



**Avaliações de suportes e métodos de
imobilização para produção de
biocatalisadores a base de lipase de *Yarrowia
Lipolytica* e *Candida antarctica***

Conrado Barcellos Monteiro

Projeto Final de Curso

Orientadores:

Profª Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

Prof Bernardo Dias Ribeiro, D. Sc.

Ana Iraidy Santa Brígida, D. Sc.

Fevereiro de 2015

**Avaliações de suportes e métodos de imobilização para
produção de biocatalisadores de *Yarrowia Lipolytica* e
*Candida antarctica***

Conrado Barcellos Monteiro

Projeto de Final de Curso submetido ao corpo docente da Escola de Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Graduação de Engenharia Química.

Aprovado por:

Evelin Andrade Manoel, D. Sc.

Ivaldo Itabaiana Junior , D. Sc.

Leda Maria Fortes Gottschalk, D. Sc.

Orientado por:

Prof^a. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

Prof^a. Bernardo Dias Ribeiro, D. Sc.

Ana Iraidy Santa Brigida, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Fevereiro de 2015

Monteiro, Conrado Barcellos.

Avaliações de suportes e métodos de imobilização para produção de biocatalisadores a base de lipase de *Yarrowia lipolytica* e *Candida antarctica*. Conrado Barcellos Monteiro. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2015. xiii, 53p.; il.

(Projeto Final) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2015.

Orientadores: Bernardo Dias Ribeiro, Ana Iraidy Santa Brígida, Maria Alice Zarur Coelho.

1. Imobilização. 2. Enzima. 3. *Yarrowia*. 4. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Bernardo Dias Ribeiro, Ana Iraidy Santa Brígida, Maria Alice Zarur Coelho. I. Título

“Once you have eliminated the impossible, whatever remains,
however improbable, must be the truth.”

Sir Arthur Conan Doyle

Dedico este trabalho
à minha meus pais e minha avó

Agradecimentos

Nunca fui bom com palavras e não será esse o momento de provar o contrário. Esse sim é o momento de agradecer a todas as pessoas que se mantiveram em minha vida ou entraram nela durante essa jornada.

Gostaria de agradecer primeiramente a minha avó, Maristela, não existe pessoa que mais me apoiou neste ou em qualquer desafio de minha vida, mesmo quando não tinha mais forças ou não acreditava mais em mim mesmo, minha “veia” sempre estava lá por mim. Obrigado “veia” seu neto vai tentar sempre lhe dar novas felicidades! Além disso, gostaria de agradecer a meu avô Nelson, que mesmo longe, sempre senti que estive ao meu lado.

Aos meus pais, Nelson e Denyse, nada poderia ter sido feito sem eles, sem suas broncas quando jovem, sem seus conselhos quando mais velho ou sem sua paciência, em qualquer momento de minha vida. Sempre me incentivaram a estudar e mesmo quando divergimos, sei que posso contar com eles incondicionalmente. Obrigado.

A Natália, minha namorada, meu amor. Nunca acreditei que teria a meu lado alguém tão perfeito, que conseguiria me entender em tantos níveis, seja pela conversas, seja pelos olhares, ou mesmo pelas nossas implicâncias. Uma vez lhe perdi, mas nós conseguimos reencontrar nosso caminho, e espero que assim se mantenha para sempre. Te amo.

A meus sogros, Claudia e Marcos, que sempre me apoiaram, me deram abrigo, e sempre tinha “a coquinha do conradinho”, me tratando como um filho e não como um estranho no ninho. Obrigado por tudo.

Como sempre gosto de dar o meu toque de irreverência a tudo que faço, não poderia ser esquecer de meus companheiros de 4 patas: Pimpolho, Billy e Lili. Nos dias mais difíceis são essas pequenas amostras de destruição caseira, mais conhecidos como meus “cãopetas”, que me acalmam e que me fazem conseguir tolerar as dificuldades desse mundo.

Ao BIOSE, agradeço por todos os ensinamentos, a todos os tempos livres que ai passei, a todas conversas que tive nesse lugar. Espero que saibam que não considero o laboratório apenas um local, sei que uma parte de mim ficará na UFRJ, e com certeza, estará lá.

Em especial, gostaria de agradecer a pessoa que por muitos anos não foi meu orientador, mas sempre estive lá para me ajudar, ou apenas para falar besteiras.

Bernardo, obrigado por todos os ensinamentos, mas prometo nunca mais pesar mais 94 amostras para você!

Agradeço a Ana, por ter me dado uma chance em 2009, no meu primeiro período na faculdade, e me ensinado tudo o que poderia no tempo em que estivemos juntos.

Agradeço à professora Maria Alice, por ter me dado a oportunidade de participar de um grupo tão unido e de nível profissional tão elevado.

A todos os meus outros amigos de Niterói e da faculdade, que tornaram a experiência acadêmica mais familiar e meus finais de semana mais agradáveis.

Agradeço, por fim, ao CNPQ, pelos 3 anos de bolsa de iniciação científica entre 2009 á 2012.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Graduação em Engenharia Química

**AVALIAÇÕES DE SUPORTES E MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO
PARA PRODUÇÃO DE BIOCATALISADORES DE *YARROWIA
LIPOLYTICA E CANDIDA ANTARCTICA***

Conrado Barcellos Monteiro

Fevereiro, 2015

Orientadores: Profª Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Prof Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

Ana Iraidy Santa Brígida, D.Sc.

