



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
COORDENAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA – CAMPUS XERÉM
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em
suportes de óxidos de níbio**

Bernardo Gomes de Viveiros

Orientadores:

Prof. Dra. Evelin Andrade Manoel

MSc. Michelle Marques Santos

Duque de Caxias, RJ

Agosto/2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
COORDENAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA – CAMPUS XERÉM
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Bernardo Gomes de Viveiros

Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suportes de óxidos de nióbio

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para a obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Orientadoras: Prof. Dra. Evelin A. Manoel e Msc. Michelle Marques dos Santos

Duque de Caxias, RJ

Agosto/2023

Bernardo Gomes de Viveiros
Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em
suportes de óxidos de nióbio

**Monografia apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas: Biotecnologia**

Aprovado em 25 de agosto de 2023

BANCA EXAMINADORA:

**Prof^a Dra. Evelin Andrade Manoel – Centro de Ciências da Saúde - UFRJ
(Orientador)**

Prof^a Dra. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra – Campus Duque de Caxias - UFRJ

Prof. Dr. José Carlos Ferreira – Instituto de Química - UFRRJ

DUQUE DE CAXIAS
2023
FICHA CATALOGRÁFICA

Viveiros, Bernardo Gomes

Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosa* em suportes de nióbio/ Bernardo Gomes Viveiros. Duque de Caxias: UFRJ / Campus Duque de Caxias, 2023.

Trabalho de conclusão de curso (monografia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Duque de Caxias, Duque de Caxias, 2023

81 folhas

Orientadores: Prof. Dra. Evelin A. Manoel, Michelle Marques Santos

1. imobilização 2. biocatalisadores 3. nióbio 4. lipase.

RESUMO

No âmbito da aplicação comercial das lipases, a imobilização em suportes inorgânicos, como o óxido de nióbio, desempenha um papel crucial para obter biocatalisadores altamente eficientes e estáveis. Este estudo concentrou-se na imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em suportes inorgânicos de nióbio (Nb) (NbO, Nb₂O₅ e NbNH, Nb₂O₅nH₂O), visando obter resultados que possam competir de forma eficiente àqueles processos de biotransformação realizados por via química. Dos biocatalisadores produzidos, TLL-NbO e TLL-NbNH se destacaram apresentando atividades hidrolíticas satisfatórias frente aos substratos *p*-nitrofenil laurato (*p*-NFL) e *p*-nitrofenil butirato (*p*-NFB), destacando-se a maior atividade (912,73±7,65 U/g) quando o *p*-NFL, foi utilizado como substrato. Além disso, foram comparadas as atividades hidrolíticas utilizando substrato *p*-NFL dos suportes isolados, os resultados mostraram que TLL-NbO e TLL-NbNH (539,35±5,98 U/g e 912,73±7,65 U/g) respectivamente obtiveram atividades maiores quando comparado aos suportes isolados não imobilizados NbO e NbNH (107,89±0,42 U/g e 160,41±9,24U/g) respectivamente. O estudo da influência da temperatura, pH, concentração de tampão e solvente orgânico na atividade e estabilidade do catalizador imobilizado. A maior estabilidade dos biocatalisadores foi observada em temperaturas de 40°C e foi aferido um pH de atuação de 9. Além disso, os biocatalisadores também obtiveram as maiores atividades de hidrólise nas temperaturas de 50°C e 60°C utilizando. A escolha do tampão fosfato 25 mM (pH 7) demonstrou ser a mais adequada para as reações de hidrólise e esterificação utilizando *p*-NFL e ácido oleico como substrato respectivamente. Quanto à influência de solvente orgânico na atividade hidrolítica, foi observado que a partir de 20% de concentração dos solventes as atividades caíram em todos os ensaios. Apesar disso, percebe-se que para ambos os suportes, tanto o etanol quanto a acetona não levaram a uma queda brusca de atividade.

Os biocatalisadores TLL-NbO e TLL-NbNH apresentaram um aumento na atividade de esterificação (365,71±0,22 e 381,47±0,52) em relação aos suportes isolados (24,73±0,60 e 206,12±0,36), que foram utilizados como controle do processo de imobilização. Esses resultados mostraram que a interação lipase-suporte, após a imobilização, aumentaram a atividade do biocatalisador. A análise

por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou a presença de porosidade nos suportes de nióbio. No entanto, devido à escassez de estudos envolvendo suportes de nióbio na literatura, existe a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre os aspectos bioquímicos e catalíticos dessa abordagem de imobilização. Os novos biocatalisadores obtidos nesse projeto mostraram promissores para novas reações na biocatálise, abrindo um leque de oportunidades de aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: imobilização; biocatalisadores; nióbio; lipase.

ABSTRACT

In the context of the commercial application of lipases, immobilization on inorganic supports, such as niobium oxide, plays a pivotal role in obtaining highly efficient and stable biocatalysts. This study focused on the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) onto inorganic niobium supports (Nb) (NbO, Nb₂O₅, and NbNH, Nb₂O₅nH₂O), aiming to achieve results that could competitively match those achieved through chemical biotransformation processes. Among the produced biocatalysts, TLL-NbO and TLL-NbNH stood out, exhibiting satisfactory hydrolytic activities towards the substrates p-NFL and p-NFB, with the highest activity (912.73±7.65 U/g) observed when using p-NFL as the substrate. Furthermore, hydrolytic activities using p-NFL substrate were compared between the isolated supports, showing that TLL-NbO and TLL-NbNH (539.35±5.98 U/g and 912.73±7.65 U/g, respectively) obtained higher activities compared to the non-immobilized isolated supports NbO and NbNH (107.89±0.42 U/g and 160.41±9.24 U/g, respectively). An investigation into the influence of temperature, pH, buffer concentration, and organic solvent was conducted. The greatest stability of the biocatalysts was observed at 40°C, with an optimal pH of 9. Additionally, the biocatalysts also exhibited the highest hydrolysis activities at temperatures of 50°C and 60°C. The choice of 25 mM phosphate buffer (pH 7) proved to be the most suitable for hydrolysis and esterification reactions. Regarding the influence of organic solvent on hydrolytic activity, it was observed that activities decreased with solvent concentrations above 20% in all assays. Nonetheless, both ethanol and acetone did not lead to a sharp decrease in activity, even with increased concentration, for both supports. The biocatalysts TLL-NbO and TLL-NbNH exhibited increased esterification activity (365.71±0.22 and 381.47±0.52) compared to the isolated supports (24.73±0.60 and 206.12±0.36), which were used as controls for the immobilization process. These results indicated that the enzyme-support interaction, post-immobilization, enhanced the biocatalyst activity. Scanning electron microscopy (SEM) analysis revealed the presence of porosity in the niobium supports. However, due to the scarcity of studies involving niobium supports in the literature, there is a need for more in-depth investigations into the biochemical and catalytic aspects of this immobilization approach. The novel biocatalysts obtained in this project showed promise for new reactions in biocatalysis, opening up a range of opportunities for biotechnological applications.

Keywords: immobilization; biocatalysts; niobium; lipase.

AGRADECIMENTOS

Sinto-me imensamente grato e emocionado ao olhar para trás e refletir sobre o tempo em que passei nesta jornada acadêmica na UFRJ. Foram anos de aprendizado, crescimento pessoal e conquistas que jamais esquecerei. É com o coração cheio de gratidão que expresso meus sinceros agradecimentos a cada um de vocês que tornaram essa experiência tão especial.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha amada família. Sem o apoio, incentivo e amor incondicional de vocês, eu não teria chegado tão longe. Vocês que sempre me dão apoio nos momentos de dificuldades e que sempre me encorajaram e me incentivam nas minhas decisões. Cada conquista que alcancei na faculdade é também uma conquista de vocês, e sou grato por terem compartilhado essa jornada comigo.

Aos meus amigos queridos, vocês foram verdadeiros companheiros de jornada. Cada risada compartilhada, cada desafio superado juntos, fortalecem nossos laços de amizade. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, apoiando-me, incentivando-me e tornando a caminhada universitária mais leve e alegre.

À minha equipe de laboratório, dedico um agradecimento especial. O trabalho em conjunto, a troca de ideias e experiências foram fundamentais para o meu desenvolvimento como pesquisador. Cada experimento realizado, cada resultado alcançado, foi fruto do nosso esforço e colaboração mútua. Agradeço pela paciência, por compartilharem conhecimentos e por tornarem o ambiente de trabalho mais leve e inspirador.

Por fim, não posso deixar de expressar minha profunda gratidão à Universidade Federal do Rio de Janeiro. A UFRJ foi o cenário onde vivi momentos inesquecíveis e onde encontrei um espaço acolhedor para explorar minhas paixões acadêmicas e pessoais. Cada pessoa e cada experiência na UFRJ moldaram a pessoa que sou hoje e me deram as ferramentas necessárias para enfrentar o futuro com confiança e determinação. Carrego comigo as memórias preciosas desses anos e agradeço por tudo que recebi nesta instituição.

Com gratidão eterna,

Bernardo Gomes de Viveiros

“Talvez não haja melhor demonstração da loucura dos conceitos humanos do que a imagem distante de nosso minúsculo mundo. Para mim, isso ressalta nossa responsabilidade de lidar com mais gentileza uns com os outros e de preservar e valorizar o pálido ponto azul, o único lar que já conhecemos.”

— Carl Sagan, *Pale Blue Dot: A Vision of the Human Future in Space*

“O nitrogênio em nosso DNA, o cálcio em nossos dentes, o ferro em nosso sangue, o carbono em nossas tortas de maçã, foram feitos no interior das estrelas em colapso. Nós somos feitos da poeira de estrelas.”

— Carl Sagan, *Cosmos*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19	
2.1. Nióbio no Brasil	20	
2.1.2 Óxidos de nióbio	20	
2.2. Biocatálise	21	
2.3. Lipases	24	
2.3.2 Características cinéticas e físico-química das Lipases	27	
2.3.3 Fenômeno da Ativação Interfacial em Lipases	30	
2.3.4 Lipase de <i>Thermomyces lanuginosa</i>	28	
2.4. Imobilização Enzimática	30	
2.4.1. Suportes para imobilização de enzimas		35
3. OBJETIVOS	36	
3.1. Objetivos específicos	35	
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36	
4.1.1 Enzimas	36	
4.1.2 Suporte para imobilização	37	
4.1.3 Preparação do suporte utilizado na imobilização	37	
4.1.4 Imobilização por Adsorção Física	37	
4.1.5 Cálculo dos parâmetros de imobilização	38	
4.1.6 Determinação da atividade hidrolítica dos biocatalisadores	39	
4.1.7 Métodos de Imobilização em suportes hidrofóbicos	41	
4.1.8 Determinação da concentração de proteína	42	
4.1.9 Determinação da atividade de esterificação dos derivados imobilizados	43	
4.2 Caracterização bioquímica dos derivados imobilizados		44
4.2.1 Efeitos da temperatura na atividade enzimática da TL imobilizada	44	
4.2.2 Avaliação do efeito da molaridade do tampão fosfato de sódio sobre a atividade da enzima		44
4.2.3 Efeitos da adição de diferentes solventes na atividade hidrolíticas		45

4.2.4 Estudo do reuso dos suportes de nióbio	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1. Cinética de Imobilização de lipase de TL em suportes poliméricos	46
5.2. Dosagem da concentração de proteína	47
5.3. Efeitos do pH na atividade enzimática da TL livre e imobilizada	48
5.4. Efeitos da temperatura na atividade enzimática da TL livre e imobilizada	56
5.6 Efeitos de diferentes molaridades na atividade enzimática da TL livre e imobilizada	62
5.8 Reação de esterificação	64
5.9 Imagens feitas do suporte por Microscópio eletrônico de varredura (MEV)	65
6. CONCLUSÕES	68
7.PERSPECTIVAS FUTURAS	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 — Tabela de aplicações do nióbio.

FIGURA 2 — Estrutura química dos sítios ativos do Nb₂O₅.

FIGURA 3 — Artigos científicos publicados contendo “Nb₂O₅” no título.

FIGURA 4 — Representação esquemática para hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases.

FIGURA 5 — Reações catalisadas pelas lipases em meio aquoso e orgânico.

FIGURA 6 — Representação esquemática da conformação aberta e fechada da lipase. A atividade catalítica da conformação aberta (E2) é muito maior que na conformação fechada (E1).

FIGURA 7 — Estrutura tridimensional da lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL, PDB ID: 1DTE) com uma tríade catalítica (Ser146, Asp201 e His258; em verde) e domínio da tampa (84–95; em vermelho)

FIGURA 8 — Métodos gerais de imobilização do biocatalisador.

FIGURA 9 — Processo de imobilização.

FIGURA 10 — Representação gráfica da atividade hidrolítica relativa por tempo durante o processo de imobilização de TLL em NbO e NbNh.

FIGURA 11 — Gráfico gráfica da concentração de proteína relativa por tempo (min) dos suportes.

FIGURA 12 — Interação no pH do suporte de Nióbio puro com tampão Fosfato 7 durante o tempo.

FIGURA 13 — Ensaio de hidrólise em diferentes valores de pH

FIGURA 14 — Efeito do pH sobre o biocatalisador durante o tempo

FIGURA 15 — Efeito do pH sobre o biocatalisador durante o tempo

FIGURA 16 — Efeito do pH sobre o biocatalisador durante o tempo

FIGURA 17 — Estudo da influência da temperatura na atividade hidrolítica

FIGURA 18 — Efeito da temperatura sobre a estabilidade do biocatalisador

FIGURA 19 — Efeito da temperatura sobre a estabilidade do biocatalisador

FIGURA 20 — Efeito da temperatura sobre a estabilidade do biocatalisador

FIGURA 21 — ensaio de hidrólise em diferentes concentrações de solventes

FIGURA 22 — Atividade de hidrólise em diferentes concentrações molares de tampão Fosfato pH 7.

FIGURA 23 — NbO 500x de magnitude

FIGURA 24 — NbO 5.00Kx de magnitude

FIGURA 25 — NbNH 500x de magnitude

FIGURA 26 — NbNH 5.00Kx de magnitude

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 — Classes padrões de enzimas e os tipos de reações que catalisam

TABELA 2 — Classificação dos suportes de acordo com a composição.

TABELA 3 — Concentrações do padrão em diferentes proporções da solução de *p*-nitrofenol em acetonitrila e da solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7.

TABELA 4 — Atividade hidrolítica de diferentes biocatalisadores utilizando *p*-NFL e *p*-NFB como substrato

TABELA 5 — Atividade de esterificação.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 — Curva de calibração do *p*-nitrofenol no comprimento de onda 348 nm.

GRÁFICO 2 — Curva de calibração do *p*-nitrofenol no comprimento de onda 412 nm.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

TLL — *Thermomyces lanuginosa livre*

Nb₂O₅ — Pentóxido de nióbio

Nb₂O₅.nH₂O — Pentóxido de nióbio hidratado

NbO — Pentóxido de nióbio 1

NbNH — Pentóxido de nióbio 2

TLL-NbO — Enzima TLL imobilizada em NbO

TLL-NbNh — Enzima TLL imobilizada em NbNh

Asp201 — Asparagina

His258 — Histidina

Ser146 — Serina

H0 — Poder ácido

DMSO — Dimetilsulfóxido

(v/v) — Volume por Volume

NaOH — Hidróxido de sódio

(m/m) — Massa por Massa

μmol — Micromol **mM** —

Milimolar **nm** — Nanômetro **ug**

— Micrograma **p-NFL** — Laurato

de *p*- nitrofenila **p-NFB** —

Butirato de *p*-nitrofenila **MEV** —

Microscópio eletrônico de

varredura °C — Grau Celsius mL

— Mililitro

g — Gramas

h — Hora

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas amplamente estudadas e aplicadas em biocatálise, desempenhando um papel crucial em diversos processos, tanto no campo acadêmico como industrial (RODRIGUES *et al.*, 2019). Esses biocatalisadores são altamente eficientes, exibindo capacidade de catalisar uma variedade de reações químicas, tais como hidrólise, esterificação e transesterificação. Com o objetivo de atender aos requisitos econômicos e ambientais, muitos pesquisadores e empresas têm investido na criação de tecnologias sintéticas ambientalmente amigáveis, que minimizem a produção de resíduos tóxicos e economizem energia (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a imobilização das lipases em suportes sólidos é uma estratégia essencial para facilitar sua separação do meio reacional, possibilitando sua reutilização e uso em sistemas contínuos. O processo de imobilização pode resultar em melhorias nas propriedades enzimáticas, tais como estabilidade, especificidade e atividade. Dentre as alternativas inovadoras para esse fim, a utilização de suportes inorgânicos, como o óxido de nióbio, se destaca como uma opção promissora. O Brasil possui papel relevante na extração deste metal, sendo detentor da maior parte das reservas mundiais de nióbio — aproximadamente 98%. O pentóxido de nióbio (Nb_2O_5) apresenta propriedades de superfície, como acidez de Bronsted-Lowry e área superficial elevada, o que o torna um excelente catalisador em reações químicas e um suporte adequado para novos biocatalisadores. Além disso, a tecnologia de obtenção do óxido de nióbio é simples e de baixo custo, o que o tornou uma alternativa atraente do ponto de vista técnico-econômico para substituir matrizes inorgânicas comerciais, como a sílica e seus derivados (CECCHI *et al.* 2018).

O uso de suportes de baixo custo para a imobilização de lipases tem sido amplamente explorado e revela-se uma opção promissora para aplicação em escala industrial (MANOEL, 2015).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nióbio no Brasil

O nióbio é um elemento químico de grande importância industrial e tecnológica, pertencente ao grupo 5 da tabela periódica e classificado como um metal de transição. Embora os minerais de nióbio não sejam abundantes na crosta terrestre, o Brasil desempenha um papel significativo na herança desse metal, possuindo aproximadamente 98% das reservas mundiais de nióbio, com a maior jazida localizada em Araxá, Minas Gerais (JUNIOR *et al.*, 2003; ARANDA *et al.*, 2009). O elemento destaca-se por suas propriedades físico-químicas, como: massa específica de 8,57 g/cm³, elevado ponto de fusão de 2468 °C, elevado ponto de ebulição de 4744 °C, supercondutor em temperaturas menores que -364 °C e excelente maleabilidade e ductilidade quando puro (NICO *et al.*, 2016; PEREIRA JÚNIOR, 2009; YANG *et al.*, 2014; YOON, 2010).

Devido à sua relevante abundância no Brasil e sua importância no mercado mundial, o país se destaca como o principal produtor e exportador de nióbio; sua extração é predominantemente realizada por meio de mineração ao ar livre, seguida de processos de beneficiamento e purificação para obtenção do metal em sua forma pura. Em razão de suas propriedades, o nióbio é amplamente utilizado em diversas aplicações industriais, destacando-se sua aplicação na produção de aços de alta resistência, ligas supercondutoras, que possuem a propriedade única de conduzir eletricidade sem resistência, encontrando em aparelhos médicos, transmissores de energia e equipamentos de pesquisa científica; além disso, o material também é encontrado em equipamentos aeroespaciais, na indústria petroquímica, na construção civil, na indústria automobilística e naval (NOWAK *et al.* 1999; MARIN *et al.* 2014).

No setor aeroespacial, o nióbio é utilizado na fabricação de componentes estruturais devido à sua alta resistência à corrosão e ao calor extremo; já na petroquímica, é empregado como catalisador em processos de refino de petróleo, otimizando a produção de combustíveis e produtos químicos de alta qualidade (LOPES *et al.*, 2014).

Apesar da ampla utilização do nióbio em diversas áreas, ainda existem oportunidades para explorar seu potencial em novos usos e aplicações. Pesquisas

contínuas são necessárias para aprofundar o conhecimento sobre as propriedades e a versatilidade desse elemento, buscando novas maneiras de otimizar seu uso e expandir sua aplicação em diferentes setores industriais, como mostra a figura 1. O constante avanço científico e tecnológico pode abrir caminho para novas descobertas e inovações relacionadas ao emprego do nióbio, proporcionando benefícios significativos à sociedade e à indústria.

FIGURA 1 — Aplicações do nióbio



Fonte: Autor, 2023.

2.1.1 Óxidos de nióbio

Quanto ao óxido de nióbio, segundo Pereira Júnior (2009), a CBMM é a única empresa em âmbito nacional a produzir e exportar o composto, contabilizando cerca de 95% de sua produção. O composto é retirado do minério pirocloro, é a matéria prima para a fabricação do nióbio puro, visto que é a sua forma mais estável, ainda, podendo ser produzido em elevado grau de pureza. Também é utilizado para a

produção de outros compostos, como: carboneto de nióbio, niobato de lítio e cloreto de nióbio (LIMA, 2010). Em relação a suas propriedades físico-químicas, Souza (2015) apresentou os valores de 4,95 g/cm³ de massa específica e 1495 °C de ponto de fusão.

