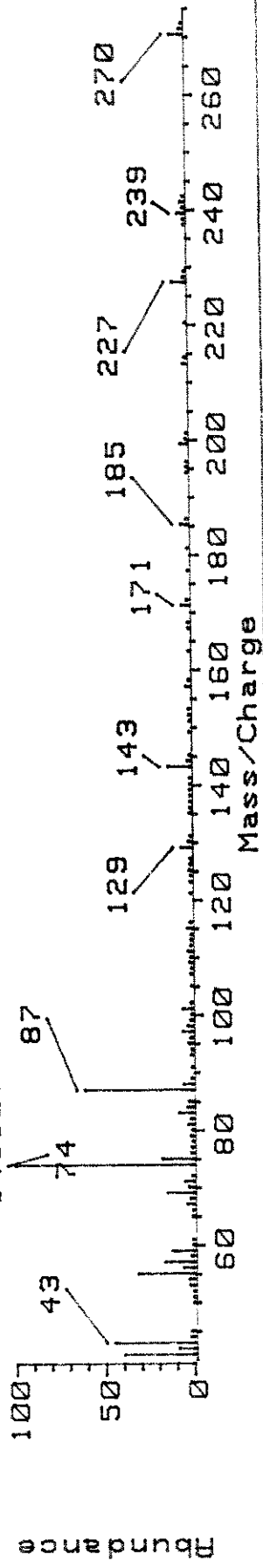
s(872) Scan 21.028 min. of DATA:SILV-ACO.D



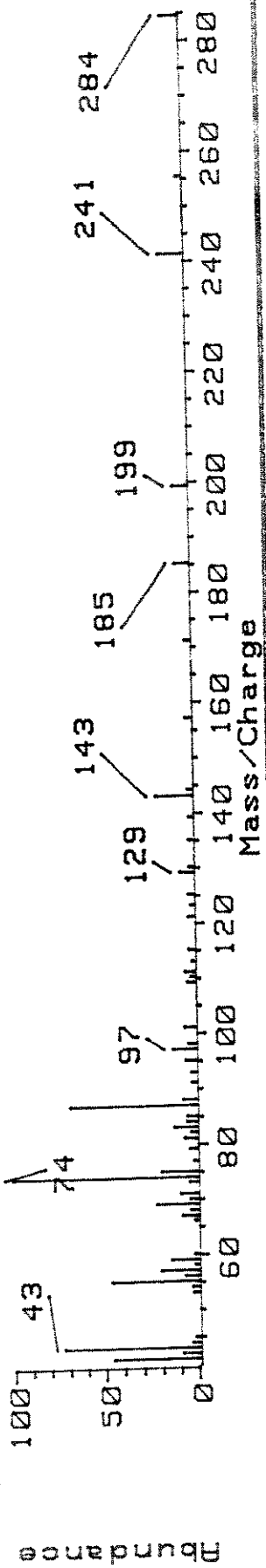
s(876) Scan 21.111 min. of DATA:SILV-ACO.D



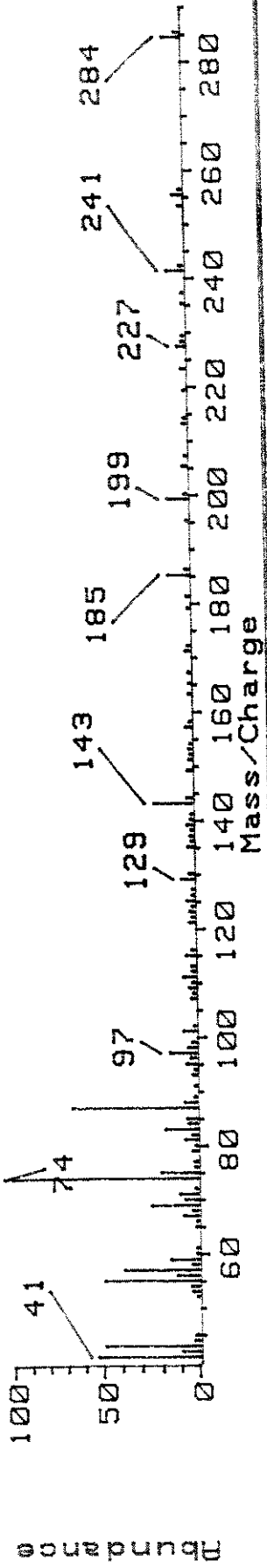
s(882) Scan 21.236 min. of DATA:SILV-ACO.D