As lipases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis e, em condições especiais, catalisar reações de síntese como esterificação e transesterificação. Dentre as diversas fontes de lipase, duas fontes podem ser destacadas, sendo elas a lipase de *Yarrowia Lipolytica* IMUFRJ 50682, levedura oriunda da baía de Guanabara e o extrato comercial de lipase B de *Candida antarctica* (CALB). Além disso, o potencial de aplicação industrial dos biocatalisadores a base de lipases é outro importante fator que impulsiona os estudos nesta área, como na síntese de monoésteres de ácido 2,4-dimetilglutírico, e síntese de poliéster. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o processo de imobilização por ligação covalente desenvolvido por Brígida (2006) utilizando CALB e avaliar a cinética de adsorção de lipases de *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682 (LYL) em fibras de coco verde funcionalizadas com 3-glioxidopropil trimetoxisilano (GPTMS), fibra de coco verde natural, em fibra de coco quimicamente tratada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e em sílica (IB-S60S) ativada com Octiltrióxisilano. Para tanto, avaliou-se no processo de imobilização por ligação covalente, a influência do tempo de contato, a estabilidade térmica, a concentração de GPTMS e lavagens pós borohidreto de sódio no processo de imobilização, já no processo de imobilização por adsorção, avaliou-se o tempo de contato dos suportes com diferentes concentrações da solução enzimática em banho finito a fim de se construir a curva cinética do processo e, a partir desta, estabelecer um tempo mínimo necessário para a imobilização de LYL, a carga máxima possível, tempo de meia vida através de estabilidade térmica e estabilidade operacional.

SUMÁRIO

Introdução.....	1
Objetivos.....	4
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica	5
1.1 Enzimas	5
1.1.1. Introdução.....	5
1.1.2. Lipases.....	6
1.1.3. Fontes de obtenção de lipase	7
1.1.3.1. <i>Yarrowia Lipolytica</i>	7
1.1.3.2. <i>Candida antarctica</i>	8
1.2 Imobilização.....	10
1.2.1. Introdução.....	10
1.2.2. Adsorção.....	11
1.2.3. Ligação Covalente	12
1.3 Suportes.....	14
1.3.1. Introdução.....	14
1.3.2. Fibra de coco	15
1.3.3. Silica	19
Capítulo 2: Materiais e Métodos	20
2.1. Materiais	20
2.1.1. Enzimas	20
2.1.2. Suportes	21
2.1.3. Reagentes.....	21
2.2. Métodos Analíticos	22
2.2.1. Atividade esterásica em p-Nitrofenil Laurato	22

2.2.2.	Atividade lipolítica em emulsão	23
2.2.3.	Modificações químicas no suporte	24
2.2.4.	Métodos de imobilização.....	26
2.2.5.	Variáveis de resposta	28
2.2.6.	Pulverização de Suportes.....	30
Capítulo 3: Resultados e Discussão.....		31
3.1.	Lipase tipo B de <i>Candida antarctica</i>	31
3.1.1.	Concentração de Borohidreto de sódio.....	31
3.1.2.	Influência do Tempo de Contato	33
3.1.3.	Estudo do Número de Lavagens.....	34
3.1.4.	Efeito da Concentração de GPTMS na Estabilidade	35
3.2.	Lipase de <i>Yarrowia Lipolytica</i>	38
3.2.1.	Imobilização em fibra de coco.....	38
3.2.2.	Estudo do processo de imobilização em suportes de sílica	43
Conclusões.....		50
Referências		52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Reação catalisada pela lipase.	6
Figura 2 - Imagem de microscopia óptica de <i>Y. Lipolytica</i> em aumento de 400x apresentando células ovoides (A) e hifas (B)	8
Figura 3 – Métodos de imobilização enzimática. Fonte: Brígida, 2010.	10
Figura 4– grupos funcionais possíveis de serem encontrados em enzimas. Fonte: Brígida, 2010.	13
Figura 5 - Distribuição dos grupos varietais explorados comercialmente no Brasil (Martins, 2010).	16
Figura 6 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da fibra de coco verde (Fonte: Brígida, 2010).	17
Figura 7– Fibra de coco verde. Fonte: Brígida, 2010.	18
Figura 8 – Representação química do processo de funcionalização da fibra. Fonte: Brígida, 2006.	25
Figura 9 – Agitador rotativo utilizando durante a imobilização.	27
Figura 10 – Efeito da concentração de borohidreto de sódio na atividade de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 7 em fibra de coco funcionalizada com 5% de GPTMS.	32
Figura 11 – Efeito da concentração de borohidreto de sódio na estabilidade térmica a 60°C de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 10 em fibra de coco funcionalizada com 5% de GPTMS	33
Figura 12 – Efeito do número de lavagens após tratamento com borohidreto na atividade logo após lavagem e na atividade residual após 4h a 60°C em banho úmido do derivado.	35
Figura 13 – Efeito da concentração de GPTMS na estabilidade de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 7 em fibra de coco.	37
Figura 14 – Efeito da concentração de GPTMS na estabilidade de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 10 em fibra de coco.	37
Figura 15 - Cinética de adsorção de lipase de <i>Y. Lipolytica</i> em fibra de coco verde natural.	39
Figura 16 - Cinética de adsorção proteica de lipase de <i>Y. Lipolytica</i> em fibra de coco verde natural.	39