Os óxidos de nióbio constituem uma classe importante de compostos químicos que contêm nióbio e oxigênio. A característica marcante do nióbio é sua capacidade de formar diversos tipos de óxidos com diferentes cores e propriedades. A estequiometria de formação desses óxidos é determinada pela fórmula geral $Nb_{3n+1}O_{8n-2}$, onde “n” pode assumir os valores 5, 6, 7 ou 8. Os óxidos mais conhecidos são o NbO (de cor preta), NbO₂ (de cor cinza) e Nb₂O₅ (de cor branca) (NOWAK *et al.* 1999; MARIN *et al.* 2014).

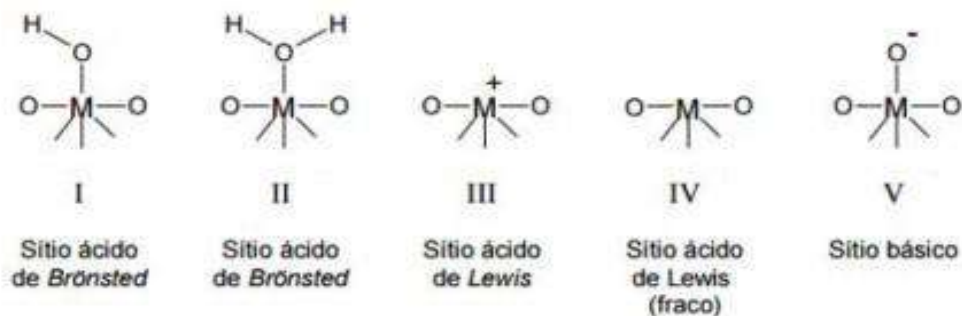
O pentóxido de nióbio (Nb₂O₅) é geralmente o óxido mais estável formado e apresenta o estado de oxidação do nióbio igual a +5, resultando em um pó branco insolúvel em água (BUSACCA *et al.*, 2011). A complexidade estrutural do Nb₂O₅ é notável, pois ele pode existir em diferentes formas cristalinas e alotrópicas. Essa característica influencia as suas propriedades físicas e químicas, tais como condutividade elétrica, capacidade de armazenamento de íons e atividade catalítica. Por exemplo, a variedade de arranjos atômicos pode resultar em diferentes atividades catalíticas, seletividades e estabilidades químicas (LOPES *et al.* 2014).

Os óxidos de nióbio encontram diversas aplicações importantes em diferentes áreas e, especialmente, na catálise. Compostos que contêm nióbio têm sido amplamente utilizados em várias reações de interesse industrial devido ao notável aumento de atividade catalítica, seletividade e estabilidade química, observados quando pequenas quantidades de nióbio são adicionadas aos catalisadores. (LOPES *et al.*, 2014; BRAGA *et al.*, 2008)

O óxido de nióbio se destaca, especialmente, por apresentar uma acidez entre os óxidos metálicos; a acidez do sítio ativo de um catalisador desempenha um papel crucial em suas propriedades catalíticas. (MORAIS *et al.*, 1991) O pentóxido de nióbio possui sítios tolerantes de Bronsted e Lewis, conferindo-lhe uma acidez com um valor de H₀ (poder ácido) de -5,6 (figura 2); tais sítios permitem que o óxido de nióbio interage tanto com ácidos fortes quanto com bases fortes, tornando-o um

catalisador anfótero. Essa versatilidade em interações com diferentes espécies químicas é uma vantagem importante para seu desempenho catalítico.

Figura 2 — Estrutura química dos sítios ativos do Nb₂O₅

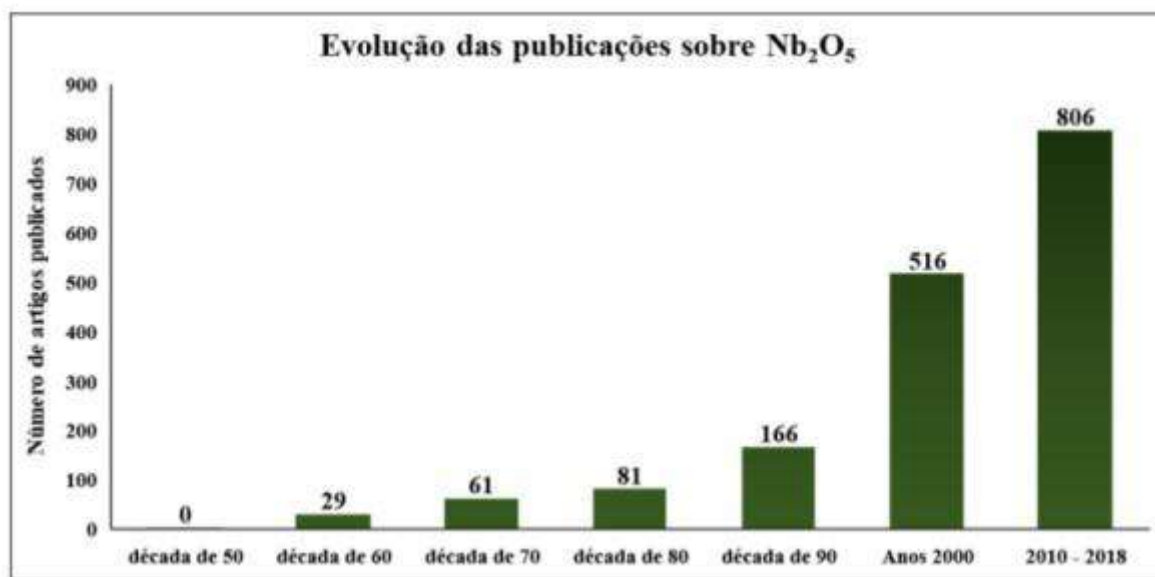


Fonte: MORAIS, J. F. *et al.*, 1991.

A metodologia para obtenção do óxido de nióbio é considerada simples e de baixo custo. (MIRANDA *et al.*, 2004) Esse aspecto reforça ainda mais o potencial do óxido de nióbio como um material de destaque em diversas aplicações em biotecnologia. (LOPES *et al.*, 2014) Esse material já é usado como um catalisador químico, diminuindo a energia de ativação dos processos sem serem consumidos nas reações envolvidas. (VARANDAS *et al.*, 2018)

No cenário brasileiro, existe um encorajamento por parte do Ministério de Minas e Energia para apoiar a pesquisa e o avanço tecnológico voltados para a valorização do nióbio e seus produtos derivados. Essa tendência é ilustrada na Figura 3, que apresenta um aumento gradual no número de artigos científicos publicados, contendo o termo "Nb₂O₅" em seus títulos e disponíveis no Portal de Periódicos da CAPES. Essas publicações abrangem o período de 1950 até o final de 2018.

Figura 3- Artigos científicos publicados contendo “Nb₂O₅” no título.



Fonte: Adaptado FREITAS, *et al.*, 2019.

2.2 Biocatálise

As enzimas são macromoléculas compostas predominantemente por proteínas e são potentes catalisadores biológicos — embora também seja possível a ocorrência de reações catalisadas por RNA. (SILVA *et al.*, 2018) Contudo, por serem muito ativas e versáteis, as enzimas são biocatalisadores altamente requisitados devido às suas propriedades, executando uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação (pH, temperatura, solventes, força iônica), o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. (ORTIZ *et al.*, 2019) Além disso, devido à sua especificidade, o uso de enzimas como biocatalisadores apresenta outra vantagem importante: a redução do tempo e do número de etapas nas reações sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas. (PATEL *et al.*, 2002; PIZARRO *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003)

No entanto, as enzimas podem sofrer modificações temporárias por meio de inibidores e ativadores: esses compostos se ligam ao sítio ativo da enzima resultando na redução ou aumento da atividade enzimática, respectivamente. O complexo formado pela enzima e o substrato é essencial para a ocorrência da reação enzimática, sendo a base para o desenvolvimento de modelos cinéticos

utilizados no estudo do comportamento das enzimas e na descrição dos mecanismos das reações envolvidas. (VARANDAS *et al.*, 2018)

As enzimas têm origem em diversas fontes, como vegetais, animais e microorganismos, sendo as enzimas industriais, em particular, amplamente obtidas a partir destes últimos. (SHARMA *et al.*, 2001) Essas enzimas microbianas apresentam várias vantagens em relação às provenientes de plantas e animais; isso se deve à grande diversidade de atividades catalíticas que os microorganismos possuem, permitindo altos rendimentos. Além disso, eles são mais facilmente manipuláveis geneticamente, têm disponibilidade constante, já que não sofrem flutuações sazonais, e geralmente se desenvolvem rapidamente em meios de baixo custo. Outro ponto a seu favor é a sua maior estabilidade, tornando sua produção mais conveniente e segura. (SILVA *et al.*, 2018) As enzimas são classificadas em seis categorias, conforme o tipo de reação que podem realizar. (Tabela 1)

TABELA 1 — Classes padrões de enzimas os tipos de reações que catalisam

Classe de Enzimas	Algumas Subclasses	Tipos de Reações Catalisadas
Oxidoreduases	Desidrogenases Oxidases Redutases	Formação de ligação dupla por eliminação de H ₂ . Oxi-Redução
Transferases	Quinase Transaminase	Transferência de um grupo fosfato Transferência de um grupo amino
Hidrolases	Nucleases Lipases Proteases	Hidrólise de um grupo fosfato Hidrólise de um grupo éster Hidrólise de um grupo amino
Liasas	Descarboxilases Desidrases	Eliminação de CO ₂ Eliminação de H ₂ O
Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico
Ligases	Carboxilases Sintetases	Adição de CO ₂ Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, CN, C-C.

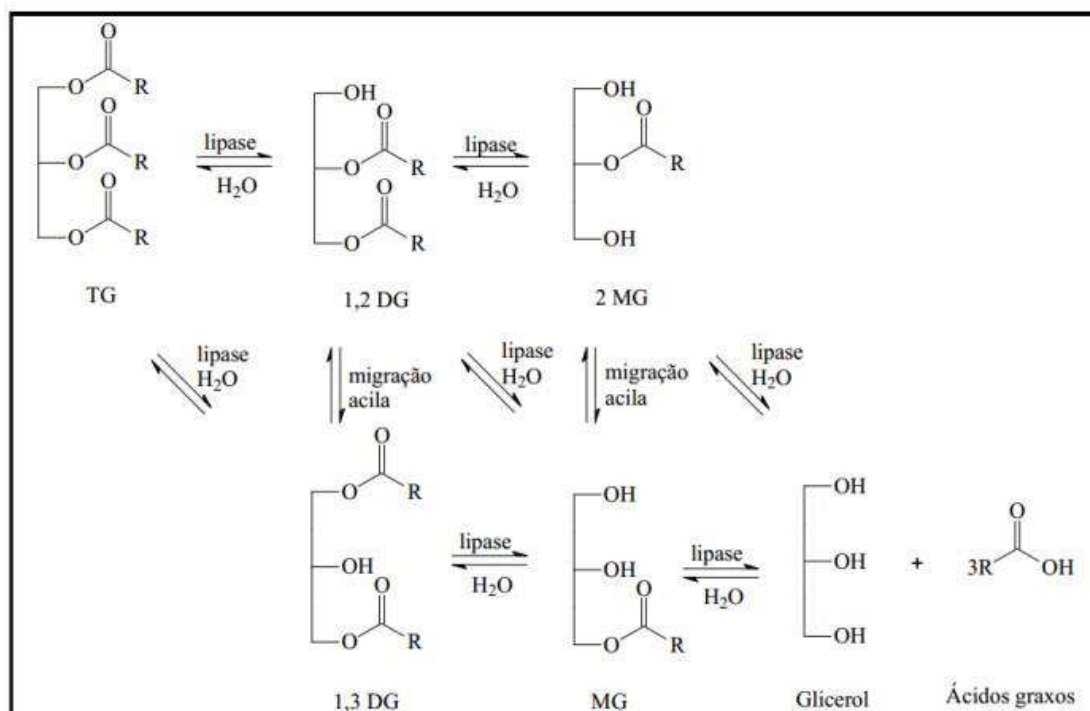
Fonte: NELSON, David L.; COX, Michael M.. Princípios de bioquímica de Lehninger.

Dentre as hidrolases, as lipases têm recebido atenção especial por parte do meio industrial devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade ao substrato, além de representar a classe de enzimas mais amplamente empregada em aplicações biotecnológicas e química orgânica (TREICHEL, *et al.*, 2010).

2.3 Lipases

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas extremamente versáteis, classificadas na família das carboxil éster hidrolases. Quando presentes em ambientes aquosos, catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, gerando ácidos graxos livres e glicerol como produtos de reação (figura 4). Segundo Kapoor e Gupta (2012), a função de hidrólise representa o papel fisiológico destas enzimas no metabolismo de lipídeos, que ocorre em uma interface água/óleo.

Figura 4 — Representação esquemática para hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases



Fonte: FUREBY, *et al.*, 1997.

É importante ressaltar que essas enzimas possuem a capacidade de catalisar vários outros tipos de biotransformação. Estas são consideradas solúveis em água, podendo catalisar suas reações, em dois tipos de sistemas: meio aquoso e orgânico

(JAVED *et al.*, 2018). Além da capacidade de reação de hidrólise, lipases atuam em reações inversas de interesterificação e transesterificação em condições de baixo teor de água (figura 5) (SALIHU *et al.*, 2015).

Figura 5 — Reações catalisadas pelas lipases em meio aquoso e orgânico.

<p>A - Hidrólise de éster Na hidrólise a água é um dos reagentes e deve ser adicionada para catalisar a reação no sentido desejado.</p> $R-CO-O-R' + H_2O \leftrightarrow R-CO-OH + HO-R'$
<p>B - Síntese de éster Na síntese, a água é formada durante o processo na mesma proporção do produto principal e geralmente interfere no equilíbrio reacional quando não são adotadas estratégias de controle e/ou remoção da quantidade extra de água.</p> $R-CO-OH + HO-R' \leftrightarrow R-CO-OR' + H_2O$
<p>C - Interesterificação Na interesterificação a água não participa do equilíbrio reacional, entretanto, deve ser fornecida em quantidades mínimas necessárias para manter ativa e estável a preparação enzimática.</p> <p>C1- Transesterificação $R_1-COO-R_1' + R_2-COOR_2' \leftrightarrow R_1-COO-R_2' + R_2-COO-R_1'$</p> <p>C2- Acidólise $R_1-COO-R_1' + R_2-COOH \leftrightarrow R_2-COO-R_1' + R_1-COOH$</p> <p>C3- Alcoólise $R_1-COO-R_1' + HO-R_2 \leftrightarrow R_1-COO-R_2 + R_1'-OH$</p>

Fonte: Castro e Anderson, 1995.

Além de uma extensa versatilidade catalítica, as lipases apresentam uma grande faixa de atuação em relação aos seus substratos. Assim, são capazes de atuar sobre lipídios de diferentes características, como tipos de saturação e comprimentos de cadeia. Não obstante o funcionamento destas enzimas em um amplo espectro de substratos, existem lipases que apresentam especificidades e preferências por certos substratos. Segundo Kapoor e Gupta (2012), a especificidade das lipases pode ser classificada em relação a quatro principais categorias:

- 1) ao posicionamento das cadeias de ácido graxo ligadas ao triacilglicerol. Algumas lipases apresentam uma preferência catalítica 1,3-específica, sendo

capazes de catalisar reações, preferencialmente, nas posições 1 e 3 do triacilglicerol. Meghwanshi e colaboradores (2006), por exemplo, estudaram a regioespecificidade de lipases bacterianas, assim, encontraram três *Bacillus* e um *Pseudomonas* que produzem lipases 1,3-regioespecíficas, como determinado pela análise cromatográfica dos produtos de hidrólise da trioleína;

2) ao encaixe e posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima. Esse tipo de especificidade pode ser explicado pelas diferenças na estrutura terciária destas enzimas e o encaixe do substrato. Identificou-se que lipases com sítio de ligação ao substrato em formato de túnel apresentam maior aceitação a substratos com ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que as lipases com um sítio de ligação em formato de fenda ou funil mostram preferência pelo oposto (PLEISS *et al.*, 1998);

3) ao tipo de substrato, como o caso da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, que apresenta preferência pela hidrólise de ésteres constituídos de ácidos graxos de cadeia longa ($n \geq 10$) e

4) A estereoespecificidade é uma característica das lipases que se refere à sua capacidade de catalisar seletivamente a hidrólise ou esterificação de apenas um dos dois estereoisômeros presentes em uma molécula. Em outras palavras, algumas lipases são capazes de atuar de forma seletiva em um estereoisômero específico (COSTA *et al.*, 1999).

Dentre outras classificações, as lipases se diferenciam das esterases por sua especificidade de atuação sobre o substrato de acordo com o tamanho da cadeia carbônica dele. Assim, consideram-se esterases as enzimas que são capazes de atuar sobre triacilgliceróis de cadeia curta (< que 10 carbonos) (CHOI *et al.*, 2003), (solúveis em água) e lipases verdadeiras aquelas capazes de atuar tanto sobre triacilgliceróis de cadeia curta quanto longa (insolúveis em água). (VERGER *et al.*, 1997).

As lipases estão entre os biocatalisadores mais valorizados na área da biotecnologia (TAVARES FILHO *et al.*, 2015) e são utilizadas em diversas áreas de

aplicação: alimentício, farmacêutico, químico, detergentes, tratamento efluentes e águas residuais, biodiesel, entre outros (FERRAZ *et al.*, 2018).

Segundo Munhoz e colaboradores (2020), as lipases podem ser produzidas por todos os seres vivos, como fungos, plantas e animais. As de origem vegetal são encontradas em grandes concentrações em látex, frutos, folhas ou sementes. Já as de origem animal são adquiridas de bezerros ou suínos, por exemplo.

2.3.1 Características cinéticas e físico-químicas das Lipases

A maioria das lipases atuam em temperaturas entre 30°C e 40°C, mas algumas lipases de microrganismos, como *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus thermocatenulatus* e *Pseudomonas* sp, mostram atividade em temperaturas mais altas, acima de 40°C; além disso, existem as que atuam à 70°C (CHO *et al.*, 2000; QUYEN *et al.*, 2003), como as de microrganismos encontrados em fontes termais, sendo úteis para aplicações industriais em altas temperaturas, como na produção de biodiesel ou detergentes.

Em relação ao pH, a maioria das lipases apresenta alta atividade em uma faixa de pH entre 5 e 9, com um pico de atividade entre 6 e 8 (RIBEIRO, *et al.*, 2017). No entanto, existem algumas lipases que são excepcionalmente estáveis em amplas faixas de pH, como a lipase de *Bacillus megaterium* é estável em pH de 4 a 12, enquanto a lipase de *Staphylococcus epidermidis* é estável em pH entre 2 e 10 (RUIZ *et al.*, 2002; SIMONS *et al.*, 1998). Essa ampla estabilidade ao pH torna essas lipases úteis em várias aplicações industriais que exigem necessariamente condições ácidas ou alcalinas extremas.

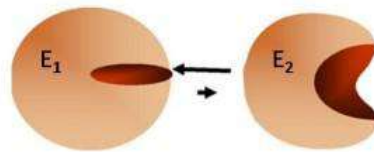
As lipases microbianas já caracterizadas possuem peso molecular entre 19 e 60 kDa e apresentam uma estrutura terciária comum com um dobramento de α/β hidrolase. (MANOEL *et al.*, 2014)

2.3.3 Fenômeno da Ativação Interfacial em Lipases

Lipases podem apresentar uma estrutura anfifílica com uma parte móvel chamada de tampa ou *lid*, que cobre o sítio catalítico da enzima, isolando-o do meio reacional. Quando presente, a tampa apresenta resíduos hidrofóbicos na sua face

interna que integram com as regiões hidrofóbicas ao redor do sítio ativo, em sua conformação fechada, tornando-a inativa. Quando a lipase está em contato com uma interface hidrofóbica (como solvente orgânico-água, lipídeo-água ou micelas), ocorre uma mudança na conformação da tampa para a forma aberta. Essa mudança exhibe o sítio ativo da enzima, facilitando a ligação com o substrato, o que favorece a reação catalítica (CABRERA *et al.*, 2009; PALOMO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2013). Embora a estrutura da tampa esteja associada a esse fenômeno, descobriu-se que a presença da tampa hidrofóbica não é necessariamente a única responsável pela ativação interfacial (RANSAC *et al.*, 1996; VERGER *et al.*, 1997). A mudança na conformação está representada na figura 6:

Figura 6 — Representação esquemática da conformação aberta e fechada da lipase. A atividade catalítica da conformação aberta (E2) é muito maior que na conformação fechada (E1).