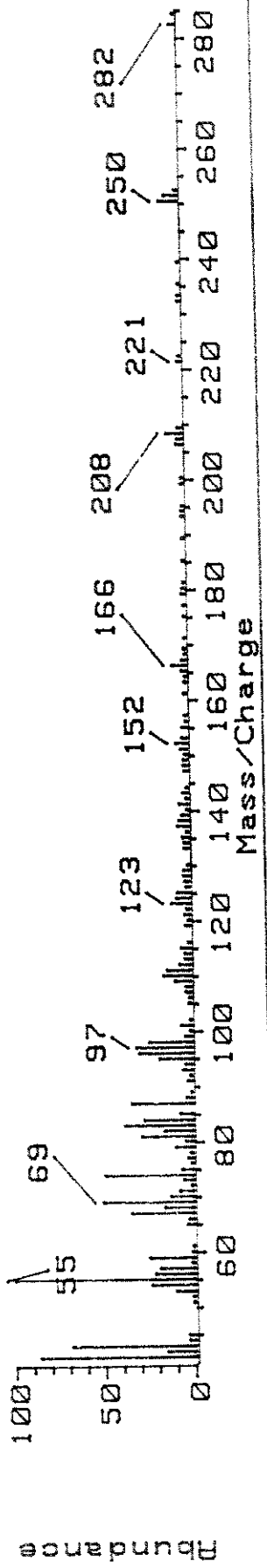
s(913) Scan 21.875 min. of DATA:SILV-ACO.D



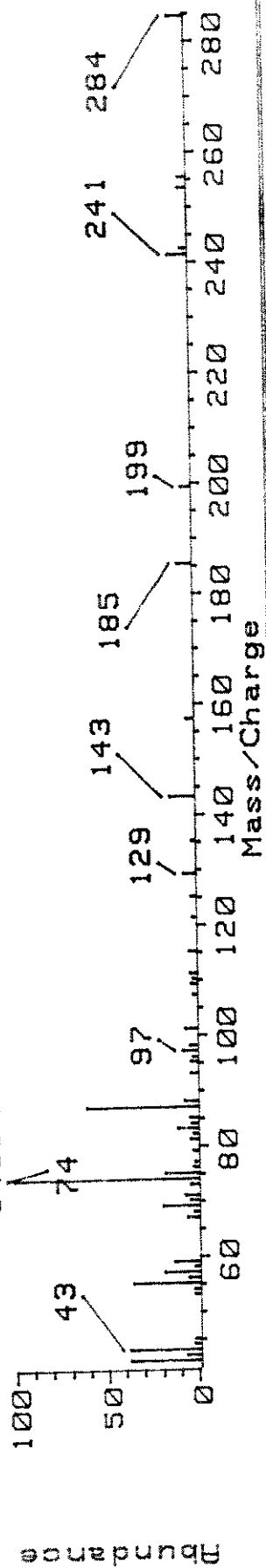
s(918) Scan 21.978 min. of DATA:SILV-ACO.D



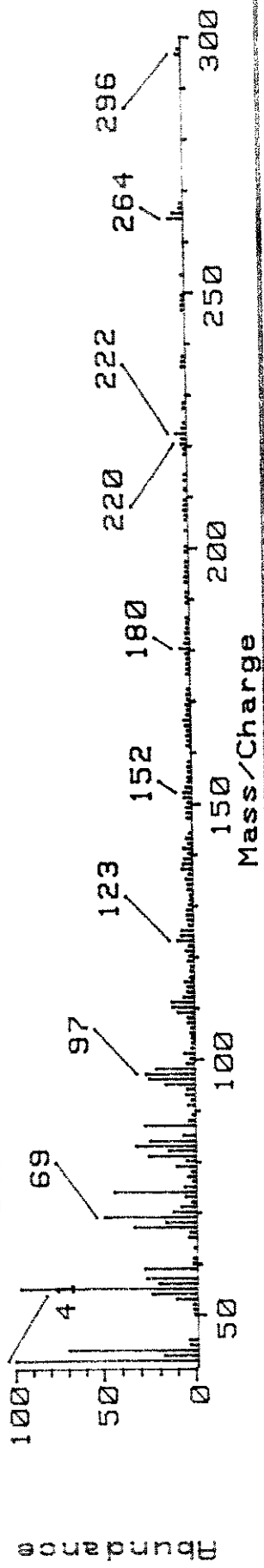
s(921) Scan 22.041 min. of DATA:SILV-ACO.D