Figura 17 - Cinética de adsorção de lipase de <i>Y. Lipolytica</i> em fibra de coco modificada com peróxido de hidrogênio.	40
Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de fibra de coco: (a) natural e (b) tratada com peróxido de hidrogênio. (Brígida, 2010)	41
Figura 19 - Isoterma de adsorção com base na atividade de lipase de <i>Y. Lipolytica</i> imobilizada em fibra de coco natural e oxidada.	42
Figura 20 - Isoterma de adsorção com base na proteína adsorvida de lipase em fibra de coco natural.....	43
Figura 21 – Cinética de adsorção de lipase de <i>Y. Lipolytica</i> obtida a partir de extrato bruto e imobilizada em suporte de sílica ativada.....	44
Figura 22 – Atividade hidrolítica apresentada no sobrenadante após a imobilização....	44
Figura 23 – Atividade hidrolítica apresentada no suporte antes e após a pulverização do suporte.	46
Figura 24 – Estabilidade operacional de 10 ciclos realizada com derivado (LYL em sílica) obtido em 90 minutos e a 10 KU/L.....	47
Figura 25 – Estabilidade térmica a 60°C realizada com derivado (LYL em sílica) obtido em 90 minutos e a 10 KU/L.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos suportes por composição (Messing, 1984)	14
Tabela 2 – Teores de Lignina, Celulose e Hemicelulose da fibra de coco. Fonte: Brígida et al., 2010.	18
Tabela 3 – Efeito do tempo de contato na atividade e estabilidade térmica de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 7 em fibra de coco funcionalizada com 5% de GPTMS.....	34
Tabela 4 – Atividade recuperada do processo (%)	45
Tabela 5 – Rendimento do processo (%).....	46

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem se notado maior interesse industrial pelos processos biotecnológicos. A definição deste processo é a aplicação prática de conhecimento através do uso de organismos vivos, ou parte destes, para a obtenção de produtos e serviços utilizando desde processos fermentativos até a manipulação genética (Figueiredo, 2006). Tais processos apresentam vantagens quando comparados aos processos puramente químicos, seja devido a sua especificidade ou por sua menor geração de subprodutos, embora sejam mais custosos. Este interesse pode ser visualizado principalmente através das pesquisas científicas, como estudos na produção de complexos multienzimáticos para a alimentação de frangos (Marques, 2007), produção de quinase extracelular a partir de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 (Fleuri et al., 2009) onde em ambos processos, através de fermentação com microrganismos geneticamente modificados, é alcançada a expressão de proteínas específicas e otimização de processos, levando a um maior rendimento e incremento da produção na indústria. Com base no aumento da exportação e na produção de enzimas no Brasil, estima-se que os bioprocessos que utilizam enzimas tenha crescido na indústria brasileira (Aliceweb, 2014).

Além de seus benefícios, pode-se ver o aumento do incremento biotecnológico devido a seu apelo comercial. Atualmente está em voga a indústria verde, ou seja, quanto menos agressiva, poluente e ciente de seus deveres com a preservação ambiental uma indústria for, melhor será sua imagem com o público alvo (Barbosa e Arruda, 2012). Devido a tais mudanças, hoje existem os bioplásticos de cana de açúcar usados em 30% da produção de garrafas do produto Coca-Cola®, alimentos probióticos para regulação de funções corpóreas, complexos enzimáticos em sabões em pó, entre outros exemplos

A biocatálise é um exemplo de tecnologia que atende a um dos princípios da química verde, possibilitando a substituição de catalisadores químicos. Os catalisadores são substâncias que diminuem a energia de ativação necessária para que uma determinada reação ocorra, sem modificar seu equilíbrio químico. Existem vários exemplos de catalisadores da indústria química como 1-1,Bis(terc-peroxibutil)ciclohexano na produção de plásticos cintiladores (Costa et al., 1997), ou na

produção de polímero a base de propileno utilizando o catalisador Ziegler-Natta (Coutinho e Costa, 1991). Entretanto, as condições de operação de tais catalisadores requerem geralmente altas temperaturas e pressões, nem sempre gerando um produto puro, seja pela obtenção de racematos ou quebra de moléculas em locais não específicos. Por tais motivos, as rotas enzimáticas estão cada vez mais ganhando foco na indústria. Enzimas requerem uma temperatura de operação branda, diminuindo os gastos com fontes térmicas; podem trabalhar à pressão atmosférica; e geram um produto com maior teor de pureza, visto que as enzimas são mais seletivas, a formação dos supracitados racematos é reduzida ou nula, gerando, assim, menos subprodutos (Fernandez-Lorente et al., 2003). Infelizmente o uso de enzimas na sua forma livre, em solução, onera o processo, tornando sua rentabilidade baixa.

Uma alternativa para diminuir seus custos seria a utilização de enzimas imobilizadas. Tal modificação pode diminuir os custos, pois permite a recuperação e reutilização do catalisador, e o torna mais estável frente variações de pH, térmicas, operacionais (Blanco et al., 2004), possibilitando, inclusive, a implantação de processos contínuos.

Os biocatalisadores utilizados neste estudo foram duas lipases, uma comercial do tipo B de *Candida antarctica*, e outra de *Yarrowia Lipolytica*, produzida no próprio laboratório. A escolha de lipases, descritas como glicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3, pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), ocorreu devido à alta versatilidade destes catalisadores, podendo ser aplicado em várias áreas da indústria química como: síntese de compostos opticamente ativos na indústria farmacêutica; síntese de ésteres usados na indústria de aromas; síntese de éster de vitamina, esterificação de açúcares, entre outros (Brigida, 2010).