Fonte: MATEO, *et al.*, 2007b; RODRIGUES *et al.*, 2013.

As lipases apresentam atividade enzimática constante até que a concentração micelar crítica (CMC) do substrato seja atingida no meio reacional. Quando a CMC é atingida, ocorre um aumento na velocidade de formação do produto, que é chamado de ativação interfacial (RIBEIRO *et al.*, 2017). Isso acontece quando há formação de interfaces entre a lipase e as micelas do substrato. A maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, mas o contrário não foi observado. (BORNSCHEUER *et al.* 2002; NINI *et al.*, 2001).

Evidências estruturais sugerem que a presença da "lid" pode influenciar a atividade catalítica e a seletividade de algumas lipases (SECUNDO *et al.*, 2006). Lipases como a de *Thermomyces lanuginosa* têm a "lid" em suas estruturas, levando à ativação interfacial. Porém, a existência da "lid" nem sempre implica em ativação interfacial, como nas lipases de *P. aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *C. antarctica B* (JAEGER e REETZ, 1998a; JAEGER *et al.*, 1994). Por outro lado, cutinases, como as menores lipases (19 kDa), não possuem "lid" e não requerem interface para

atividade hidrolítica (CYGLER e SCHRAG, 1997; YAO e KOLLER, 1994). Assim, a caracterização de lipases baseia-se pela definição de que lipases são carboxilesterases e sua capacidade de catalisar a hidrólise de acilgliceróis (VERGER, 1997; FREIRE e CASTILHO, 2010). Em resumo, é importante entender o fenômeno de ativação interfacial especialmente quando utilizados lipases de *Thermomyces* pois essa compreensão pode nos dar pistas do tipo de interação e como certos parâmetros podem influenciar na atividade da enzima.

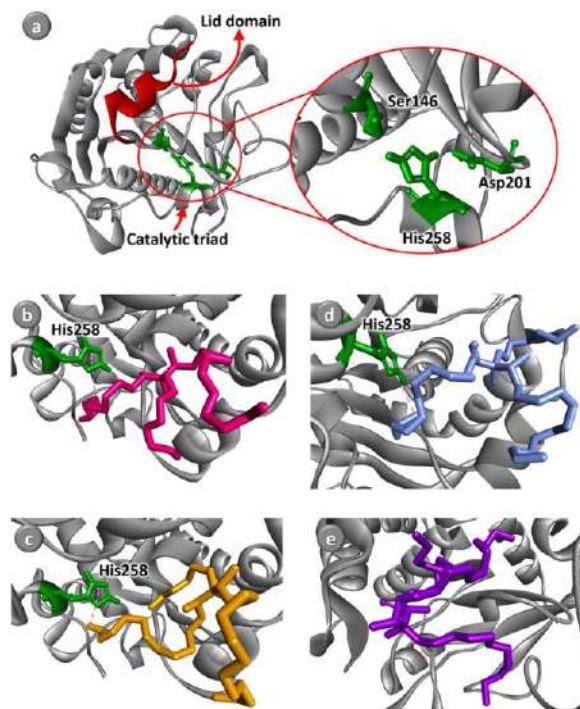
2.3.4 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é uma enzima amplamente utilizada devido à sua alta atividade lipásica e estabilidade em diferentes condições de reação. Em 1994, a farmacêutica Novo Nordisk iniciou a comercialização da primeira lipase comercial, Lipolase (TLL), que teve origem no fungo *Thermomyces lanuginosus* e também foi expressa em *A. oryzae* (HASAN *et al.*, 2006; JAEGER *et al.*, 1994).

Thermomyces lanuginosus é uma espécie de fungo termofílico pertencente ao gênero *Thermomyces*, conhecido por sua capacidade de degradar hemicelulose. É classificado como um deuteromiceto. (DONALD G. EMERSON; RALPH EMMERICH *et al.*, EMERSON *et al.*, 1964). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (figura 7) é composta por 269 resíduos de aminoácidos e possui uma tríade catalítica formada pelos resíduos Asp201, His258 e Ser146. Além disso, o resíduo Trp89 é considerado uma parte essencial da tampa da TLL. Essas características são fundamentais para a atividade da enzima na hidrólise de lipídios (VILLO *et al.*, 2014).

A TLL é uma hidrolase glicosilada com uma massa molecular de 30 kDa. Ela apresenta alta atividade em uma ampla faixa de pH, variando entre 7 e 12, mas seu ponto ótimo de atividade ocorre em pH 8. Apesar de ser uma lipase de um microrganismo termófilo, sua temperatura ótima para atividade enzimática está entre 30°C e 40°C. Além disso, ela ainda mantém atividade significativa até 60°C. (FERNANDES *et al.*, 2004; NEVES PETERSEN *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2011)

Figura 7— Estrutura tridimensional da lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL, PDB ID: 1DTE) com uma tríade catalítica (Ser146, Asp201 e His258; em verde) e domínio da tampa (vermelho).



Fonte: ResearchGate. Disponível em:

https://www.researchgate.net/figure/a-Three-dimensional-structure-of-Thermomyces-lanuginosus-lipase-TLL-PDB-ID-1DTE-with_fig2_351893813

Em geral, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, seja durante o armazenamento ou o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, é necessário proteger as enzimas da interação com o solvente — o meio onde a reação ocorre — pois isso poderia levar à sua inativação, impossibilitando a catálise da reação. Diante desse problema, a técnica de imobilização é empregada para aumentar estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação, reutilização e redução nos custos do processo. (VILLENEUVE *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2017).

2.4 Imobilização enzimática

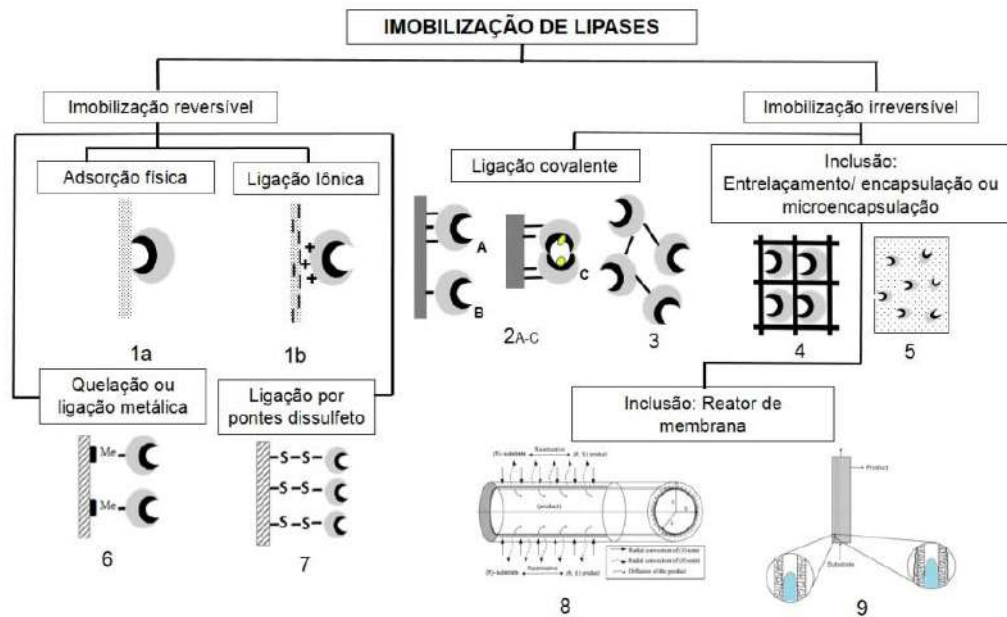
O processo de imobilização de biomoléculas envolve a ligação ou aprisionamento de um alvo de origem biológica na superfície de uma matriz insolúvel (suporte). Os métodos de imobilização de proteínas exploram as propriedades físico-

químicas. Assim, o método de imobilização baseia-se nos diferentes tipos de ligações e/ou interações que podem ser feitas com o suporte como por exemplo: confinar a enzima em um material utilizado como suporte, seja no interior (poros), adsorvido no suporte, ligados a agentes bifuncionais, entrelaçados em matrizes lignocelulósicas, por ligação cruzada empregando enzimas cristalinas (cross-linked enzyme crystals – CLECs) e agregados enzimáticos reticulados (cross-linked enzyme aggregates – CLEAs) e etc (Cao, S.; Xu, P., *et al* 2016). O termo "enzimas imobilizadas" foi apresentado por Katchalski-Katzir durante a primeira Conferência de Engenharia Enzimática realizada em 1971 na cidade de Henniker, nos Estados Unidos, para descrever enzimas que estão confinadas fisicamente ou localizadas em uma região específica do espaço, mantendo sua atividade catalítica e podendo ser reutilizadas de forma repetida e contínua. (KENNEDY *et al.*, 1983). Se espera que o complexo formado entre a enzima e o suporte após o processo de imobilização preserve as características físicas do suporte, ao mesmo tempo em que objetiva a manter a atividade biológica da enzima disponível na forma solúvel (MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização de enzimas tem sido considerada uma estratégia excelente para superar os problemas na utilização de enzimas livres, proporcionando melhorias significativas, como aumento da estabilidade, especificidade e seletividade (WANG *et al.*, 2021), bem como a reutilização do biocatalisador e a possibilidade de utilizar esses biocatalisadores em diferentes tipos de biorreatores, sem que ocorra o arraste proteico durante uma reação enzimática.

Existem diversos tipos de imobilização, classificados segundo o tipo de ligação e interação estabelecida com o suporte, conforme pode-se observar na figura 8.

Figura 8 — Métodos gerais de imobilização do biocatalisador: 1-Adsorção física; 2-Ligação covalente: A- Derivados monoméricos multipontual, B- Derivado monomérico unipontual, C- Derivado bimolecular multipontual (o círculo preenchido de amarelo representa o sítio ativo); 3-Cross-Linking; 4- Entrelaçamento em matriz polimérica; 5- Encapsulamento em gel; 6- Ligação metálica, 7-Ligação por pontes dissulfeto, 8-9: Reator de membrana- 8- Enzima imobilizada na camada externa da membrana (item 8- modificado a partir de LAU et al. 2010); 9- Membrana contém biocatalisadores imobilizados em seu interior (item 9-modificado a partir de NAGY, 2012).



Fonte: MANOEL, *et al.*, 2004.

A imobilização por encapsulação pode ser dividida em membrana ou matriz; na primeira, a enzima encontra-se fisicamente separada por uma membrana semipermeável, similar ao modelo biológico que conhecemos, podendo ainda estar encapsulada (caso em que a enzima permanece dentro de microcápsulas) ou confinadas entre membranas em uma determinada região da solução. Já no encapsulamento por matriz, a enzima é aprisionada em malhas de um polímero geliforme. Dentre essas formas de imobilização, a mais utilizada é a microencapsulação em polímeros insolúveis (poli-óxido de etileno, poli-álcool vinílico, quitosana, entre outros), formando filmes, ou microcápsulas. Essa técnica é muito utilizada porque a enzima não está quimicamente ligada ao polímero, preservando, assim, as propriedades da enzima (Souza *et al.* 2012).

Na técnica de imobilização por ligação covalente, como o próprio nome diz, a enzima está covalentemente ligada ao suporte, ou ainda por ligações cruzadas entre grupos presentes no biocatalisador com grupos reativos do suporte. Ao utilizar esse

método pode existir perda da atividade catalítica da enzima de forma irreversível, visto que esse tipo de metodologia não permite a dessorção proteica e recuperação do suporte. No caso da imobilização covalente por ligação cruzada, a formação de várias ligações covalentes entre grupos reativos da enzima e grupos ativos do suporte. Para obter um derivado estável usando essa técnica é preciso escolher um suporte morfologicamente adequado. Diferentes materiais são utilizados nesse processo, como biopolímeros, polímeros sintéticos, nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas e poliméricas (Dizge *et al.* 2008).

Dentre os métodos de imobilização, a técnica por adsorção das enzimas ao suporte é a mais utilizada, por ser de fácil aplicabilidade, baixo custo e poucos efeitos prejudiciais para a atividade e seletividade das enzimas. As imobilizações por adsorção são efetuadas com fracas ligações, de baixa energia, como as interações de van der Waals e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas. (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Ocorrem por um contato da enzima em tampão com o suporte, ou pela precipitação da enzima em solventes presentes na superfície do suporte. As interações são beneficiadas pela utilização de uma baixa força iônica. (MENONCIN *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2013)

Não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas e suas várias aplicações. Isso se deve às diferentes características físico-químicas de cada enzima, às diferentes propriedades dos substratos e produtos e às diversificadas aplicações dos produtos obtidos. Além disso, todos os métodos apresentam vantagens e limitações. A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como: atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas, características finais desejadas para a enzima imobilizada etc.

(REIS *et al.*, 2019)

2.4.1 Suportes para imobilização de enzimas

As lipases podem ser imobilizadas em diversos tipos de suportes, que se classificam em orgânicos e inorgânicos, e apresentam variações em termos de porosidade, tamanho de partícula, tamanho de poro, bem como características

hidrofóbicas ou hidrofílicas, entre outras propriedades. Na Tabela 2, é apresentada a classificação dos suportes conforme sua composição.

Tabela 2 — Classificação dos suportes de acordo com a composição.

Suportes				
Orgânicos			Inorgânicos	
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Polissacarídeos	Proteína	Poliestireno	Sílica	Vidro
Celulose	Colágeno	Polipropileno	Bentonila	Cerâmica
Agarose	Albumina	Nylon	Diatomita	Alumina
Agar	Gelatina	Polivinílicos		Óxidos de Ferro
Quitosana		Poliacrilatos		Óxidos de Níquel
Amido		Poliamidas		
		Polissulfonas		

Fonte: GALVÃO, 2004.

Os suportes inorgânicos são considerados excelentes suportes para a imobilização de enzimas e apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos, como: elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de microrganismos, sendo, assim, fácil sua regeneração por processo de pirólise. Além disso, materiais inorgânicos não apresentam modificação na estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH (MALCATA *et al.*, 1990; FONSECA *et al.*, 1993). Os suportes orgânicos, por outro lado — que podem ser naturais ou sintéticos, como carboidratos, albumina, gelatina e quitosana — são caracterizados por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e considerados não tóxicos. (SHELDON *et al.*, 2011).

O nióbio e seus compostos têm diversas aplicações na área de catálise. O óxido de nióbio, especificamente, é o óxido metálico mais ácido e pode ser usado como suporte de catalisador. O pentóxido de nióbio (NbO) pode desempenhar um papel especial na decomposição dos óxidos de nitrogênio, podendo substituir parcialmente o pentóxido de vanádio em misturas com dióxido de titânio. O óxido de nióbio é altamente aplicado, proporcionando aumento da atividade, seletividade, durabilidade e até resistência mecânica. (SERAFIM *et al.*, 1994).

Como relatou Miranda (2004), mediante a imobilização da lipase de *Candida rugosa* em óxido de nióbio conclui-se que o peróxido de nióbio apresenta uma

afinidade por proteínas, podendo ser utilizado como matriz de imobilização da enzima lipase.

A escolha adequada do suporte torna-se fundamental para alcançar o desempenho ideal da enzima imobilizada, maximizando os benefícios econômicos e ambientais dessa abordagem tecnológica além de ser capaz de proporcionar estabilidade física, química e biológica durante todo o processo de imobilização.

(WANG *et al.*, 2021; SHELDON *et al.*, 2011)

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar e analisar a eficiência de óxidos de nióbio como catalisadores quimio-enzimático, bem como suportes na imobilização de lipases formando biocatalisadores para reações de hidrólise e esterificação.

3.1 Objetivos específicos

1. Imobilizar a Lipase *Thermomyces lanuginosus* nos dois suportes Nb_2O_5 Nb_2O_5 (NbO) e $Nb_2O_5 \cdot nH_2O$ (NbNH);
2. Realizar cinética de imobilização com a enzima estudada, em suportes feitos de nióbio “NbO e NbNH”, analisando os rendimentos de imobilização e atividade recuperada;
3. Caracterizar os novos biocatalisadores com relação à estabilidade em diferentes pHs (4-9), temperaturas (30-60°C) e ao uso de diferentes solventes orgânicos;
4. Determinar pH e temperatura ótimos dos novos biocatalisadores e comparar com a enzima livre;
5. Verificar a atividade hidrolítica dos biocatalisadores obtidos utilizando o *p*-nitrofenil laurato e *p*-nitrofenil butirato como substratos através de técnicas de espectrofotometria;
6. Avaliar o efeito de diferentes molaridades de tampão (5 mM, 25 mM, 50 mM, 125 mM, 250 mM, 1000 mM) na atividade enzimática da TLL livre e TLL imobilizada;
7. Avaliar a interferência do pH no processo de imobilização.
8. Avaliar as características do suporte por MEV.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Realização

Os experimentos de imobilização da lipase foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Microbiana de Fármacos (LaBimFar) na UFRJ.

4.1.1 Enzimas

Como biocatalisadores, foram utilizadas as lipases comerciais de *Thermomyces lanuginosus* em solução (conhecida comercialmente como LipozymeTL®) e na forma imobilizada (Lipozyme TL-IM), ambas obtidas da Novozymes Latin America Ltda.

4.1.2 Suporte para imobilização

Suporte chamados “NbO” e “NbNH” compostos por tipos de Óxidos de Nióbio e sintetizados e adquiridos a partir da CBMM e o suporte comercial Accurel® MP 1000.

4.1.3 Preparação do suporte utilizado na imobilização

Antes da imobilização, o suporte hidrofóbico Accurel® MP 1000 foi lavado com etanol e posteriormente com água destilada. Este tratamento é feito para eliminar ar de dentro dos poros do suporte para facilitar a penetração da solução enzimática no interior das partículas durante a imobilização enzimática. Assim, 10 mL de etanol foi adicionado a 1 g de suporte Accurel® MP 1000 seco. Após 30 minutos, o etanol foi removido e foram adicionados 10 mL de água destilada. Uma filtração (empregando-se papel de filtro fornecido pela Qualy, gramatura 80, com poros de diâmetro igual a 14 µm) foi realizada depois de 10 min, fazendo-se a lavagem das partículas com água destilada abundante, para remoção do etanol. Por fim, o suporte foi lavado com tampão fosfato de sódio (5 mM, pH = 7,0) e mantidos a 17 °C até a realização do procedimento de imobilização. Não foi realizado nenhum pré-tratamento para os suportes de nióbio, antes do processo de imobilização.

4.1.4 Imobilização por Adsorção Física

O procedimento de imobilização por adsorção física, empregado no presente trabalho, foi realizado a partir da imobilização da enzima TLL em três diferentes suportes (Accurel®, NbO, NbNH). As imobilizações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 pois foi percebido que a velocidade de imobilização de lipases é máxima em meios sujeitos à baixa molaridade frente às demais proteínas de um extrato enzimático (FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 1998). Este método tenta quebrar possíveis dímeros ou estruturas oligoméricas que possam estar em solução, isso é feito com a intenção de obter a lipase na sua forma aberta e monomérica (MANOEL *et al.*, 2015a).

O processo de imobilização foi iniciado a partir da adição de 10 mL de solução lipásica a 1 g de Accurel lavado com etanol e seco no caso dos suportes de nióbio. A imobilização era conduzida por 24 horas, sob agitação suave (agitação orbital, formato de roldanas, marca Movil-Rod. cuja velocidade era de aproximadamente 36 rpm), a 4 °C, na geladeira (figura 9). O processo de imobilização da enzima foi acompanhado ao longo do tempo (0, 3, 6, 8, 12, 23, 24 h), alíquotas de 100 µL eram coletadas para dosagem de atividade hidrolítica do sobrenadante (enzima presente na fase aquosa, não adsorvida ao suporte). Foi utilizado o *p*-nitrofenil laurato (*p*-NFL), como substrato.

Finalmente, os biocatalisadores (TLL-NbO, TLL-NbNH e TLL- Accurel) obtidos ao final das 24 horas foram lavados com água destilada (para remoção das enzimas presentes na superfície e que não foram adsorvidas), filtrados (empregando papel de filtro Nalgon, gramatura 80, com porosidade de 3 µm), secos em dessecadores e armazenados na geladeira (4 °C).