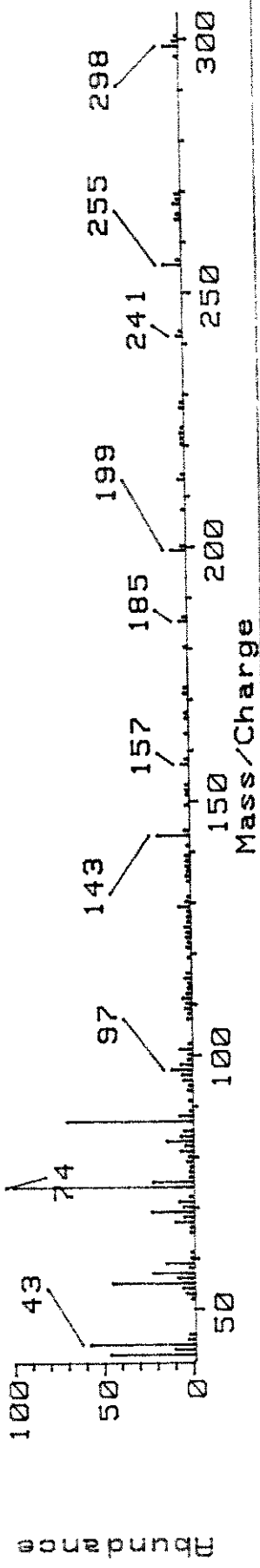
s(932) Scan 22.269 min. of DATA:SILV-ACO.D



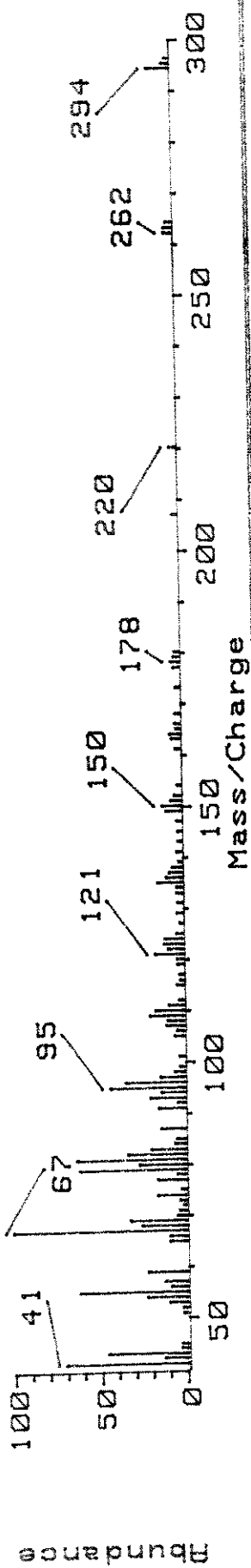
s(977) Scan 23.205 min. of DATA:SILV-ACO.D