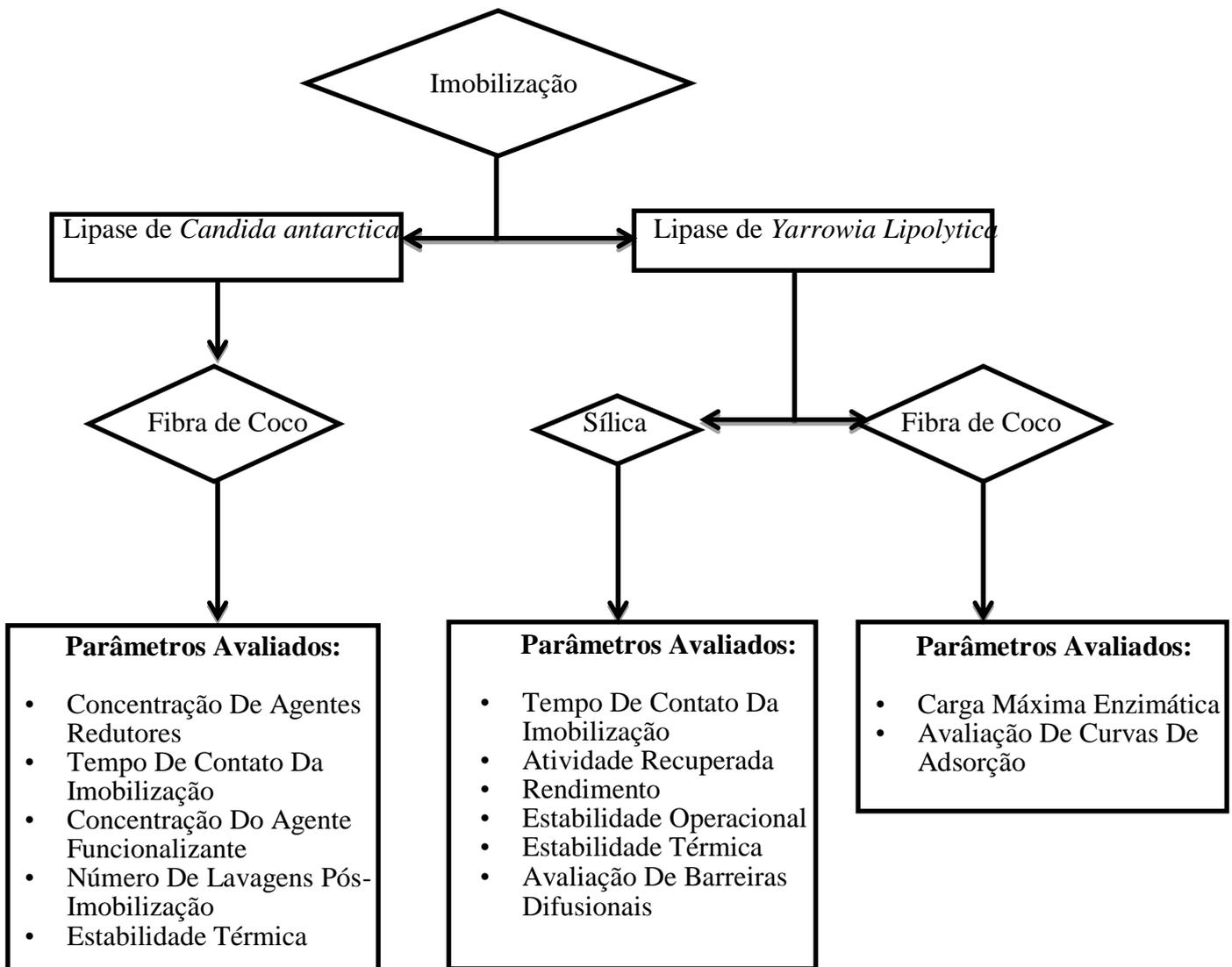
Os suportes utilizados neste estudo foram: fibra de coco verde (um resíduo agroindustrial) e sílica (suporte comercial) A fibra de coco foi utilizada neste estudo pois, sendo um resíduo agroindustrial, pode ser considerado um suporte de baixo custo. Além disso, o Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco, com 13% da produção mundial no período 2002 até 2011, (FAO, 2014) Portanto, se faz necessária a criação de uma disposição final correta deste resíduo. Outro principal fator é o fato da fibra de coco possuir alto teor de celulose em sua composição química, fornecendo uma grande quantidade de grupamentos hidroxila necessários para a funcionalização da fibra. Como

exemplos de resíduos da indústria utilizados como suporte podemos citar o uso da casca de arroz na imobilização de invertase (D'souza e Godbole, 2002) e sementes processadas oriundas de cervejarias para imobilização de tripsina (Rocha et al., 2005). O suporte comercial foi utilizado com o intuito de comparar os resultados obtidos neste estudo com a fibra de coco.

O presente trabalho tem então como objetivo o desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos imobilizados com o intuito de gerar um catalisador de alto rendimento, com menor custo operacional e de produção.