Figura 9 — Processo de imobilização. 36 rpm a 4 °C.



Fonte: o autor, 2023.

4.1.5 Atividade hidrolítica durante o processo de imobilização

O acompanhamento do processo de imobilização foi realizado ao longo do tempo pela atividade hidrolítica da solução lipásica, isto é, corresponde ao sobrenadante do meio reacional, que foi feita de acordo com o protocolo apresentado por Godoy e colaboradores, (2009). Para o procedimento de alíquotagem no sobrenadante quando a imobilização foi feita utilizando os suportes de nióbio, a amostra foi centrifugada e a alíquota retirada do sobrenadante (ausência de suportes). A dosagem da atividade foi realizada utilizando uma cubeta de quartzo, a qual foi acrescido 2,7 mL de tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7; 0,25 mL de substrato, no caso *p*-NFL e 0,05mL de amostra (retirada do sobrenadante supradescrito), totalizando 3,0 mL. Para a análise utilizando Accurel, não foi necessário sistema de centrifugação, uma vez que o suporte possui baixa densidade e altamente hidrofóbico, sendo rapidamente separado da solução. As reações foram iniciadas com a adição ao meio reacional da amostra enzimática. O comprimento de onda utilizado foi de 412 nm e a leitura foi realizada em 30°C. O cálculo de atividade hidrolítica para cada alíquota foi realizado de acordo com a equação 2:

$$F_{ap} = 1 / \text{Coef.}A \quad \text{equação 1}$$

$$U = \text{Coef.}A \times V_f \times F_{ap} \times F_d / V_{enz} \quad \text{equação 2}$$

U = Atividade enzimática

Coef.A = Coeficiente angular

Vf = Volume final

Fap = Fator do espectrofotômetro

Fd = fator de diluição

4.1.5 Atividade hidrolítica dos imobilizados e suporte

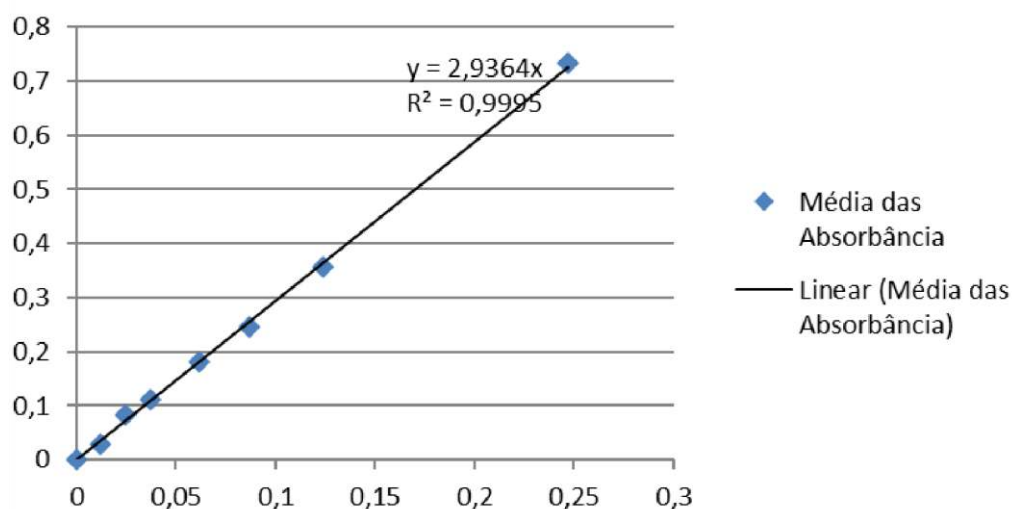
Para realizar os procedimentos de determinação da atividade hidrolítica foram feitas previamente curvas de calibração, por espectrofotometria, de soluções padrões de *p*-nitrofenol preparadas em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0) a 348 nm e 412 nm. Esses padrões corresponderam às concentrações apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 — Concentrações do padrão em diferentes proporções da solução de *p*-nitrofenol em acetonitrila e da solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7.

<i>p</i>-nitrofenol em acetonitrila (μL)	Tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7 (μL)	[<i>p</i>-nitrofenol] no tubo (mM)
0	2500	0
5	2,495	0,0124
10	2,490	0,0247
15	2,485	0,0371
25	2,475	0,0618
35	2,465	0,0866
50	2,450	0,1236

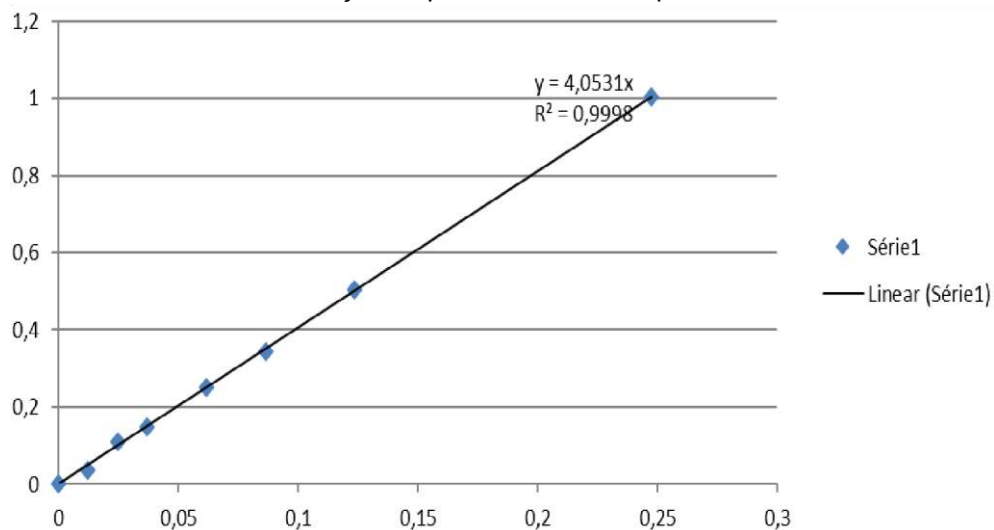
Fonte: o autor, 2023.

Gráfico 1 — Curva de calibração do *p*-nitrofenol no comprimento de onda 348 nm.



Fonte: o autor, 2023.

Gráfico 2 — Curva de calibração do *p*-nitrofenol no comprimento de onda 412 nm.



Fonte: o autor, 2023.

As curvas de calibração obtidas para cada comprimento de onda estão nos gráficos 1 e 2. O coeficiente angular obtido pela equação da reta da curva de calibração em cada comprimento de onda é utilizado para calcular o fator de correlação, no espectrofotômetro (Jasco V-730Bio) para uso na reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato (412 nm) e do *p*-nitrofenil butirato (348 nm).

Em seguida, os biocatalisadores TL-IM, TLL-NbO, TLL-NbNH e TLL-Accurel e os suportes NbO e NbNH (controles) foram avaliados em relação à sua atividade hidrolítica. A análise foi composta por triplicatas de reação em reatores em batelada. O meio reacional foi composto por 5 mL de tampão fosfato de sódio 25mM e pH 7; 0,25 mL de substrato (*p*-NFL e *p*-NFB), totalizando 5,25 mL; 15 mg de imobilizado.

As reações foram iniciadas pela adição dos respectivos substratos após a verificação da linha de base. As medições ocorreram a 30°C nos comprimentos de onda de 412nm quando usado o *p*-NFL e 348nm quando usou o *p*-NFB. O cálculo da atividade hidrolítica para os derivados foi realizado segundo a equação 3.

O acompanhamento da reação foi feito ao longo do tempo para determinação da atividade hidrolítica, a fim de determinar a tangente da região linear. Uma unidade internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 µmol de *p*-nitrofenol (produto) por minuto nas condições de ensaio.

$$U = \text{Coef.}A \times V_f \times F_{ap} \times F_d / M_{bioc} \quad \text{equação 3}$$

M_{bioc} = massa do biocatalizador

4.1.6 Cálculo dos parâmetros de imobilização

Para acompanhar o processo de imobilização, realizou-se a determinação da atividade hidrolítica do sobrenadante conforme descrito no item 4.1.4 e dos derivados a partir da hidrólise de *p*-NFL e ao longo da imobilização a quantidade de proteína ainda presente na forma solúvel (sobrenadante) foi analisada. Vale ressaltar que o espectrofotômetro utilizado foi o da empresa Jasco, modelo V730Bio acoplado a um banho de aquecimento com recirculação e controle de temperatura (fornecido pela empresa Ética, modelo 521-2D) utilizado para manter a temperatura do sistema em 30 °C, temperatura em que foram realizadas as dosagens de atividade hidrolítica.

A Eficiência de Imobilização foi calculada pela equação 4:

$$E_{imo} = U_{Te}/U_c \times 100 \quad \text{equação 4}$$

O rendimento de imobilização (η) foi definido como a relação percentual entre atividade hidrolítica no início e ao final da imobilização, calculado pela equação 2.

$$\eta(\%) = U_{imo} / U_c \times 100 \quad \text{equação 5}$$

Onde:

E_{imo} = Eficiência de Imobilização;

U_c = Total de unidade de atividade enzimática contida em solução antes da imobilização (U/g suporte);

U_s = Total de unidades de atividade enzimática contida em solução após a imobilização (U/g suporte);

U_{Te} = atividade inicial (U_c) – atividade final do sobrenadante (U_s);

Onde U_{imo} são as unidades de enzima medida após a imobilização (U/g de suporte); U_c são as unidades totais de enzima que são colocadas na etapa de imobilização, no sobrenadante (U/mL); U_s são as unidades de enzima do sobrenadante, que não reagiram com o suporte e que saíram nas primeiras lavagens (U/mL); e U_{Te} são as unidades de enzima teoricamente imobilizada ($U_c - U_s$)/g suporte.

4.1.7 Determinação da concentração de proteína

O método de Bradford foi empregado (BRADFORD, 1976). O ensaio de proteína colorimétrico, é baseado em uma mudança de absorvância do corante azul brilhante de Coomassie G-250 quando em contato com a solução proteica. primeiramente, foi realizada uma curva de calibração, usando como padrão a albumina de soro bovino (BSA) no comprimento de onda $\lambda=595$ nm (apresentada no Anexo A), sendo possível a determinação do fator de calibração k. Para isso, foi utilizado um espectrofotômetro para microplaca (Thermo Scientific, modelo Multiskan Go). Em seguida, as alíquotas coletadas ao longo da imobilização foram analisadas.

Para a dosagem da concentração de proteína, foi realizada a mistura de 250 μ L da solução de Bradford e 5 μ L de cada amostra em uma microplaca de acrílico. Esta placa foi conduzida no espectrofotômetro, onde as leituras eram realizadas no $\lambda=595$ nm. Cada alíquota foi analisada em triplicata. A concentração de proteína foi calculada com relação à quantidade de proteína no início e no final da imobilização (ΔP).

4.1.8 Determinação da atividade de esterificação dos derivados imobilizados

A atividade de esterificação da enzima imobilizada foi determinada indiretamente pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação com etanol na razão molar de ácido: álcool de 1:1. A reação foi conduzida à temperatura de 40°C, utilizando-se 3% (m/m) de enzima imobilizada, sob agitação constante (CUNHA, 2011). A reação foi iniciada pela adição do derivado ao meio reacional, em um reator fechado provido de agitação magnética. Alíquotas de 100 µL foram retiradas do meio reacional (volume reacional de 5 mL), em triplicata, no tempo zero e em tempos de reação determinados, até um limite máximo de conversão de ácido oleico de 10%, a fim de garantir que a reação estivesse em velocidade inicial. 40 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) foram adicionados à amostra para interromper a reação. A quantidade de ácido consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,04 mol L⁻¹ em titulador automático Mettler-Toledo acoplado a pHmetro. Uma unidade de atividade enzimática de esterificação (UE) foi definida como a quantidade de enzima que esterifica 1,0 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada segundo a equação 3.

$$AE = (V_a - V_b) \cdot 1000 \cdot M \cdot V_{final} / T \cdot V_e \cdot X_m \quad \text{Equação 6}$$

Onde AE = atividade de esterificação (µmol/ min. gsuporte ou UE/gsuporte);

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após o tempo t (mL);

M = concentração da solução de NaOH (mmol/mL);

V_{final} = volume final de meio reacional (mL);

X_m = massa da enzima imobilizada utilizada na reação (g);

V_e = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL);

t = tempo (minutos).

4.2 Caracterização bioquímica dos derivados imobilizados

A caracterização bioquímica da TLL imobilizada nos suportes de nióbio (TLL-NbO e TLL-NbNH) testados foi realizada através da determinação da atividade lipídica em diferentes valores de pH, temperatura, molaridade e diferentes solventes.

4.1.5 Efeitos da temperatura na atividade enzimática dos biocatalisadores e suporte

Os aumentos moderados de temperatura geralmente aumentam a atividade enzimática, pois as reações químicas ocorrem mais rapidamente. No entanto, temperaturas muito altas podem causar desnaturação e perda de atividade enzimática. Deste modo, é importante encontrar um equilíbrio para otimizar a atividade enzimática da TLL imobilizada, considerando a faixa de temperatura ideal para sua estabilidade e eficiência.

Para determinar o efeito da temperatura na atividade lipásica (atividade hidrolítica) foi conduzido a análise em diferentes temperaturas e para determinar a estabilidade da atividade a enzima foi encubada em diferentes temperaturas onde foram coletadas alíquotas em diferentes tempos que foram utilizadas em ensaios de hidrólise assim como descrito em 4.5.1. A atividade enzimática foi determinada conduzindo a reação de hidrólise do *p*-NFL, catalisada pelos derivados imobilizados obtidos, nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C e 60 °C, em tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7,0. O efeito da temperatura também foi avaliado na atividade da TLL em solução, da Lipozyme TLL-IM e dos suportes NbO e NbNH, nas mesmas condições apresentadas. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

4.2.2 Efeito da molaridade do tampão fosfato de sódio sobre a atividade da enzima

Em seguida, foi determinado o efeito da molaridade do tampão fosfato de sódio sobre a atividade da enzima. A atividade enzimática foi analisada em triplicata, seguindo o protocolo descrito no Item 4.1.6. O tampão utilizado foi o fosfato de sódio em concentrações molares de 5 mM, 25 mM, 50 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM, 1000 mM.

4.2.3 Efeitos da adição de diferentes solventes na atividade hidrolítica

Foram feitas soluções de 10 mL em proporções de 0, 10, 20, 30 e 40% de solventes (acetona, etanol e DMSO), essas proporções foram posteriormente adicionadas, 2,90 mL, em cubetas contendo 2 mg do biocatalisador. Para medir a atividade, uma cubeta foi introduzida no espectrofotômetro à 412 nm, com 50 µL de *p*-NFL como substrato.

4.2.4 Efeitos de diferentes pH na atividade hidrolítica

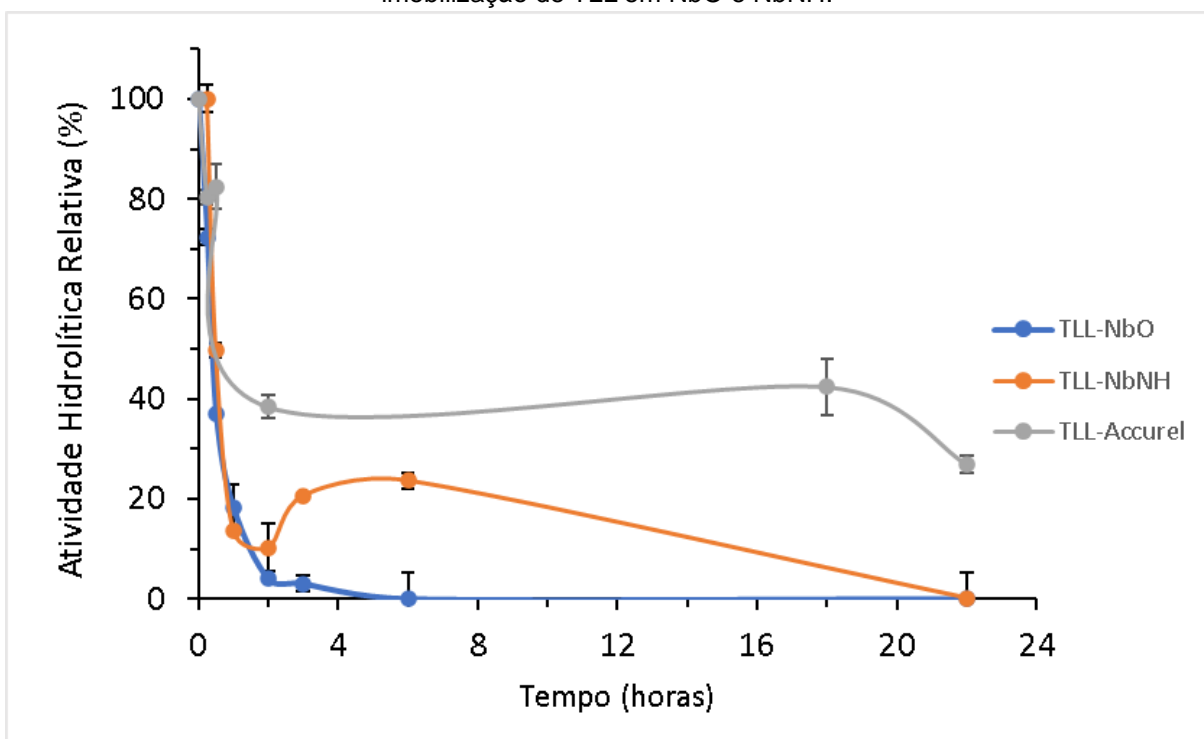
Para determinar o efeito do pH na atividade lipásica (atividade hidrolítica) foi conduzido a análise em diferentes pH e para determinar a estabilidade da atividade a enzima foi encubada em diferentes pH onde foram coletadas alíquotas em diferentes tempos que foram utilizadas em ensaios de hidrólise assim como descrito em 4.5.1. O ensaio seguiu os procedimentos descritos de Godoy e colaboradores (2009), com a troca do tampão de reação fosfato de sódio 25mM para acetato de sódio 50mM, em pH ácido (pH 5,0); também foi usado o carbonato-bicarbonato 50mM, com o intuito de avaliar pH básico (pH 9,2). A TLL em solução, TLL-NbO, TLL-NbNH e os suportes puros NbO e NbNH foram avaliadas nas mesmas condições apresentadas. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processo de imobilização de TLL em diferentes suportes

O processo de imobilização de TLL utilizando os suportes NbO, NbNH e Accurel foi realizado com o acompanhamento da atividade hidrolítica do sobrenadante ao longo do tempo. Os resultados podem ser visualizados na Figura 10.

Figura 10. Representação gráfica da atividade hidrolítica relativa por tempo durante o processo de imobilização de TLL em NbO e NbNH.



Fonte: o autor, 2023.

Os resultados experimentais demonstraram que teoricamente houve adsorção enzimática nos suportes de nióbio estudados a (NbO, NbNH e Accurel). Após um período de contato entre enzima-suporte de aproximadamente 3 horas, houve de 90% para TLL-NbO e TLL-NbNH, enquanto no mesmo tempo houve aproximadamente 60% para TLL-Accurel. O comportamento de adsorção sugere perfis semelhantes de adsorção teórica, entre os suportes de nióbio, tendo o suporte TLL-NbO apresentado melhores resultados.

Dentro de apenas 1 hora, alcançou-se uma eficiência de imobilização de aproximadamente 80%, aumentando para cerca de 97% após um período de 3 horas em TLL-NbO. A distinção entre os resultados dos diferentes suportes enfatiza a variabilidade de influência dos suportes no processo de imobilização enzimática, reforçando a importância de avaliações criteriosas das características físico-químicas dos suportes escolhidos.

As propriedades físico-químicas do suporte desempenham um papel crucial na interação enzima-suporte e em sua atividade catalítica. Fatores como tamanho do poro, área superficial e carga proteica, são uns dos fatores que influenciam essa interação.