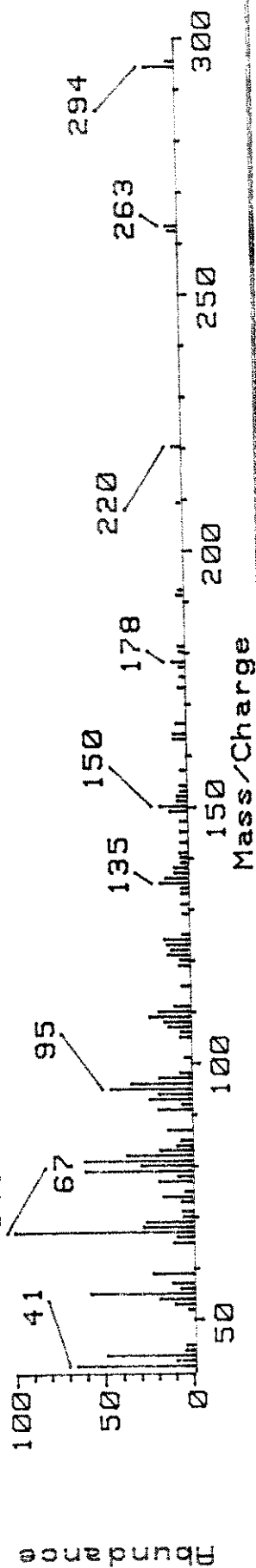
s(982) Scan 23.311 min. of DATA:SILV-ACO.D



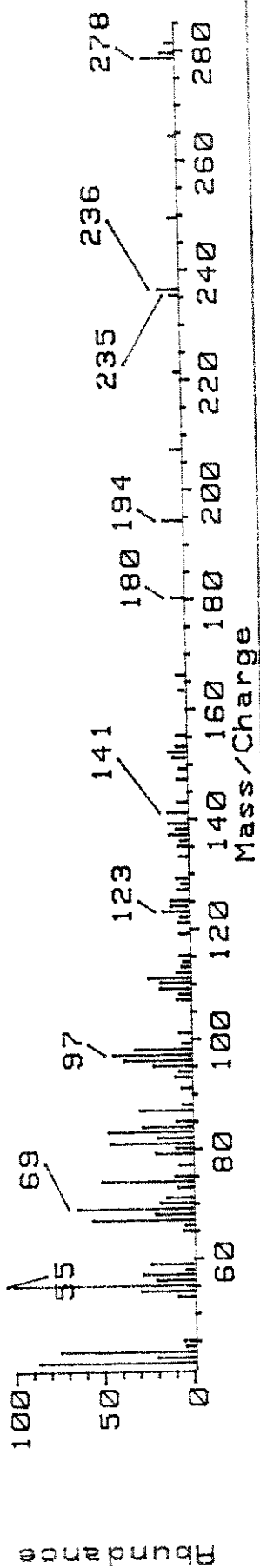
s(989) Scan 23.457 min. of DATA:SILV-ACO.D



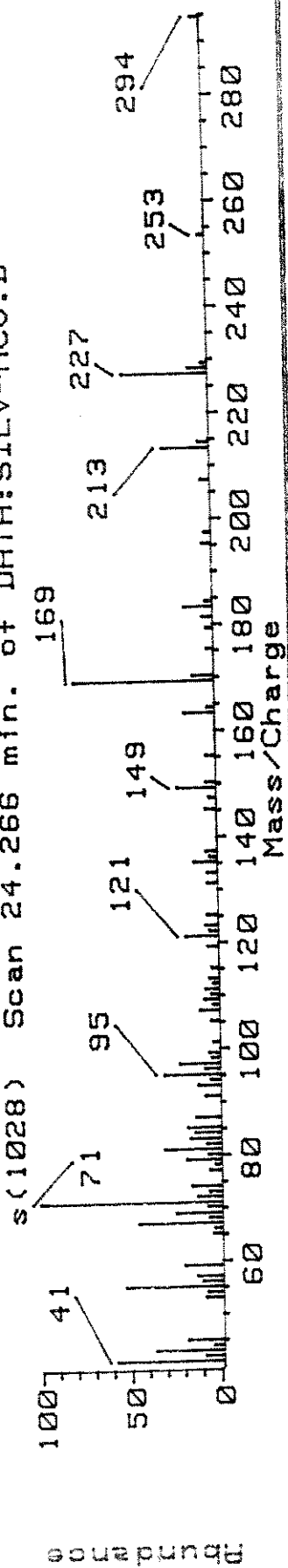
s(1008) Scan 23.850 min. of DATA:SILV-ACO.D



s(1014) Scan 23.975 min. of DATA:SILV-ACO.D



s(1028) Scan 24.266 min. of DATA:SILV-ACO.D



s(1058) Scan 24.887 min. of DATA:SILV-ACO.D