OBJETIVOS

O principal objetivo do presente trabalho foi a obtenção de um derivados de baixo custo com alta carga enzimática, possibilitando sua futura utilização industrial. Para atingir tal meta foram analisadas duas fontes de lipase (extrato bruto de lipase de *Yarrowia Lipolytica* e lipase B de *Candida antarctica* - CALB) em dois tipos de suportes (fibra de coco verde e sílica), conforme apresentado no fluxograma abaixo:



CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Enzimas

1.1.1. INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas, produzidas a partir do DNA e codificadas pelo RNA, especializadas na catálise em reações biológicas. Sua estrutura é formada principalmente por cadeias de resíduos de aminoácidos unidas por ligações peptídicas, podendo ser encontradas em associação a outros componentes orgânicos ou inorgânicos sendo denominadas proteínas conjugadas. Estas são consideradas um dos principais agentes de transformação celular, diminuindo a energia de ativação em reações, permitindo que ocorram dentro do limite da temperatura biológica, sem serem consumidas ou gerar alguma descaracterização do produto final (Lehninger, 2002).

O estudo da importância enzimática em reações biológicas levou à identificação de milhares de enzimas, posteriormente catalogadas em seis sub grupos pela IUBMB, sendo eles: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

As hidrolases fazem parte do grupo enzimático mais utilizado na indústria, chegando a possuir 44% de todos os biocatalisadores produzidos, sendo seguido pelas oxirredutases com 30%. Ou seja, estas duas categorias dominam grande parte do desenvolvimento tecnológico neste setor (Riebel, 2004). As hidrolases catalisam reações de hidrólise, ou seja, a quebra de uma ligação química através da ação da água. Normalmente são relevantes para o catabolismo, fornecendo nutrientes a nível assimilável pela célula. A maioria das enzimas com importância tecnológica pertencem a esta família, como por exemplo esterases, lipases, glicosidases e proteases. Hidrolases, em sua maioria, dispensam a necessidade de coenzimas, geralmente se apresentando como enzimas extracelulares e apresentam a resistência necessária para suportar as condições dos processos mais agressivos. Nas condições adequadas, esta enzima pode catalisar sua reação reversa, sendo este um de seus principais focos industriais (Illanes, 2008).

1.1.2. LIPASES

Lipases são os biocatalisadores que possuem maior representatividade comercial devido a sua fácil disponibilidade, menores custos, condições brandas de ação e ampla especificidade para substratos (Traathof et al., 2002). A IUBMB denomina as lipases como triacilglicerol esteracilhidrolases (E.C.3.1.1.3.), que possuem a capacidade de catalisar a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e longas cadeias de ácido graxo (Paques, 2006), como pode ser visto na Figura 1 (Amaral, 2007).

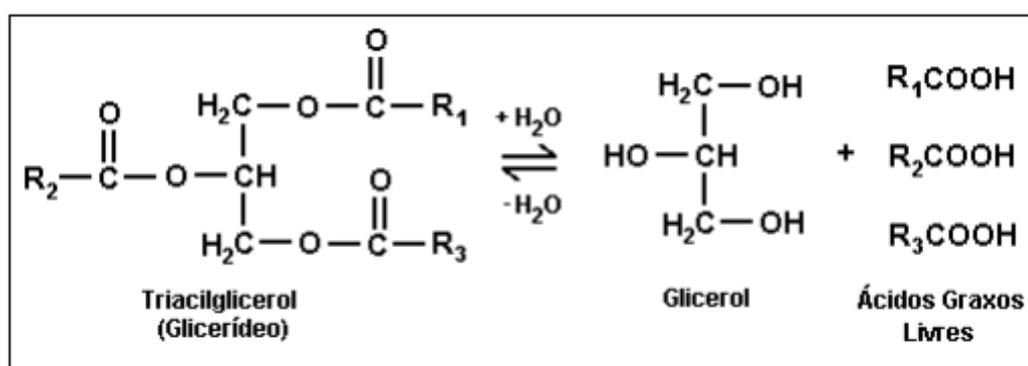


Figura 1 - Reação catalisada pela lipase.

A origem das lipases é variada, sendo encontrada em quase todos organismos vivos desde microrganismos, como por exemplo a levedura *Yarrowia Lipolytica* (Amaral, 2007) ou fungo filamentosos *Aspergillus niger* (Muruci et al., 2011), plantas da espécie *Vernonia galamensis* (Ncube e Read, 1995), até o tecido pancreático suíno. A principal fonte comercial são as lipases oriundas de microrganismos, devido a sua menor complexidade, quando comparadas com células animais ou vegetais, e portanto maior rapidez no processo de produção.

O grande potencial biotecnológico da lipase microbiana se deve principalmente a sua estabilidade em solventes orgânicos, não necessitar da utilização de cofatores, possuir grande especificidade ao substrato, exibir uma alta enantioseletividade (Poppe, 2012).

1.1.3. FONTES DE OBTENÇÃO DE LIPASE

1.1.3.1. *YARROWIA LIPOLYTICA*

Uma das fontes de lipase utilizadas neste estudo foi a cepa de *Yarrowia Lipolytica* IMUFRJ 50682, isolada da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro –RJ). O extrato bruto rico em lipase foi preparado utilizando o protocolo de produção desenvolvido por Amaral (2007).

Este microrganismo é um fungo pertencente a classe dos Ascomicetos. Sua fisiologia, morfologia e genética diferem bastante quando comparados com os de microrganismos usuais, tais como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Por tal motivo é categorizada como um microrganismo “não convencional” (Amaral, 2007), ou seja, leveduras que apresentam algum comportamento diferente ou não esperado nesta classe, sendo a levedura *Y. Lipolytica* a espécie mais pesquisada deste grupo. Após análises da *American Food and Drug Administration* este fungo foi classificado como *GRAS (Generally Regarded As Safe)* (Fontes, 2008), ou seja, normalmente não apresenta patogenicidade.