Analisando a influência do substrato para os novos biocatalisadores produzidos, TLL-NbO apresentou maior atividade quando *p*-nitrofenil laurato foi utilizado ($539,35 \pm 5,98$ U/g), enquanto para *p*-nitrofenil butirato a atividade foi menor ($360,22 \pm 16,40$ U/g). Similarmente, o TLL-NbNH demonstrou atividades ainda mais elevadas ($912,728 \pm 7,65$ U/g e $310,22 \pm$ U/g), para os substratos supradescritos, respectivamente, sugerindo maior afinidade dos biocatalisadores produzidos frente à substratos de cadeias maiores (C12 versus C4, respectivamente)

Para uma avaliação abrangente do comportamento dos novos biocatalisadores, também foram examinadas as atividades dos suportes isolados, uma vez que quimicamente estes possuem características de catalisadores químicos. O suporte NbO e NbNH exibiram atividades de $107,89 \pm 0,42$ U/g e $160,41 \pm 9,24$ U/g com *p*-nitrofenil laurato, respectivamente. Esses resultados sugerem que a interação com a proteína de *Thermomyces lanuginosa* aumentou em 5 vezes a atividade em NbO e 5,7 vezes em estudos com NbNH, favorecendo a reação hidrolítica e reforçando o potencial químico enzimático dos biocatalisadores propostos. Os resultados ainda mostraram que a adsorção teórica menor para TLL-NbNH não impactou a atividade do biocatalisador quando comparado com TLL-NbO. A lipase comercial TL-IM foi igualmente estudada apresentando $10,89 \pm 0,56$ U/g e $16,41 \pm 0,87$ U/g para os substratos *p*-nitrofenil laurato e *p*-nitrofenil butirato, respectivamente, enquanto a lipase imobilizada em suporte comercial TLL-Accurel apresentou $25,35 \pm 3,9$ U/g e $24,24 \pm 2,0$ U/g. Essa comparação ressalta o

desempenho diferenciado dos biocatalisadores produzidos neste projeto frente aos biocatalisadores imobilizados comercialmente.

Um resumo das atividades dos biocatalisadores produzidos e versões comerciais pode ser visualizado na tabela 4.

Tabela 4 - Atividade hidrolítica de diferentes biocatalisadores utilizando p-NFL e p-NFB como substrato

Biocatalisador	p-NFL	p-NFB
TLL em solução	76576,00 U/ml ± 554,73	5706,10 U/ml ± 50,24
TLL-NbO	539,35 U/g ± 5,98	360,22U/g ± 16,40
TLL-NbNH	912,73 U/g ± 7,65	310,22U/g ± 10,56
Suporte NbO	107,89 U/g ± 0,42	---
Suporte NbNH	160,41U/g ± 9,24	---
TL-IM	10,89 U/g ± 0,56	16,41 U/g ± 0,87
TLL-Accurel	25,35 U/g ± 3,9	24,25 U/g ± 2,0

Uma unidade de atividade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 µmol de substrato por minuto nas condições de ensaio.

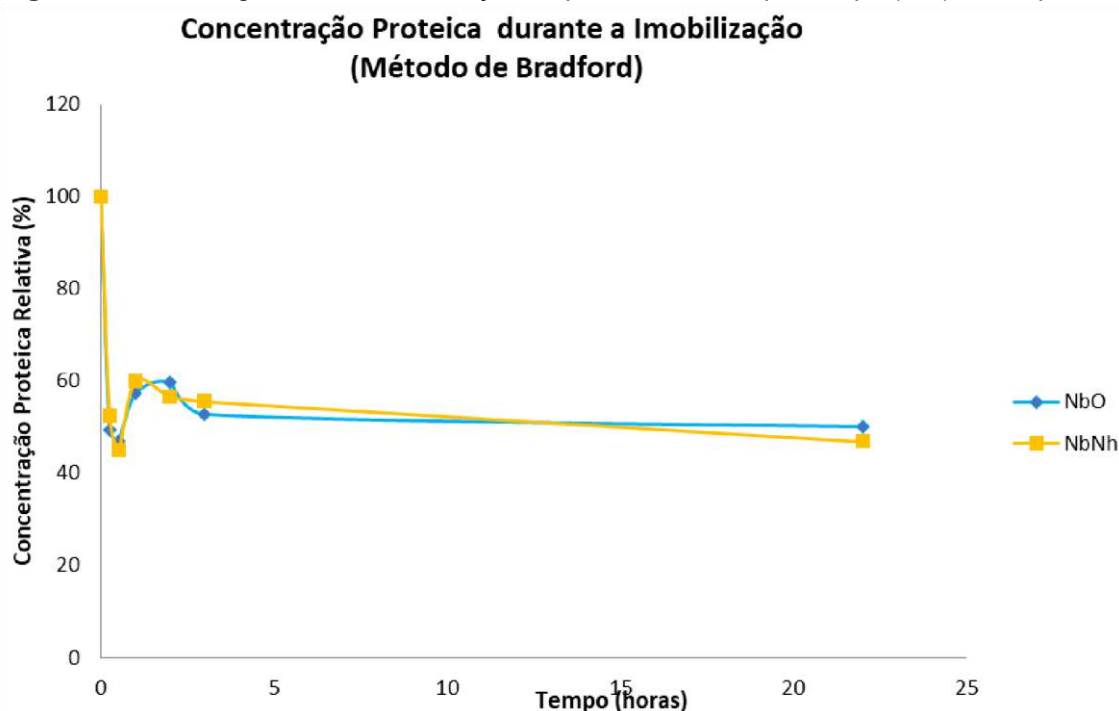
Fonte: o autor, 2023.

Esses resultados enfatizam a complexidade das interações entre os componentes do sistema enzima-substrato-suporte e realçam as potenciais aplicações dos biocatalisadores propostos em diversas aplicações biotecnológicas.

5.2 Dosagem da concentração de proteína

Durante o processo de imobilização, foram realizadas coletas de amostras para análise do teor protéico utilizando espectrofotometria com base no método de Bradford. O biocatalisador TLL-NbO (*Thermomyces lanuginosa* imobilizada em suporte de NbO) obteve um valor de 1466,7 μg de proteína por grama de suporte. Logo, cerca de 47% da proteína foi teoricamente imobilizada (conforme demonstrado no Gráfico 4). Por sua vez, o biocatalisador TLL-NbNH (*Thermomyces lanuginosa* imobilizada em suporte de NbNH), equivalente a 1348,3 μg de proteína por grama de suporte, apresentando 44% de proteína teoricamente imobilizada (conforme ilustrado no Gráfico 5).

Figura 11 - Gráfico gráfica da concentração de proteína relativa por tempo (min) dos suportes.



Fonte: o autor, 2023.

Apesar do extrato da TLL ser comercial, dados anteriores do grupo mostraram não ser uma proteína pura. Para esse projeto, até o momento do fechamento deste TCC, não foi possível realizar uma análise quantitativa de proteína (como análise de SDS page). Todavia, os resultados da adsorção proteica puderam demonstrar que apenas metade das proteínas interagem com o suporte. Em consonância, pesquisas

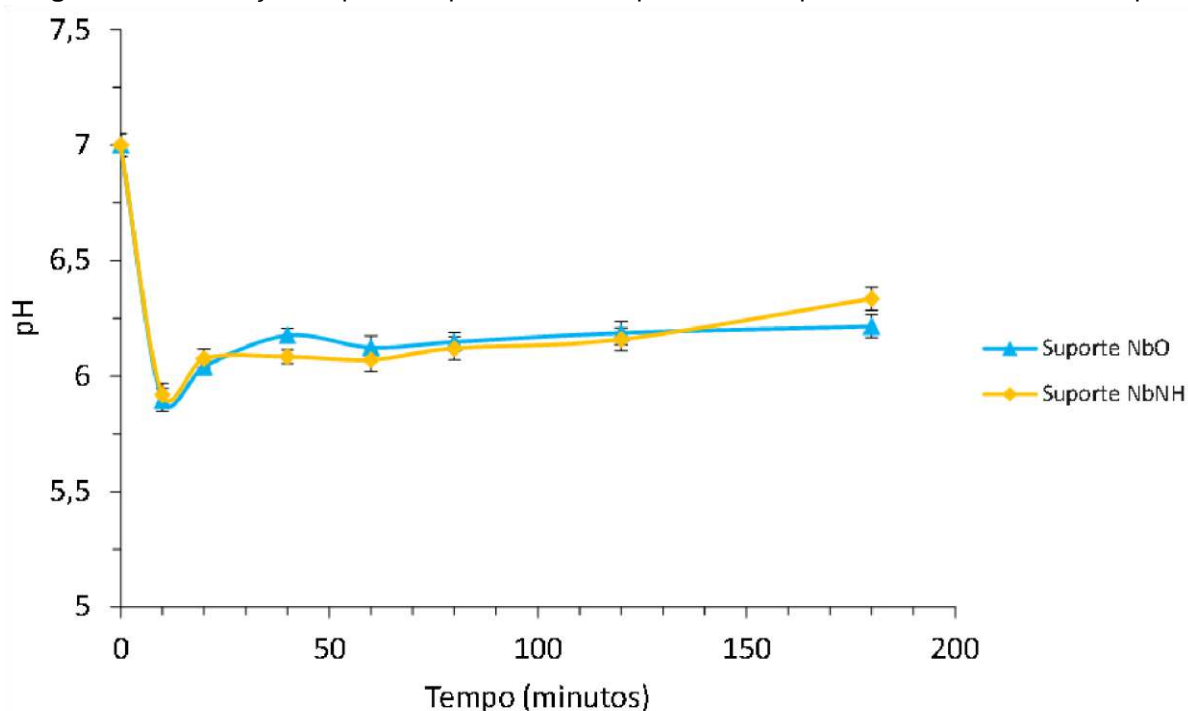
conduzidas por Høge-Jensen, Galluzzo e Jensen (1987) também observaram a falta de pureza proteica em extratos de lipase *Rhizomucor miehei*, mesmo após tentativas prévias de purificação por diversas técnicas cromatográficas. Portanto, à medida que a atividade hidrolítica reflete a capacidade intrínseca da lipase em conduzir reações de hidrólise, a dosagem de proteína quantifica a presença global de proteínas na amostra. Nessa perspectiva, realça-se a importância de adotar uma abordagem integrada das duas técnicas para alcançar uma compreensão mais holística do processo de imobilização.

5.2.1 Aferição de características ácidas do suporte

Assim como foi descrito por Izuka e colaboradores em 1983 e por Nakajima e colaboradores em 2011, os suportes de nióbio podem exibir uma variedade de locais catalíticos em sua superfície, cujas propriedades dependem das etapas de preparação e tratamento prévio. Essa diversidade resulta na formação de sítios ácidos de Brønsted com características de acidez (correspondente a 70% de H_2SO_4), entretanto, também podem estar presentes sítios ácidos de Lewis. Essa combinação de características faz dos óxidos de nióbio um catalisador altamente eficiente em processos nos quais a água pode ser gerada durante a reação ou quando é utilizada como solvente.

Uma vez que esses catalisadores químicos possuem alta acidez, foi realizado um experimento controle da presença do suporte no tampão fosfato (25mM, pH 7) ao longo do tempo, a fim de se observar o efeito em um das soluções tampão mais utilizadas na literatura para imobilização de lipases. Os resultados podem ser visualizados na figura 12.

Figura 12 — Interação no pH do suporte de Nióbio puro com tampão Fosfato 7 durante o tempo.



Fonte: o autor, 2023.

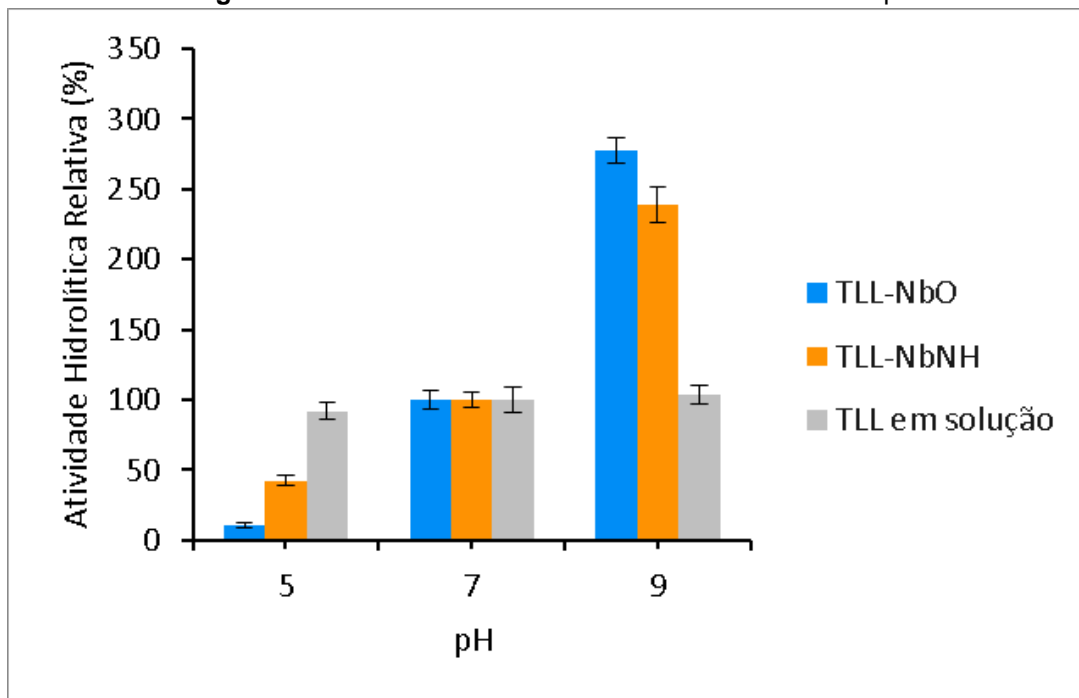
Como pode-se notar, os resultados foram similares para ambos os suportes. Assim que cada suporte é adicionado à solução tampão, há a queda do pH, como esperado, sendo que a solução permanece tamponada em pH 6 após os primeiros 10 minutos de contato.

5.3 Efeitos do pH na atividade enzimática da TLL

Conforme mencionado por Yang e colaboradores (2015), a configuração de enzimas, como as lipases, incluindo seus sítios catalíticos, é determinada por interações iônicas. Portanto, ao ajustar o pH do ambiente, a ionização dos grupos funcionais laterais pode ser modulada, o que pode resultar em modificações na estrutura proteica ou até mesmo em desnaturação.

Sendo assim, foram feitos dois experimentos para estudar o efeito do pH nas diferentes versões das lipases estudadas, em solução ou imobilizadas (Figura 13).

Figura 13 — Ensaio de hidrólise em diferentes valores de pH



Fonte: o autor, 2023.

A figura 13 demonstra que as atividades mais altas se deram no pH 9. Essas medidas foram feitas de forma pontual utilizando soluções tampão de pH 5, 7 e 9. Todavia, os experimentos evidenciaram que há ainda a necessidade de se analisar valores de pH superiores para a tentativa de se conhecer o pH ótimo desses novos biocatalisadores.

Neste gráfico a lipase imobilizada apresentou atividade em todos os valores pH, alcançando atividades mais elevadas na faixa entre 7 a 9. Em pH 7 a TLL- NbO e TLL-NbNH alcançaram valores de $233,0 \pm 13,0$ U/g e $508,5 \pm 60,0$ U/g, respectivamente, e em pH 9 alcançaram valores de $648,0 \pm 17,5$ U/g e $577,3 \pm 28,5$ U/g. A tese de MIRANDA *et al.*, 2004 mediu a atividade da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em Nb_2O_5 . Seus resultados mostraram um perfil de atuação para valores mais próximos da neutralidade (7,0 a 7,5), atingindo sua atividade máxima em pH 7,0. Neste estudo, as atividades em pH 5 também obtiveram resultados parecidos, mostrando uma atividade muito baixa $17,3 \pm 1,3$ U/g para TLL- NbNH, $2,5 \pm 0,17$ U/g para TLL-NbO e no caso do estudo realizado por MIRANDA *et al.*,2004, não obtiveram atividade. Apesar dos trabalhos usarem diferentes lipases,

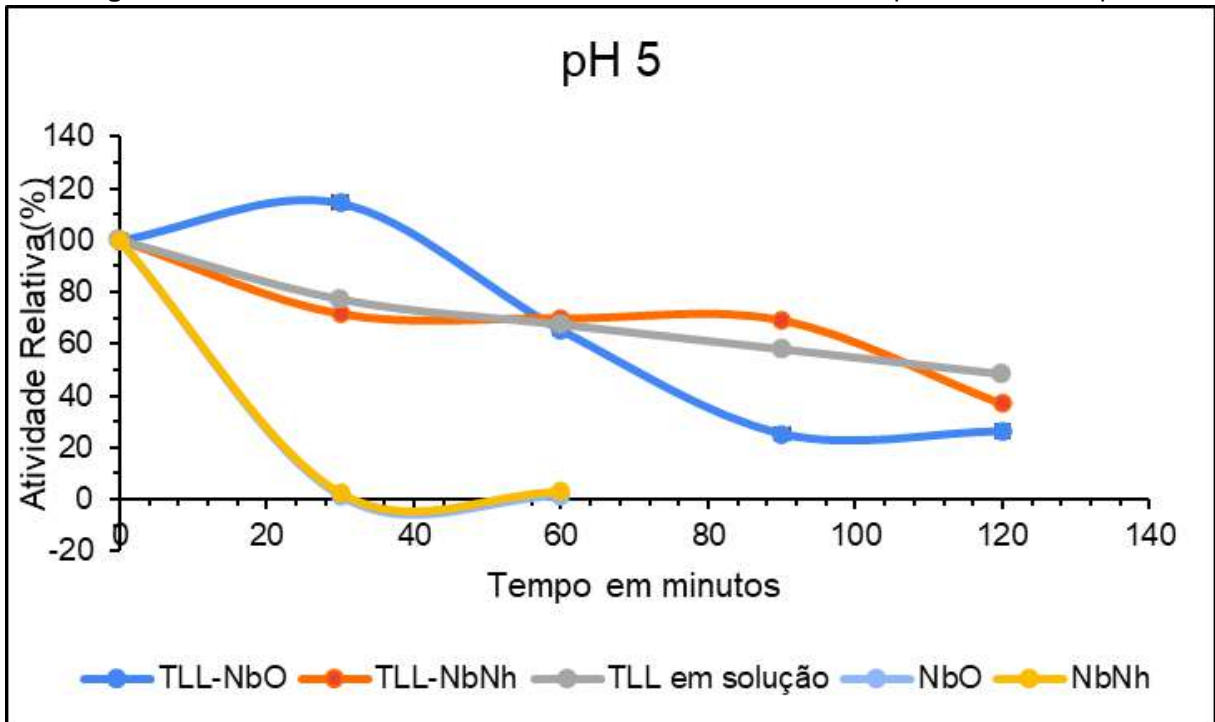
ambos mostraram um perfil parecido quanto à atividade das lipases imobilizadas em diferentes pH.

Em alguns casos, as enzimas imobilizadas exibem características semelhantes às enzimas livres, mas o perfil de pH entre as duas nem sempre coincide. A imobilização pode resultar em mudanças conformacionais, afetar a ionização e dissociação da enzima, bem como as interações eletrostáticas em seu microambiente. Quando o suporte possui carga elétrica, as interações eletrostáticas nas enzimas imobilizadas diferem das em solução, o que pode influenciar o comportamento cinético, mesmo sem efeitos difusos. (HARTMEIER, 1988; SOARES et al., 1999).

Conforme observado por Manoel (2015), a imobilização de enzimas pode conferir estabilidade em face de variações de pH. Ao realizar uma comparação entre a enzima em sua forma livre e a mesma enzima após imobilização, espera-se que a versão imobilizada apresente um perfil mais consistente de atividade enzimática ao longo do tempo de incubação. Isso se deve à maior suscetibilidade da enzima livre a flutuações no pH que podem interferir em sua estrutura tridimensional.

As figuras, 14, 15 e 16 mostram ensaios de estabilidade em diferentes pH ao longo do tempo para a enzima em solução, os suportes e os biocatalisadores imobilizados.

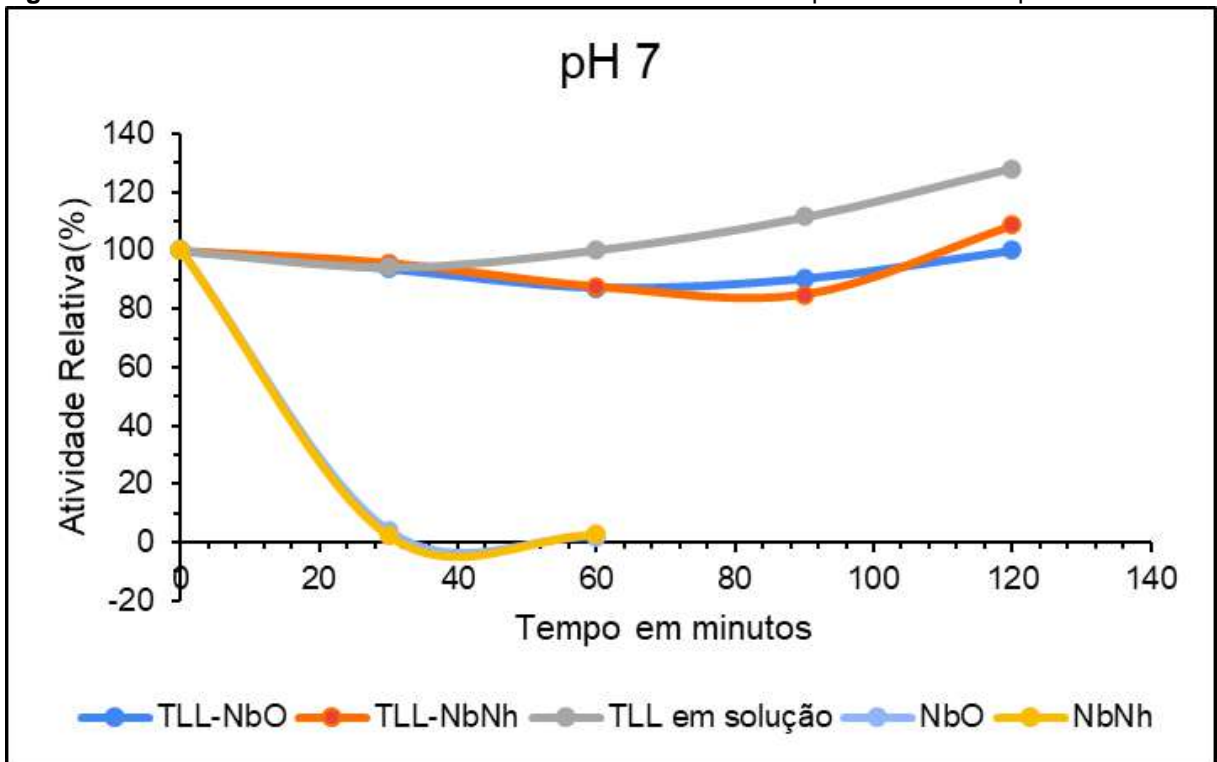
Figura 14 — Ensaio de estabilidade dos biocatalisadores diferentes pH durante o tempo



Fonte: o autor, 2023.

Quando submetemos as amostras a uma solução com baixo pH, notamos que, apesar do potencial inicialmente positivo da TLL-NbO, nenhuma conseguiu manter sua eficácia por um período prolongado nessas condições ácidas. A TLL-NbNh perdeu aproximadamente 30% da sua atividade em 30 minutos, comportamento similar a TLL em solução.

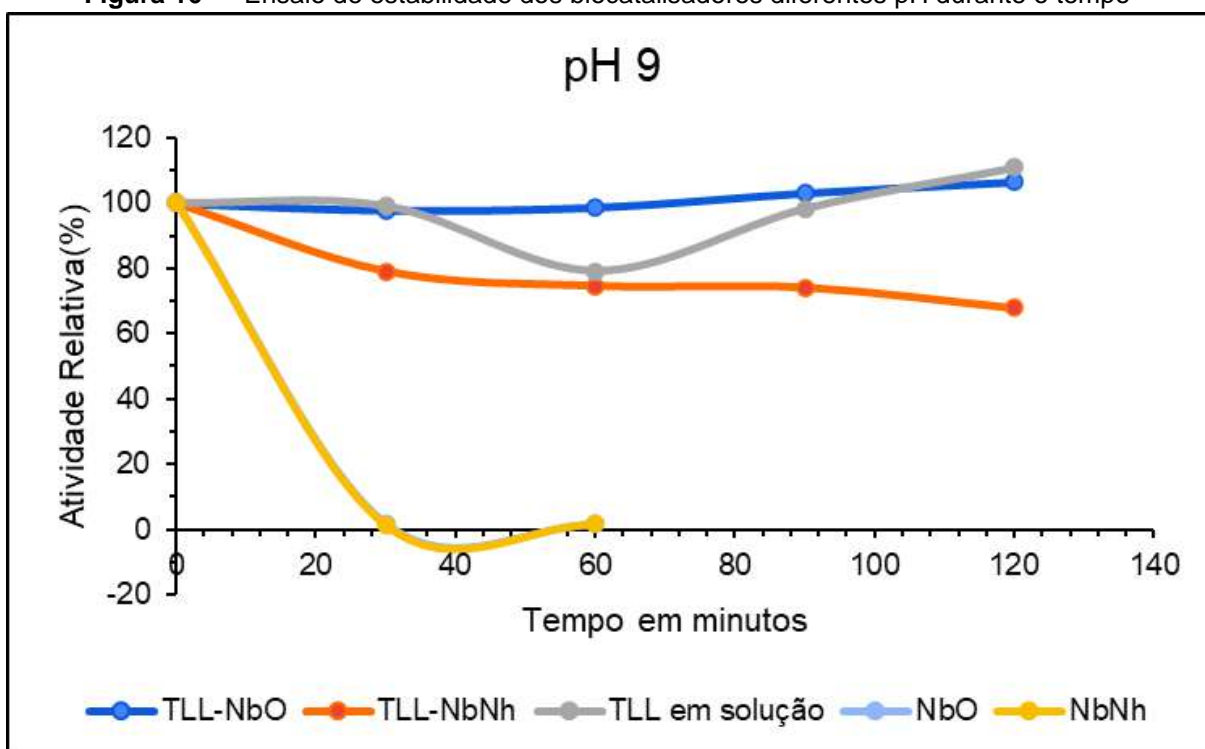
Figura 15 — Ensaio de estabilidade dos biocatalisadores diferentes pH durante o tempo



Fonte: o autor, 2023.

Ainda ao analisar o efeito do pH 7,0, foi evidenciado um perfil similar para os biocatalisadores (TLL-NbO e TLL-NbNH) quando comparados com a TLL em solução.

Figura 16 — Ensaio de estabilidade dos biocatalisadores diferentes pH durante o tempo



Fonte: o autor, 2023

As figuras 14, 15 e 16 ilustram a influência do pH sobre o comportamento do biocatalisador ao longo do tempo. Um aspecto observado quando se compara as respostas da TLL em solução com as dos biocatalisadores imobilizados TLL-NbO e TLL-NbNH, foi observado uma constância geral nas atividades. Entretanto, é importante destacar que, em pH 5, houve uma redução acentuada de 60% na atividade catalítica para a lipase em solução e os biocatalisadores. Em contrapartida, nos pH 7 e 9, foi registrado um aumento na atividade enzimática. Este dado corrobora com diversos trabalhos que indicam uma faixa levemente alcalina como as atividades de trabalho para a TLL (RIBEIRO *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2011). Por mais que ainda não esteja claramente elucidado a interação do suporte com a proteína percebe-se que os biocatalisadores têm uma estabilidade parecida com a TLL em pH 9 e 7.

Essas observações apontam que tanto na TLL quanto os biocatalisadores (TLL-NbO e TLL-NbNh) há uma sensibilidade da enzima em relação ao pH, evidenciando que, sob condições ácidas (pH 5), a atividade catalítica sofre uma diminuição significativa. Isso pode ser atribuído a mudanças na conformação da

enzima ou em sua capacidade de interagir eficazmente com o substrato nesse ambiente ácido. Por outro lado, nos pH neutro (7) é alcalino (9), a atividade enzimática é superior a 100%, demonstrando uma hiperativação nesse ambiente. Essa variação sugere uma possível sensibilidade da enzima em faixas de pH específicas, que pode ser atribuída a mudanças em sua conformação tridimensional ou em seu ambiente microscópico também.

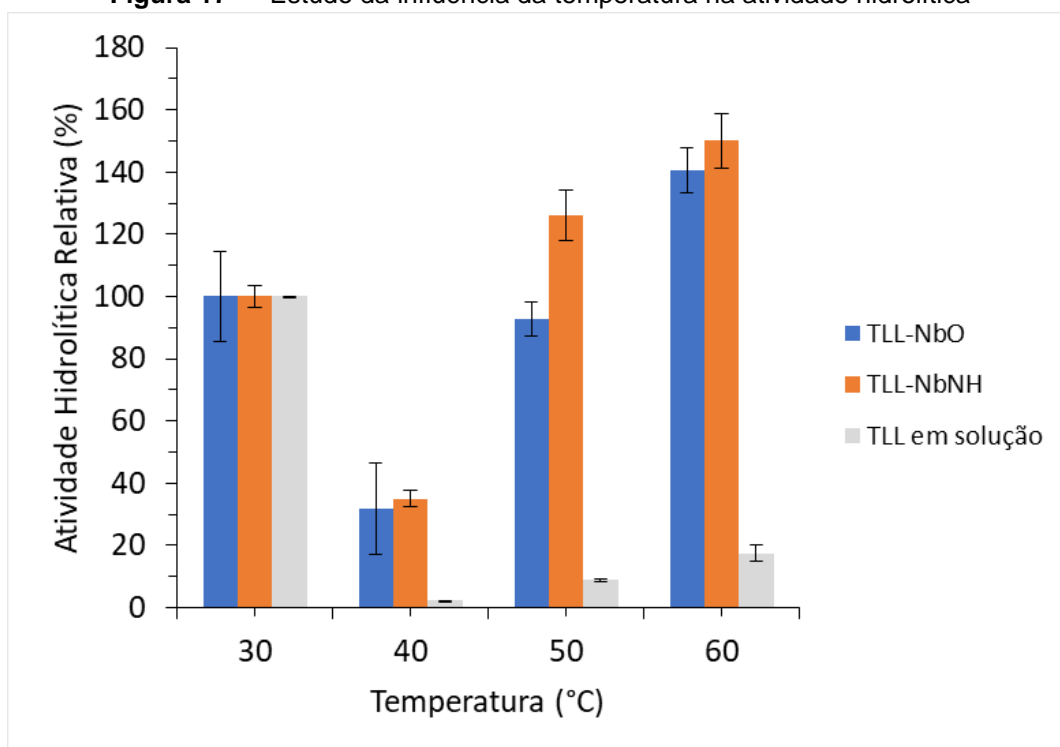
Vale ressaltar que a atividade dos catalisadores químicos (NbO e NbNH) ao longo do tempo chegou a zero para todos os valores de pH estudados, o que demonstra a importância da lipase imobilizada nesses suportes, que conferiu aumento na atividade e estabilidade da atividade. Em outras palavras, os catalisadores químicos (NbO e NbNH) não apresentam atividade, porém ao ser usado como suporte para imobilização de enzima (TLL), foi verificado um perfil completamente diferente, isso mostra que a atividade é influenciada pela presença dessas enzimas imobilizadas.

5.4 Efeitos da temperatura na atividade enzimática da TLL livre e imobilizada

A temperatura é um fator crucial que influencia tanto na atividade quanto na estabilidade da enzima. Nos processos de catálise enzimática, as faixas de temperatura mais frequentemente empregadas situam-se entre 20°C e 70°C, o que representa uma amplitude considerável (GULDHE *et al.*, 2015).

O fungo *Thermomyces lanuginosus* é classificado como um organismo termofílico, o que significa que ele é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperaturas, variando de 20°C a 62°C. A influência da temperatura sobre a atividade da enzima em solução ou imobilizada é, geralmente, representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura. A dependência da temperatura na atividade enzimática foi investigada a atividade de hidrólise em tampão fosfato 25 mM usando *p*-NFL como substrato em uma faixa de temperatura entre 30 a 60 °C na Figura 17.

Figura 17 — Estudo da influência da temperatura na atividade hidrolítica



Fonte: o autor, 2023.

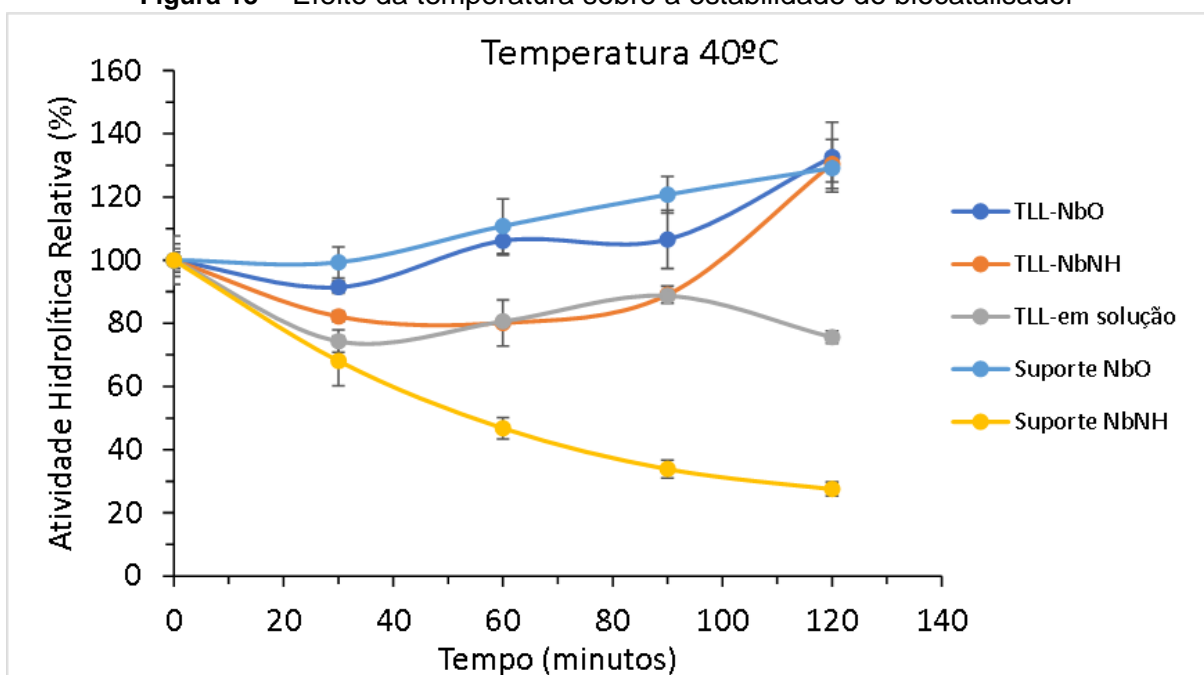
Nota-se que ao medir as atividades o biocatalisador mostrou a maior atividade a temperatura de 60 °C 980 ± 53 U/g e 388 ± 50 U/g para TLL-NbNH e TLL-NbO, respectivamente, enquanto sua atividade mais baixa foi a 40 °C 254 ± 14 U/g e 80 ± 23 U/g para TLL-NbNH e TLL-NbO, respectivamente. Estudos de Martins e colaboradores, em 2013, testaram uma faixa de 30 a 60 °C para síntese de butirato de butila utilizando TL-IM. A temperatura máxima de atividade foi 50 °C. Comparativamente na tese MIRANDA, em 2004 onde ela usou também o Nb_2O_5 como suporte para lipase de *Candida antarctica*, a autora conferiu que a imobilização parece agregar alguma proteção à enzima comparada a em solução. Esses resultados podem demonstrar que a estabilidade da enzima depende diretamente da influência da temperatura (Cavalcanti *et al.*, 2020).

Apesar disso, é importante destacar, que cada sistema de enzima imobilizada apresenta características únicas dependentes de fatores como fonte de enzima, tipo de suporte, método de imobilização e interação da enzima-suporte.

Normalmente, um aumento na temperatura está associado a um aumento na taxa de reação por volume de enzima imobilizada. No entanto, é importante notar que um aumento na temperatura também pode acelerar a desnaturação térmica da

lipase, resultando na diminuição da taxa de produção de produtos. A estabilidade térmica foi avaliada através da atividade de hidrólise. Neste contexto, as amostras foram submetidas a análises de estabilidade em diferentes temperaturas, todas dentro deste do intervalo de 40°C a 60°C por 120 minutos. Os resultados obtidos foram registrados e estão apresentados nas Figuras 18, 19 e 20.

Figura 18— Efeito da temperatura sobre a estabilidade do biocatalisador

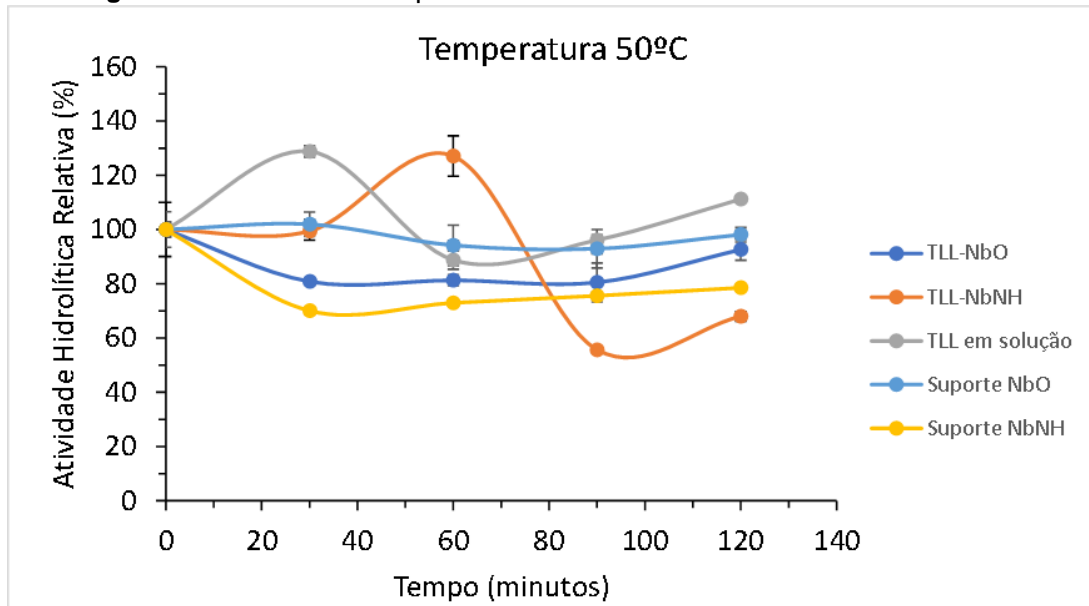


Fonte: o autor, 2023.

Ao serem expostas à temperatura de 40°C (Figura 18), os biocatalisadores hiperativaram, apresentando atividade de hidrólise acima de 100%, mantendo-se estáveis e ativos durante todo o tempo analisado, exceto para a TLL em solução.

Diferente da análise de pH, o suporte NbO, utilizado como controle, apresentou atividade crescente nessa temperatura. Para o suporte NbNH a temperatura apresentou um efeito negativo para esse suporte. Dessa forma, a vantagem da imobilização para TLL-NbNH foi evidenciada mostrando aumento da atividade e hiperativação em 120 min, comparando com a TLL em solução, que apresentou queda de 30% na atividade nas mesmas condições de ensaio. Aparentemente, com esse experimento à 40 oC, não houve diferença na performance entre o suporte NbO (controle) e biocatalisador TLL-NbNH.

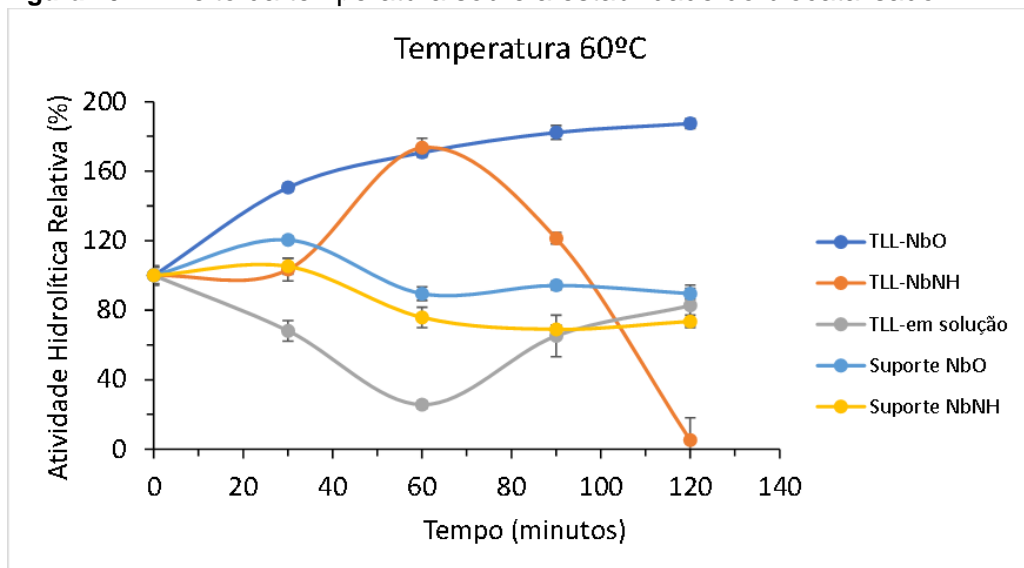
Figura 19 — Efeito da temperatura sobre a estabilidade do biocatalisador



Fonte: o autor, 2023.