A cepa de *Y. Lipolytica*, assim como algumas outras leveduras, apresentam dimorfismo celular, ou seja, a habilidade de modificar sua forma morfológica, neste caso, alterando entre formatos ovóides e hifas alongadas. Suas apresentações podem ser visualizadas na Figura 2 (Nunes, 2011). As fotos foram feitas através de microscopia óptica com magnificação de 400 vezes. O quadro A apresenta as formas ovóides e o quadro B apresenta as hifas.

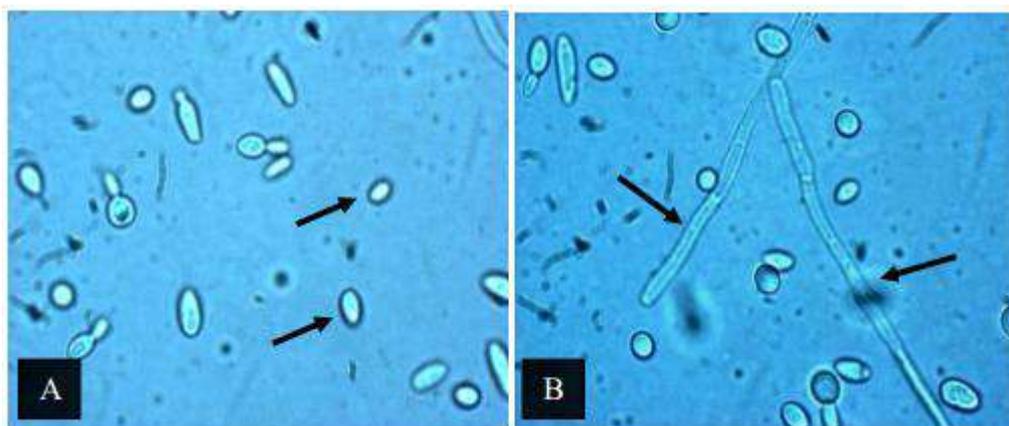


Figura 2 - Imagem de microscopia óptica de *Y. Lipolytica* em aumento de 400x apresentando células ovoides (A) e hifas (B)

Conforme citado acima, o gênero *Yarrowia*, como a maioria das leveduras “não convencionais”, apresenta a obrigatoriedade da respiração aeróbia para a utilização do açúcar fornecido no meio de produção. *Yarrowia Lipolytica* não apresenta repressão catabólica, ou seja, mesmo com altos níveis de açúcares no meio, suas propriedades mitocondriais não são afetadas (Amaral, 2007)

A lipase gerada pelo microrganismo em questão apresenta a massa molecular entre 38,5 e 44 KDa. Possuindo uma faixa ótima de pH entre 6 à 10, com valores de atividade máxima atingidos em pH 6,7 e 9. A enzima produzida é considerada uma mesófila, possuindo atividade máxima na faixa de 28°C à 55°C. Além dos pontos supramencionados, ela possui estereoespecificidade, ou seja, as lipases de *Y. Lipolytica* estudadas são 1,3 específicas (Brigida, 2010). Dentre as aplicações da lipase de *Y. Lipolytica* tem-se:

- Tratamento de soro de queijo (Vieira, 2013);
- Desenvolvimento de biosensores potenciométricos (Melo, 2012);
- Bioremediação através da degradação de óleo cru (Ferreira, 2009);
- Produção de Biodiesel (Tavares, 2014);

1.1.3.2. *CANDIDA ANTARCTICA*

A cepa de *Candida antarctica* possui características próximas de *Yarrowia Lipolytica*, ou seja, é uma espécie de levedura da família dos Ascomycetos, entretanto, apresenta metabolismo aeróbio facultativo. Também possui a capacidade da realização de dimorfismo (Silva, 2011), necessitando apenas de um estresse celular para que o evento ocorra, como variações no teor de nitrogênio ou dificuldade na obtenção de substrato. A produção da forma unicelular é estimulada através de utilizações de baixas temperaturas, pH mais ácido e altas concentrações de glicose. Entretanto, microrganismos do gênero *Candida* podem apresentar patogenicidade (Silva, 2011).

A lipase de *Candida antarctica* produz dois tipos de lipase denominados A e B, onde as mesmas se diferenciam por pontos isoelétricos (P.I.) sendo o P.I. do tipo A em pH 7,5 e do tipo B em pH 6 e massas molares (M.M.) sendo a M.M. do tipo A

45 KDa e do tipo B 33 KDa, como pode ser visualizado no trabalho de Brígida (2006).

Além dos dados descritos, também podemos destacar diferenças na seletividade dos tipos de lipase produzidas. Segundo os dados apresentados por Xavier (2013) as lipases do tipo A e B podem ser classificadas por sua seletividade. Sendo o tipo B a mais seletiva e a tipo A menos seletiva, quando comparadas entre si, ou seja é 1,3 específica em triglicérides e apresenta estereo-seletividade.. A lipase do tipo A, em contrapartida à sua menor seletividade,, apresenta maior resistência frente a variações de temperatura. Já a lipase do tipo B é mais seletiva, considerada bastante estereoespecífica em hidrólises e sínteses orgânicas (Brígida 2006), favorecendo um produto mais puro e com menor presença de subprodutos.