Na figura 19, a enzima em solução manteve sua atividade significativamente alta e um decaimento próximo de 60 minutos, mostrando que a temperatura influencia diretamente a sua estabilidade e atividade. TLL-NbO apresentou leve queda nos primeiros 80 min., voltando a estabilidade inicial em 120 min. Analisando TLL-NbNH, este hiperativou por volta dos 60 min e depois teve um decaimento na sua atividade aos 120 min (40%). O suporte NbO se manteve estável nesta temperatura.

Figura 20 — Efeito da temperatura sobre a estabilidade do biocatalisador



Fonte: o autor, 2023.

Na temperatura de 60 °C, a TLL-NbO hiperativou, se manteve estável após o aumento da atividade hidrolítica, diferente do controle (suporte NbO), que demonstrou leve queda.

Comparando TLL-NbO com o controle enzimático (TLL em solução), o processo de imobilização mostrou ser eficiente aumentando a atividade da enzima imobilizada, frente à livre à 60 °C. Para TLL-NbNH, a temperatura mostrou efeito negativo na atividade ao final de 120 min, levando o biocatalisador a perder toda sua atividade e aprimorar ainda mais a estabilidade enzimática pode ter implicações interessantes para ampliar as possíveis aplicações dessas enzimas. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram maior estabilidade à TLL-NbO quando submetidos a temperaturas superiores às condições ambientais, ou seja, a temperaturas de 30°C e 40°C.

5.5 Efeitos de solventes na atividade enzimática da TLL

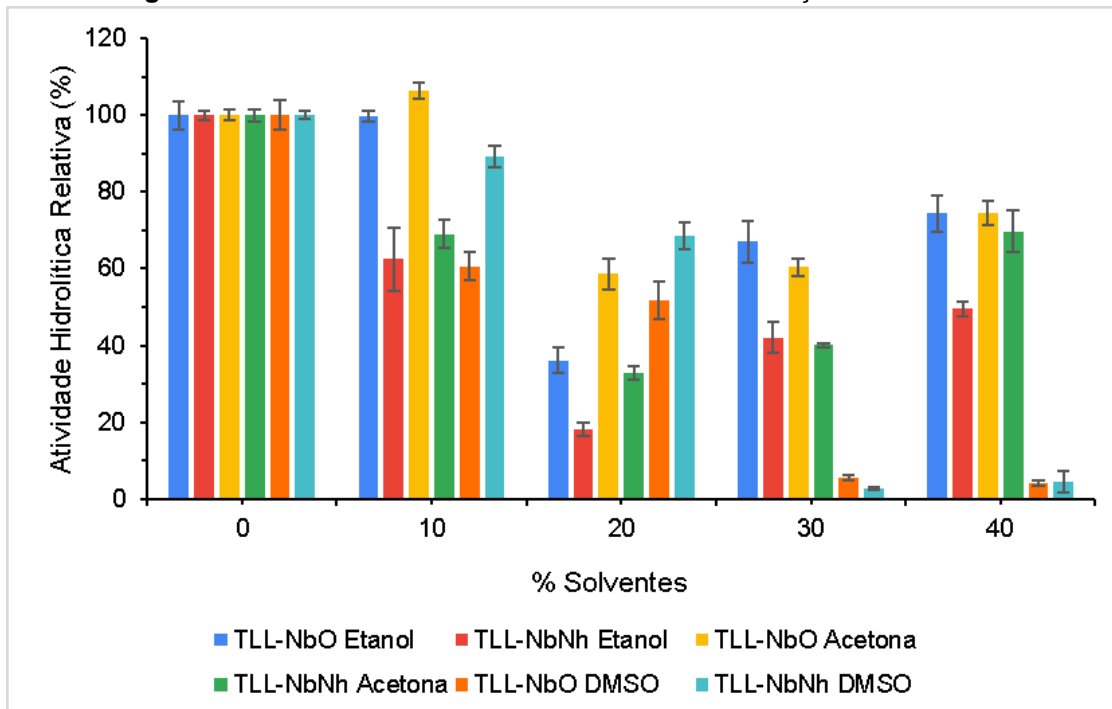
A utilização de diferentes tipos de solventes podem ter um impacto significativo na dinâmica da reação de biotransformação. Os solventes têm a capacidade de modificar a especificidade, seletividade química, seletividade de região e seletividade enantioespecífica das lipases. Além disso, o teor de água na reação também desempenha um papel crucial nesse processo.(MANOEL, et al., 2014).

A estabilidade em um ambiente composto por substâncias orgânicas é uma característica essencial das enzimas lipases. O impacto do ambiente orgânico é determinado tanto pela natureza da enzima quanto pelos solventes utilizados (HAZARIKA et al., 2002). A seletividade das enzimas, abrangendo aspectos como a seletividade enantiosseletiva, regioseletiva e quimiosseletiva, sofre variações quando operando em solventes distintos. Essas mudanças, geralmente, são alterações nas conformações da enzima, incluindo modificações em sua estrutura e flexibilidade. Tais alterações são desencadeadas pela formação de relaxamento específico entre a enzima e o solvente em questão, como mencionado por SHEN et al. (2008). Na área da biocatálise, as propriedades dos solventes, como polaridade, hidrofobicidade (tipicamente avaliada por log P), geometria molecular e habilidade de solvatação, desempenham um papel grande na conversão.

Apesar de ainda não ter sido estabelecido um parâmetro definitivo que descreva de forma abrangente a influência do solvente nas reações enzimáticas, dois parâmetros têm sido empregados por diversos pesquisadores para caracterizar as propriedades físico-químicas dos solventes: o coeficiente ($\log P$) e constante dielétrica (ϵ). Dentre eles, o $\log P$ é o mais utilizado para a escolha do solvente. Em soluções com baixa hidrofiliicidade (com $\log P < 2$), a atividade da maioria das lipases é reduzida, já que esses solventes podem interferir na atividade ou na integridade da enzima. Em situações com valores de $\log P$ entre 2 e 4, a atividade lipásica tende a ser variável, enquanto em solventes hidrofóbicos com $\log P > 4$, a atividade é geralmente elevada (ADLERCREUTZ, 1996).

Os solventes orgânicos utilizados neste contexto têm os seguintes valores de $\log P$: acetona (-0,23), DMSO (-1,3) e Etanol (-0,30). Dessa forma, como todos foram valores negativos, estes não puderam ser analisados pelo parâmetro $\log P$. Dessa forma, apenas a influência na atividade hidrolítica foi analisada

Figura 21 — Ensaio de hidrólise em diferentes concentrações de solventes



Fonte: o autor, 2023.

O DMSO foi o solvente que mais influenciou negativamente a atividade em sua maior concentração (40%). O uso de acetona e etanol mostrou efeitos similares

na atividade enzimática para TLL-NbO. Dessa forma, foi visualizado que as diferentes proporções de solvente interferem diretamente na atividade hidrolítica dos biocatalisadores, principalmente em concentrações superiores a 10%.

Vários pesquisadores têm destacado a influência da hidrofobicidade do solvente na seletividade enantiosseletiva das enzimas. Geralmente, esse efeito tem sido observado em relação à consideração das emissões de água no sítio ativo da enzima (SAKURAI et al., 1988) ou aos grupos funcionais presentes nos substratos (TAWAKI e KLIBANOV, 1992).

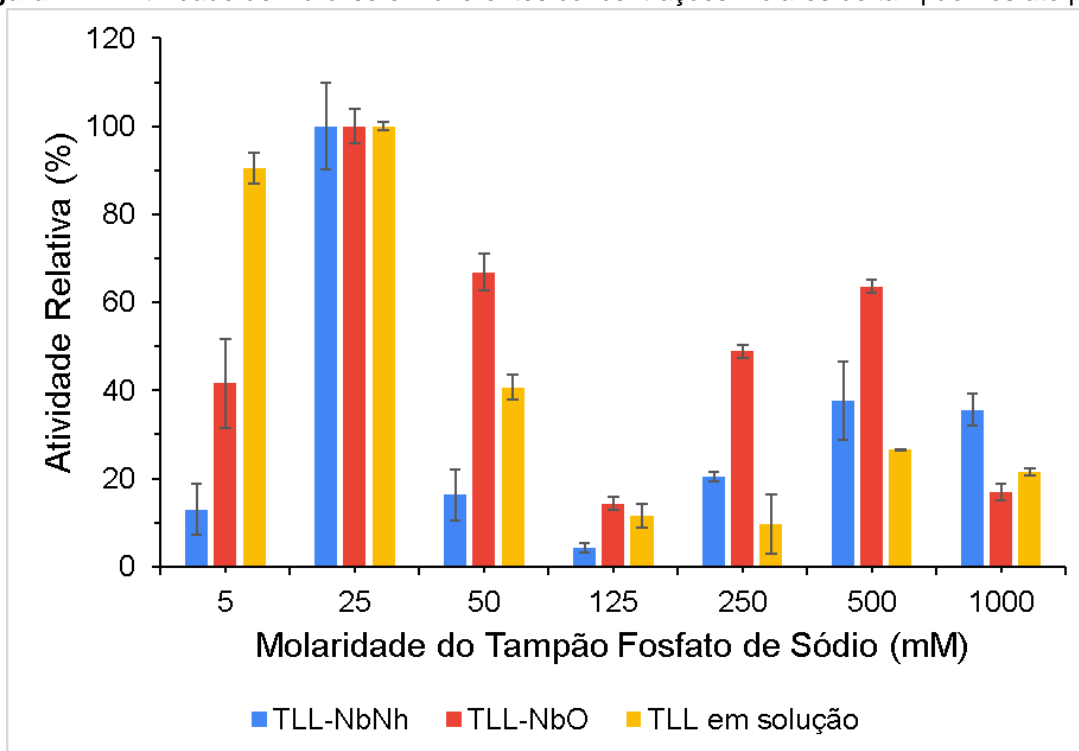
Apesar da grande influência da natureza do solvente sobre a enantio-, régio-e quimiosseletividade da enzima, ainda não foi estabelecido um consenso sobre qual parâmetro melhor descreve a influência do solvente sobre a reação enzimática (COSTA e AMORIM, 1999; LIU et al., 2009).

Os resultados presentes demonstraram que o uso desses solventes não trouxeram benéficos aparentes na atividade de hidrólise do biocatalizador nas concentrações estudadas.

5.6 Efeitos de diferentes molaridades na atividade enzimática da TLL

A magnitude da diferença de concentração molar representa uma das variáveis de impacto direto sobre a configuração tridimensional de uma enzima, potencialmente afetando sua capacidade catalítica. Conseqüentemente, foi conduzida uma análise para investigar o efeito da concentração da molaridade do tampão na atividade enzimática para todas as formas das lipases estudadas. Para tal, utilizaram-se 7 diferentes massas molares de tampão fosfato de sódio em pH 6, de modo a avaliar sua influência sobre a atividade hidrolítica utilizando o *p*-NFL. A figura 22 ilustra esses resultados de forma gráfica.

Figura 22 — Atividade de hidrólise em diferentes concentrações molares de tampão Fosfato pH 7.



Fonte: o autor, 2023.

Na Figura 22, fica evidente que TLL-NbO e TLL-NbNH mostraram uma notável estabilidade em uma concentração de 25 mM, sugerindo que essa concentração é ideal para otimizar a atividade catalítica.

Além disso, é notável que tanto concentrações molares extremamente baixas (como 5 mM) quanto altas (como 1000 mM) resultaram em atividades inferiores em comparação com outras concentrações. Essa observação pode ser atribuída à possível saturação do tampão, que pode afetar negativamente a reação de hidrólise. Em meio aquoso, o tampão se dissocia, resultando em diferentes cargas iônicas, o que poderia interferir na reação desejada.

O suporte TLL-NbO apresentou uma atividade hidrolítica significativa mesmo em concentrações elevadas, como 250 mM. No entanto, o biocatalisador TLL-NbNH perdeu mais de 50% de sua capacidade após ser incubado em solução a 50 mM.

De acordo com o estudo de Manoel (2015), a exposição da enzima TLL em tampão de 25 mM quando livre demonstra uma atividade hidrolítica significativamente alta. Por outro lado, em 500 mM, é observada uma redução de mais de 40% em comparação com a atividade anterior. Essa comparação pode

indicar que uma maior atividade em concentrações semelhantes pode estar relacionada ao efeito catalítico do suporte. Isso é ilustrado na figura 22, em que a atividade em 500 mM apresenta uma queda acentuada de cerca de 30%, comparada a 25 mM. Isso está alinhado com os resultados obtidos ao imobilizar a TLL em suportes de nióbio.

Em suma, os resultados demonstram que, embora os biocatalisadores tenham demonstrado atividade em várias condições, seu melhor desempenho foi observado em concentrações de 25 mM, tanto para TLL livre, como para suas formas imobilizadas.

5.7 Reação de esterificação

A eficiência catalítica dos derivados imobilizados foi também testada em reações de esterificação mostradas na tabela 6. A TLL imobilizada comercialmente (TL-IM) mostrou os maiores valores em comparação ao biocatalisador e ao suporte puro. A literatura exalta seu excelente perfil de esterificação (RIBEIRO, *et al.*, 2017 e MANOEL, *et al.*, 2014). Os biocatalisadores (TLL-NbO e TLL-NbNH) apresentaram atividades mais altas $365,71 \pm 0,22$ e $381,47 \pm 0,52$ quando comparados a só o suporte puro ($24,73 \pm 0,60$ e $206,12 \pm 0,36$) respectivamente. Estes dados corroboram que a presença da enzima imobilizada pode estar influenciando esse aumento da atividade e que os novos biocatalisadores desenvolvidos nesse projeto apresentaram melhor performance em reações de hidrólise.

Foram utilizados na reação de esterificação em um sistema modelo, constituído de ácido oleico e etanol (1:1), a 40°C

Tabela 5 - Valores de atividade de esterificação

Biocatalisador	Atividade de Esterificação (U/g suporte)
TLL-NbO	365,71 ±0,22
TLL-NbNh	381,47 ±0,52
Suporte NbO	24,73 ±0,60
Suporte NbNH	206,12 ±0,36
Biocatalisador	Atividade de Esterificação (U/g suporte)
TLL-NbO	365,71 ±0,22
TL-IM	3200 ±0,13

Fonte: o autor, 2023.

5.8 Imagens feitas do suporte por Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

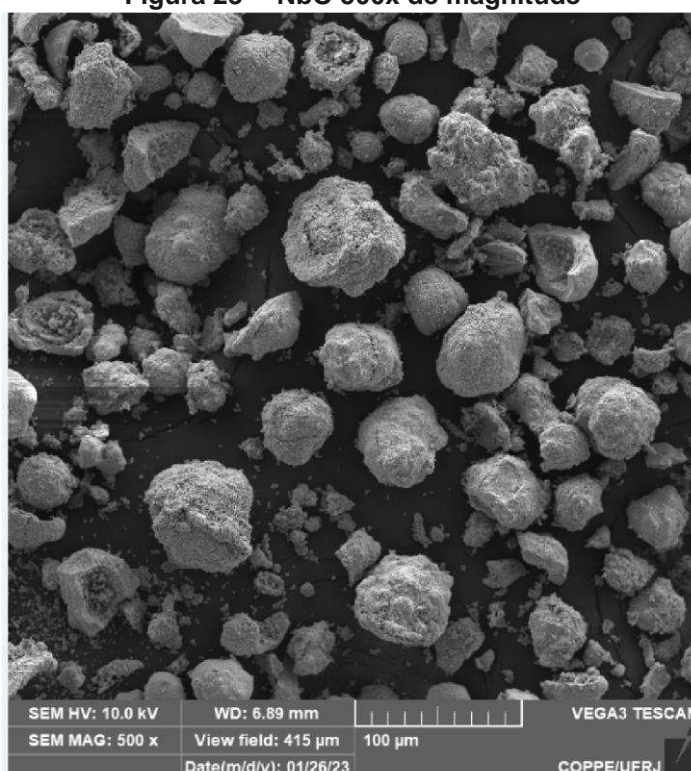
As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das matérias primas, e $\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, exatamente como fornecidas pela CBMM foram feitas em parceria com o Engapol — Laboratório de Engenharia de Polimerização. As imagens são referentes aos suportes puros NbO (Nb_2O_5) e NbNH ($\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). As micrografias foram feitas dos pós exatamente como foram fornecidas: imagem 1 e 2 Nb_2O_5 e imagem 3 e 4 $\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Essas imagens corroboram com o trabalho de FREITAS, F.M, *et al*, (2019) que também obteve os óxidos da CBMM. Essas imagens indicam que o pentóxido de nióbio (Nb_2O_5) contém aglomerados de partículas que tendem a formar estruturas de prismas retangulares com tamanhos variados (Figura 23, 24, 25 e 26). Como constatado no trabalho citado, o tratamento térmico pode aumentar

significativamente o tamanho dessas partículas. Diferentemente, o pentóxido de nióbio hidratado ($\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) não possui formato bem definido (imagem 4). No entanto, o tratamento térmico induz um crescimento organizado nos grãos, levando-os a alongar-se mais proeminentemente em uma direção, adotando uma forma de prisma. No entanto, essas dimensões diferem daquelas observadas na amostra comercial de Nb_2O_5 como relata FREITAS, FM, *et al*, 2019.

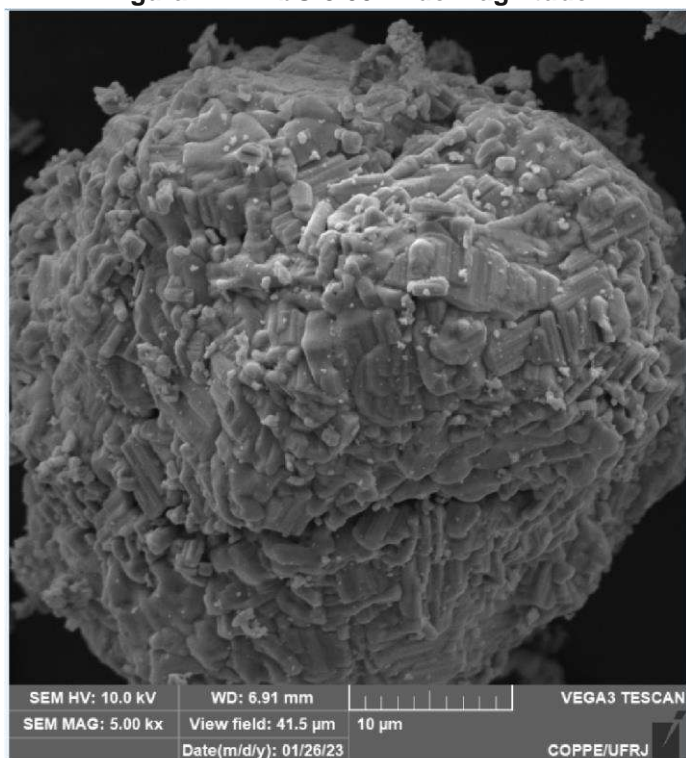
Observa-se nestas imagens que ambos os suportes possuem uma porosidade aparente em que na imobilização as enzimas podem se aderir. Para determinar isso com precisão, todavia, ainda é preciso de mais estudos. Segundo a literatura o Nb_2O_5 puro é formado por partículas de tamanho e superfície irregulares, apresentando uma área superficial específica de $42,15 \text{ m}^2/\text{g}$ e volume de poros de $0,0291 \text{ cm}^3/\text{g}$ (MIRANDA, *et al.*, 2004).

Figura 23— NbO 500x de magnitude



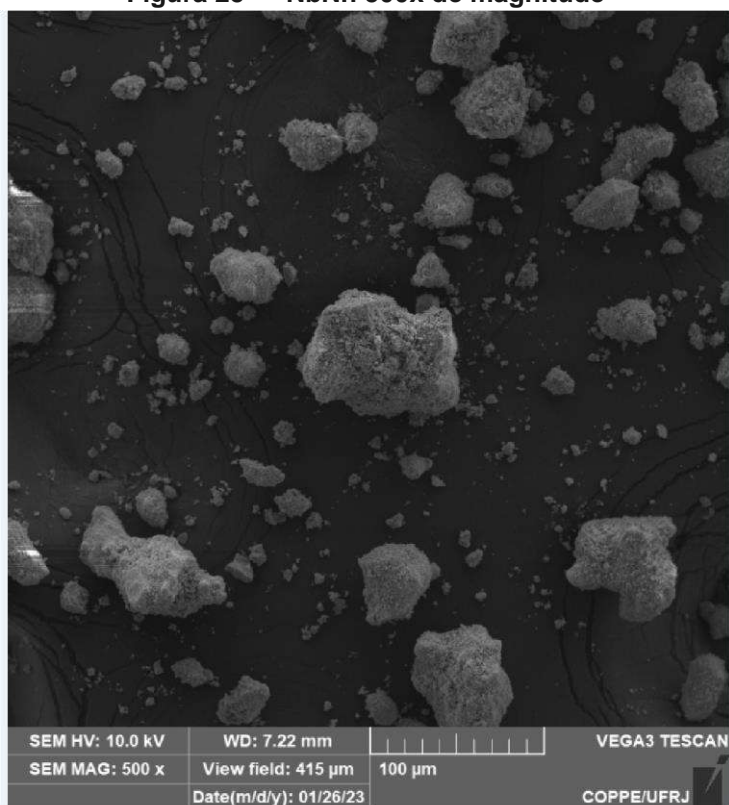
Fonte: Imagens feitas no Engepol

Figura 24— NbO 5.00Kx de magnitude



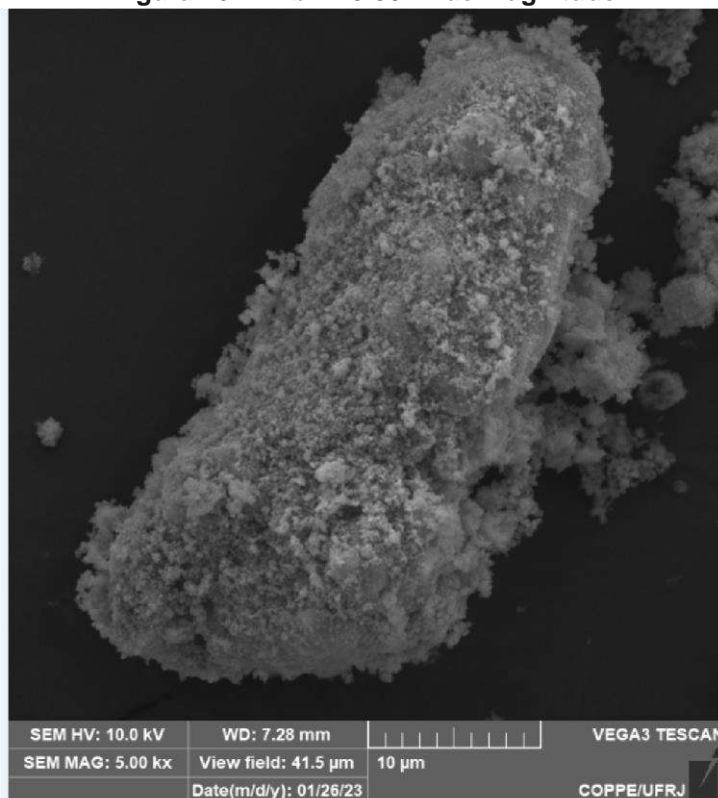
Fonte: Imagens feitas no Engepol

Figura 25 — NbNh 500x de magnitude



Fonte:Imagens feitas no Engepol

Figura 26 — NbNh 5.00Kx de magnitude



Fonte: Imagens feitas no Engepol

CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados obtidos nesta pesquisa revelam *insights* valiosos sobre a atividade, estabilidade e desempenho dos biocatalisadores obtidos pela imobilização da lipase (TLL) em suportes de óxido de nióbio. Observou-se que a enzima lipase (TLL) apresenta uma afinidade maior pelo substrato com cadeia carbônica mais longa (*p*-NFL), o que resultou em uma atividade mais elevada em comparação ao *p*-NFB. A imobilização da TLL nos suportes NbO e NbNH demonstrou ser eficiente, com destaque para a significativa adsorção da enzima no suporte NbNH. Houve a adsorção de quase 77% da TLL no NbNH em menos de 24 horas.

Ambos os biocatalisadores, TLL-NbO e TLL-NbNH, exibiram atividades hidrolíticas satisfatórias com ambos os substratos, destacando-se a maior atividade no caso do substrato de cadeia carbônica mais longa e com destaque para TLL-NbNH. A maior estabilidade dos biocatalisadores e da enzima em solução foi observada em temperaturas de 40°C e as maiores atividades de hidrólise na

temperatura de 60°C. O pH que conferiu maiores valores de atividade entre os biocatalizadores e a enzima em solução foi em pH 9. Os testes mostraram que sem a presença da enzima a atividade dos suportes foi zero, isso relata que a atividade foi influenciada pela presença dessas proteínas imobilizadas.

A escolha do tampão fosfato 25 mM demonstrou ser a mais adequada para as reações catalíticas, e a influência de solvente orgânico na atividade hidrolítica, foi observado que a partir de 20% de concentração dos solventes as atividades caíram em todos os ensaios. Apesar disso, percebe-se que para ambos os suportes, tanto o etanol quanto a acetona não levaram a uma queda brusca de atividade mesmo com aumento da concentração. Os biocatalisadores TLL-NbO e TLL-NbNH apresentaram uma atividade de esterificação ($365,71 \pm 0,22$ e $381,47 \pm 0,52$) maior em relação aos suportes puros ($24,73 \pm 0,60$ e $206,12 \pm 0,36$), evidenciando que a associação da lipase ao suporte influencia a atividade. Embora os biocatalisadores produzidos tenham apresentado atividade de esterificação menor que a versão comercial (TL-IM), para atividade hidrolítica o resultado foi diferente. Os biocatalisadores produzidos, TLL-NbO e TLL-NbNH se destacaram apresentando atividades hidrolíticas satisfatórias frente aos substratos *p*-NFL e *p*-NFB, destacando-se a maior atividade ($912,73 \pm 7,65$ U/g) quando o *p*-NFL, foi utilizado como substrato. Além disso, quando comparados as atividades hidrolíticas utilizando substrato *p*-NFL dos suportes isolados (NbO e NbNH), os biocatalisadores (TLL-NbO e TLL-NbNH), TL-IM e TLL-Accurel os resultados mostraram que TLL-NbO e TLL-NbNH ($539,35 \pm 5,98$ U/g e $912,73 \pm 7,65$ U/g) respectivamente obtiveram atividades maiores quando comparado aos suportes isolados não imobilizados NbO e NbNH ($107,89 \pm 0,42$ U/g e $160,41 \pm 9,24$ U/g), TL-IM ($10,89 \pm 0,56$ U/g) e TLL-Accurel ($25,35 \pm 3,9$ U/g).

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram analisar as diferenças morfológicas das superfícies de NbO e NbNH. Além disso, as imagens mostram que ambos os suportes possuem uma porosidade aparente em que as enzimas podem se aderir na imobilização. Para determinar isso com precisão, todavia, ainda é preciso de mais estudos.

Em síntese, os resultados deste estudo proporcionam um panorama abrangente da atividade, estabilidade e desempenho dos biocatalisadores obtidos por imobilização da lipase em suportes de nióbio. Os achados destacam o potencial

desses biocatalisadores para diferentes aplicações. Além disso, abre-se espaço para futuras investigações, como a exploração de outras enzimas, a otimização de condições operacionais e a avaliação de suas aplicações práticas em diferentes cenários

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

As informações obtidas até o momento constituem um ponto de partida valioso para a continuidade dos estudos de imobilização da enzima lipase em óxido de nióbio, abrindo caminho para diversas perspectivas futuras e desenvolvimentos promissores. Algumas das perspectivas sugeridas são:

Exploração de Metodologias de Ativação Alternativas: Além das técnicas já empregadas, é recomendado explorar outras metodologias de ativação do suporte de óxido de nióbio, bem como confirmações experimentais se ocorreram outros tipos de interação, sem ser o de adsorção, visto a superfície extremamente ácida dos suportes de nióbio empregados. A avaliação dessas alternativas permitirá uma compreensão mais abrangente da adequação do óxido de nióbio como suporte para estabilizar a enzima lipase por meio da técnica de imobilização multipontual.

Ampliação do Escopo para Outras Enzimas: É interessante expandir o escopo para outras enzimas de interesse industrial. Explorar a imobilização de diferentes enzimas pode levar a aplicações mais amplas e a novos biocatalisadores altamente eficazes.

Estudos de Reuso dos Biocatalisadores: Investigar a possibilidade de reutilização dos biocatalisadores. Essa análise é crucial para avaliar sua viabilidade e eficiência a longo prazo. Isso pode ser importante para considerações econômicas e ambientais.

Desenvolvimento de Aplicações Práticas: Além de focar na síntese dos biocatalisadores, é fundamental desenvolver aplicações práticas para eles. A produção de biodiesel, lubrificantes biodegradáveis e resolução cinética de moléculas bioativas são exemplos de áreas onde esses biocatalisadores podem encontrar aplicações industriais significativas.

Estudos de Estabilidade e Durabilidade: Realizar estudos detalhados para avaliar a estabilidade e durabilidade dos biocatalisadores em diferentes condições operacionais, considerando fatores como temperatura, pH, solventes e reações de longa duração. Isso garantirá o entendimento da viabilidade de sua aplicação em escala industrial.

Otimização dos Processos: Buscar otimizar os processos de imobilização, considerando fatores como carga enzimática, quantidade de suporte, tempo de reação e condições de imobilização. Essa otimização pode resultar em biocatalisadores com desempenho aprimorado e maior eficiência.

Estudos de Mecanismos de Ação: Realizar estudos mais aprofundados para compreender os mecanismos de ação envolvidos na estabilização da enzima lipase em óxido de nióbio. Isso pode proporcionar insights valiosos para otimizar o processo de imobilização e direcionar futuras aplicações

Além dessas perspectivas ainda é preciso agregar mais informações aos atuais dados presentes nesse estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, P. **Modes of using enzymes in organic media**. In: KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. *Enzymatic reactions in organic media*. London: Chapman & Hall, 1996. p. 9-42.

ANDRADE, M.L.A. *et al.* **NIÓBIO: O Brasil no Topo**. BNDES – Informe Setorial Mineração e Metalurgia: Rio de Janeiro. abr. 2000. Nº. 32.

ARANDA, D. A. G. *et al.* The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions. **Journal of Physical Organic Chemistry**. 2009. v. 22, n. 7, p. 709-716.

BARON, A. M. **Preparação e catálise de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. 148 f.

BERTAGI, L. T. **Estudo comparativo da utilização do pentóxido de nióbio e das lipases imobilizadas em Nb₂O₅/Álcool Polivinílico (PVA) como catalisadores na síntese do oleato de etila**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

BORNSCHEUER, T.U. *et al.* Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends Biotechnol.** 2002. v. 20, n. 10, p. 433-437.

BRAGA, V. S. *et al.* Esterification of acetic acid with alcohols using supported niobium pentoxide on silica-alumina catalysts. **Catalysis Today**. v. 133, p. 106-112, 2008.

BUSACCA, C. A.; Fandrick, D. R.; Song, J. J.; Senanayake, C. H. Catalytic Resolution of a Chiral Sulfide by a Lipase-Mediated Kinetic Resolution. *Adv. Synth. Catal.* 2011, 353 (18), 1825-1833. DOI: 10.1002/adsc.201000932.

CABRERA, Z. *et al.* Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2009. v. 57, n. 1–4, p. 171-176.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de Células E Enzimas Imobilizadas Em Processos Biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência E Desenvolvimento**. 2006. v. 9, p. 48.

CAVALCANTI, M.H.S.; **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄) e seu uso como suporte para imobilização de lipase *thermomyces lanuginosus* (tl)**. Universidade Federal de Alfenas; Instituto de Química. Alfenas, 2020.

CECCHI, C.M.P. *et al.* **Novos insights sobre a oxidação de ésteres metílicos de ácidos graxos insaturados catalisados por óxido de nióbio (V): Um estudo da reatividade da superfície do catalisador.** Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2018.

CHO, A. R.; YOO, S. K.; KIM, E. J. Lipase-catalyzed resolution of racemic alcohols: application to the synthesis of (S)- and (R)-1-phenylethanol. **FEMS Microbiology Letters**. 2000. v. 186, n. 1, p. 235-238.

CIPOLATTI, E.P. *et al.* Pilot-scale development of core – shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids. **Journal of Applied Polymer Science**. 46727, 1–13, 2018.

COSTA, V. E. U.; H. L. N. AMORIM. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova* 22(6). Porto Alegre: 1999.

CUNHA, A. G. *et al.* Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the support nature on catalytic properties properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 59 – 67, 2014.

CUNHA, A. G. **Resolução Cinética de Derivados de Mio-inositol Catalisada por Lipases.** Ph.D. Thesis. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: 2011.

DALLA-VECCHIA R.; NASCIMENTO M. G.; SOLDI V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.

DONALD G. EMERSON; RALPH EMMERICH. **Fungos termofílicos: um relato de sua biologia, atividades e classificação.** São Paulo: WH Freeman, 1964.

EMERSON, R. **Thermophiles.** In: ANSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S., editors. *The Fungi. An Advanced Treatise.* Academic Press, London, p. 105-128, 1968.

FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.* Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.

FERRAZ, F.S.; RODRIGUES, M.A; SILVA, L.M. Lipases in biocatalysis: A review of recent advances. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102(22), 12345-12356. 2018.

FIGUEIREDO, E. V. D. C. **Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de**

etila. 2013. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FIGUEIREDO, J. A.; SILVA, M. A.; MOREIRA, P. F. Immobilization of lipases on solid supports: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013. 97(12), 5143-5164.

FUREBY, A. M.; LI, T.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. **Enzyme and Microbial Technology** **20.3**. 1997. 198-206.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise Controlada De Proteínas Do Soro Láctico Usando Tripsina E Quimotripsina Imobilizadas Em Diferentes Suportes** (Tese de Doutorado). 2004. São Carlos, SP, p. 191.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Chromatography A**. 819.1 (2005): 3-16.

GULDHE, A. *et al.* Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 41, 1447–1464, 2015.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HAZARIKA, S. *et al.* Ethyl oleate synthesis by porcine pancreatic lipase in organic solvents. **Chemical Engineering Journal**, v. 8, p. 61-85, 2002.

IZUKA, T; OGASAWARA, K.; TANABE, K. Propriedades ácidas e catalíticas do nióbio Pentaoxide. Touro. **Chem. Sociedade Jpn.** 1983, 56, 2927–2931.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.; REETZ, M. Bacterial Biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications on lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JENSEN, R. G.; GALLUZZO, D. R.; BUSH, V. J. Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases). **Biocatalysis** **3**. 1990. 307-316.

JUNIOR, R. F. P. **Nióbio**. Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral, 2003. 120 p.

KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipases: promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, 47(4), 555-569. 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, A. **Immobilized enzymes**. Proceedings of the First International Enzyme Engineering Conference (pp. 1-13). Academic Press, 1971.

KENNEDY, P. J.; CABRAL, J. M. S. Immobilization of enzymes. **Methods in Enzymology**, 91, 270-292. 1983.

LOPES, O. F. *et al.* Óxidos de Nióbio: Uma visão sobre a síntese do Nb₂O₅ e sua aplicação em fotocatalise heterogênea. **Química Nova**, v. XY, n. 00, p. 1-12, 2009.

MALCATA, F. X. *et al.* Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 67.12. 1990.

MANOEL, E. A. *et al.* Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from Burkholderiacepacia: Application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. **ProcessBiochemistry**, v. 50, n. 10, p. 1557-1564. 2015.

MANOEL, E. A. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53-57, abr. 2015.

MANOEL, E. A. **Obtenção de Biocatalisador para Resolução Cinética de Derivados de Miolnositol**. Tese de Doutorado. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

MARIN, M. L. *et al.* Synthesis, acid properties and catalysis by niobium oxide nanostructured materials. **Catalysis Science & Technology**, v. 4, n. 9, p. 3044-3052. 2014.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463. 2007b.

MEGHWANSI, S.; SINGH, J; GUPTA, R. Regiospecificity of lipases from Bacillus species. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 37(3-4), 231-235. 2006.

MENONCIN, C.; SILVA, M. A.; MOREIRA, P. F. Immobilization of lipase from Candida rugosa on macroporous resins: Effect of immobilization conditions on the catalytic performance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 61(1), 53-59.

MIRANDA, M. M. M. **Aprimoramento do procedimento de imobilização da lipase microbiana em óxido de nióbio para modificação de óleos vegetais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

MORAIS, J. F. **Estudo da acidez superficial de catalisadores de óxido de nióbio**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 1991. 84 f.

NAKAJIMA, K. *et al.* Nb₂O₅·nH₂O como um catalisador heterogêneo com sítios ácidos de Lewis tolerantes à água. **Geléia. Chem. Sociedade** 2011, 133, 4224–4227.

NEVES PETERSEN, M. T.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 115-147. 2001.

NINI, L. *et al.* Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1534, n. 1, p. 34-44. 2001.

NOWAK, I.; ZIOLEK, M. Niobium compounds: Preparation, characterization, and application in heterogeneous catalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 12, p. 3603-3624. 1999.

OLIVEIRA, J. A. C. D. *et al.* Imobilização-estabilização multipontual da enzima papaína em suporte de óxido de nióbio visando aplicação industrial. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 1417-1422. 2010.

PALOMO, J. M. *et al.* Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, p. 279-286. 2002.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty binding site. **Chem. Phys Lipids**, v. 93, p. 67-80. 1998.

QUYEN, D. T.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R. D. Use of a new carrier system for the immobilization of lipase: influence on the activity and stability of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 2, p. 102-110. 2003.

RANSAC, S. *et al.* The kinetics specificities and structural features of lipases, In: Molecular Dynamics of Biomembranes (de Kamp, J. A. F.; Ed.), Berlin: *Springer*. v. 96, p. 254-304. 1996.

RATHI, P. *et al.* S. Immobilization of lipase on poly(ethylene glycol)-silica and its application in the synthesis of enantiopure esters. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 12, p. 495-498. 2000.

RIBEIRO, B. D. *et al.* Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 16. 2011.

RIBEIRO, M. F. P. **Dessimetização de um derivado de mio-inositol catalisada por lipases**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017. 105 f.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**. 2013.

RODRIGUES, R. C., *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746-770. 2019.

RUIZ, C. *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of 1-acylglycerols. **FEMS Microbiology Letters** 217.2: 263-267. 2002.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30 n. 3, p. 513-521. 1959.

SERAFIM, M. J. S. **Obtenção e caracterização do hidróxido de nióbio V como trocador iônico**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1994.

SHELDON, R; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235. 2013.

SIMONS, J. W. F. A. *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of 1-acylglycerols from glycerol and long-chain alcohols in organic solvents. **Chem. Phys. Lipids** 93.1: 27-37. 1998.

SOUZA, L. T. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria**, v. 4, n. 2, p. 529-568. 2017.

TACIAS-PASCACIO, V. G. *et al.* Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. **RSC Advances**, v. 6, n. 102, p. 100281-100294. 2016.

UPPENBERK, J. *et al.* Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, n. 2, p. 790-792. 1994.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **TRENDS in Biotechnology**, v. 15, p. 32-38. 1997.

VILLO, L. *et al.* *Thermomyces lanuginosus* Lipase with Closed Lid Catalyzes Elimination of Acetic Acid from 11-Acetyl-Prostaglandin E2. **ChemCatChem**, v. 6, n. 7, p. 1998-2010. 2014.

VITOLLO, M. Imobilização de Enzimas. In: LIMA, U. A. *et al.* **Biotecnologia Industrial, vol. 3, Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, p. 391-403.

WANG, X; ZHANG, Y.; WANG, Y. Immobilization of enzymes: A review. **Bioresource Technology**, 322, 124445. 2021.

CHOI, Y.J., MIGUEZ, C.M., LEE, B.H. Characterization and heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3213- 3221, 2004.

FREITAS, F.M **PROCESSO DE COMPACTAÇÃO DE ÓXIDOS DE NIÓBIO PELO MÉTODO DE CENTRIFUGAÇÃO**. DISSERTAÇÃO(Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

Cao, S.; Xu, P.; Ma, Y.; Yao, X.; Yao, Y.; Zong, M.; Li, X.; Lou, W.; *Chin. J. Catal.*
2016, 37, 1814.