A lipase da levedura *Candida antarctica* já é amplamente difundida pela indústria. Seja em sua forma livre, ou em forma imobilizada por empresas como Novozymes®, Boehringer Mannheim® e Roche Diagnostics® (Brígida, 2006). As enzimas produzidas podem ser utilizadas em reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com estudos reportando também a possibilidade da aplicação em fluidos supercríticos (Foresti e Ferreira, 2005) e em reações sem solventes (Feihmann, 2005).

A preferência industrial por este fungo se dá principalmente devido às características da lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB), como sua capacidade de utilização em variados substratos, por exemplo reações com álcoois terciários e estericamente impedidos, estabilidade em pH's ácidos (Lock, 2007), tolerância a meios não aquosos, resistência a desativação térmica(Almeida, 2011). Dentre as aplicações de CALB tem-se:

- Síntese de ésteres metílicos para utilização na produção de biodiesel (Poppe, 2012);- Síntese de lactato de butila (Pirozzi e Greco Junior, 2004).
- Síntese de ácidos graxos a partir da hidrólise de óleos (Messias et al., 2011);
- Síntese de ésteres de vitaminas (Adamczak et al., 2005);
- Esterificação de açúcares (Fernandez-Lorente et al., 2003) e glicidol (Palomo et al., 2005);
- E também a possibilidade da aplicação em fluidos supercríticos (Foresti e Ferreira, 2005) e em reações sem solventes (Feihmann, 2005)

1.2 IMOBILIZAÇÃO

1.2.1. INTRODUÇÃO

Enzimas imobilizadas são as que se encontram confinadas fisicamente ou retidas em algum ponto fixo, preservando sua atividade catalítica e podendo ser reutilizadas. Dentro dos parâmetros de caracterização da IUPAC para os métodos de imobilização existentes, podemos apresentar a figura abaixo (IUPAC, 1995; Figura 3):



Figura 3 – Métodos de imobilização enzimática. Fonte: Brígida, 2010.

A forma como as enzimas serão imobilizadas depende do método utilizado, pH, propriedades físicas e químicas do suporte. Além deste fato, a imobilização enzimática pode trazer como benefício modificações na estrutura tridimensional ou efeitos de conformação, de modo a aumentar a capacidade catalítica da enzima (Cardoso, 2009). Em contrapartida pode causar efeitos de microambiente e barreiras difusionais, dificultando a transferência de massa e conseqüentemente, diminuindo velocidade aparente da reação (Carvalho et al., 2006).

Devido as barreiras para a transferência de massa interna e externa do suporte a medida da atividade da enzima imobilizada é considerada uma atividade aparente, ou seja, apenas pode ser quantificado o que se encontra já disperso no meio, mas não se tem meios para calcular a atividade na matriz porosa.

Em processos de imobilização, pode ocorrer que o ancoramento da enzima altere seu sítio ativo, ou mesmo que a imobilização ocorra de uma maneira que

impossibilite o acesso do substrato ao sítio. Por tal motivo deve ser realizado sempre um estudo de percentual de atividade recuperada, que é uma relação entre a atividade apresentada pelo biocatalisador imobilizado e a atividade retida pelo suporte; e o rendimento do processo, o qual é a relação entre a atividade retida pelo suporte e a atividade total entregue no processo de imobilização (Brígida, 2006).

A imobilização permite que as enzimas sejam reutilizadas, diminuem problemas de separação catalisador-meio e fornecem uma maior retenção de atividade catalítica frente a variações de temperatura e pH. Além disso este procedimento minimiza os problemas da geração de efluentes (Carvalho et al., 2006).

Como o presente trabalho irá se utilizar de ligações por adsorção e por ligações covalentes, iremos apenas nos aprofundar nestes dois pontos.

1.2.2. ADSORÇÃO

Uma imobilização por adsorção é definida por uma enzima ligada a um suporte insolúvel através de interações iônicas, adsorções físicas, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ou uma combinação destas interações (Brígida, 2010).

Esta é a técnica mais empregada na indústria química, principalmente devido a sua facilidade, simplicidade e baixo custo (Kennedy et al, 1988; Villeneuve et al., 2000). Todavia, sua baixa energia de ligação faz com que ocorra a dessorção enzimática, quando submetidas a ciclos, variações de temperatura, pH, ou forças iônicas (Cardoso, 2009).

Diferentes parâmetros podem influenciar na quantidade de enzima imobilizada, segundo Mendes (2009), entre eles estão:

- pH – o pH do meio é uma das variáveis principais para determinação do número, da natureza das cargas sustentadas pelo suporte e das mudanças conformacionais;
- força iônica – interação realizada entre a enzima e o suporte ou entre as próprias enzimas entre si;
- Concentração de sais – sais em baixa concentração aumentam a solubilidade das enzimas;

- Temperatura – com o aumento da temperatura, aumenta a energia cinética do sistema, aumentando, em sua maioria, a probabilidade da criação de ligações.

A maior aplicação destes biocatalisadores imobilizados é em meios orgânicos, onde as enzimas não são solúveis, reduzindo o risco de dessorção enzimática (Machado, 2011).

O processo de imobilização por adsorção necessita do contato direto entre a solução enzimática, de concentração enzimática conhecida (em $\mu\text{g/mL}$ ou U/L), e uma massa específica do suporte. O contato deve ser realizado a temperatura constante. Para a adsorção de enzimas o método mais conhecido e utilizado é o banho finito, novamente devido a sua facilidade e baixo custo (Menoncin et al, 2009).

Para se avaliar o processo de adsorção, deve-se estudar a cinética do processo para cada concentração enzimática, ou seja, acompanhar a adsorção até que a mesma atinja seu equilíbrio. A análise dos pontos de equilíbrio para várias concentrações leva a construção de uma isoterma. O gráfico obtido avalia a afinidade da enzima com o suporte. Em adição, a forma da isoterma fornece uma descrição qualitativa da superfície e a capacidade de carga do suporte (Nakanishi et al., 2001).

A construção destas isotermas tem possibilitado a comparação entre diferentes suportes e a otimização dos mesmos através da aplicação de aditivos ou solventes (Rocha et al., 1998). No caso de enzimas imobilizadas, as isotermas usualmente seguem as equações de Langmuir ou Freundlich (Dalla-Vecchia et al., 2004).

1.2.3. LIGAÇÃO COVALENTE

A imobilização por ligação covalente se baseia na retenção da enzima a partir de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na enzima (Figura 4) e os presentes no suporte.

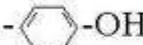
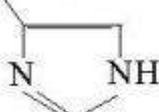
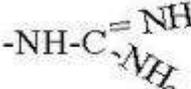
$-\text{NH}_2$	T-amino de L-lisina e grupamento amino N-terminal
$-\text{SH}$	Tiol de L-cisteína
$-\text{COOH}$	Carboxila de L-asparato e L-glutamato e grupamento carboxílico C-terminal
	Grupamento fenólico de L-tirosina
$-\text{S-S}-$	Pontes dissulfídicas de L-cisteína
$\text{CH}_3 - \text{S} -$	Tioeter de L-metionina
$-\text{CH}_2\text{OH}$	Hidroxila de L-serina e L-treonina
	Imidazol de L-histidina
	Guanidino de L-arginina

Figura 4– grupos funcionais possíveis de serem encontrados em enzimas. Fonte: Brígida, 2010

A imobilização por esta técnica é separada em duas etapas, funcionalização do suporte e posterior contato da solução enzimática com o suporte. A funcionalização a partir de ativação química é um passo que permite o suporte a ser apto para este tipo de imobilização. O tipo de grupamentos (hidroxila, carboxilas, entre outros) é o que vai definir qual método de ativação é o mais adequado para o suporte em questão (Gontijo, 2011).

Além dos grupamentos presentes no suporte ativado quimicamente, pode-se ligar a enzima a um suporte através da adição de agentes multifuncionais, como 3-glioxidopropil trimetoxisilano (GPTMS) (Brígida, 2010) e glutaraldeído (Junior, 2007), ao suporte. As ligações cruzadas entre as enzimas e o suporte acaba promovendo uma imobilização, em geral, altamente estável.

Este método possui como desvantagem a dificuldade na seleção das condições de imobilização, demandando maior tempo de estudo e pesquisa para o desenvolvimento de um protocolo, a não recuperação do suporte, devido a impossibilidade da realização de dessorção.. Além disso, a utilização de agentes funcionalizantes no protocolo promove um aumento do custo do catalisador imobilizado (Brígida, 2010).

1.3 SUPORTES

1.3.1. INTRODUÇÃO

Os suportes são materiais onde ocorre a ancoragem, encapsulamento ou ligação das enzimas no processo de imobilização (Cardoso, 2009). Suas principais características para a aplicação devem ser alta área superficial, permeabilidade, insolubilidade, composição e custo. O aumento do número de estudos nesta área se deve a necessidade da criação de suportes mais baratos ou como destino final para resíduos agroindustriais (Brígida, 2006).

Os materiais passíveis de utilização podem ser separados em sub grupos com base na composição química (orgânicos e inorgânicos) (Tabela 2); ou baseados na sua morfologia (porosos ou não porosos) (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Tabela 1 - Classificação dos suportes por composição (Messing, 1984)

Orgânicos		Inorgânicos		
Naturais		Minerais	Fabricados	
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro de porosidade controlada
Celulose	Colágeno	Poliacrilato	Bentonita	Cerâmica de porosidade controlada
Agar	Albumina	Polivinil	Homoblenda	Sílica de porosidade controlada
Amido	Seda	Nylon	Pedra-pome	Oxido de ferro

Um ponto a ser ressaltado, no caso de materiais porosos, é a verificação do diâmetro do poro. Suportes porosos possuem grande área superficial interna disponível para a imobilização, favorecendo a estabilidade do produto final, visto que o poro cria um microambiente que protege a enzima de variações externas como turbulências, temperaturas e pH. Portanto, para que a enzima possa utilizar de toda a área superficial disponível o diâmetro médio do poro deve ser maior que o diâmetro médio da enzima utilizada (Dalla-Vecchia et al., 2004). Materiais não porosos, como

por exemplo, sólidos lamelares, não apresentam efeito de resistência de massa interna, em contrapartida, apresentam baixa área superficial disponível para imobilização (Brasil, 2008).

A classe dos polímeros, sejam eles naturais ou sintéticos, está em constante crescimento no campo das imobilizações (Mateo et al., 2007). Polímeros sintéticos apresentam variedades de formas físicas e químicas, podendo ser associadas para formar o suporte ideal, como pode ser visto no estudo de Gontijo (2011) utilizando suportes sintéticos associados a fim de viabilizar a imobilização de β -glicosidase. Entretanto, polímeros naturais podem ser considerados mais vantajosos devido a sua facilidade de degradação, diminuindo os danos para o meio ambiente (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Devido a suas propriedades físicas, os suportes inorgânicos são mais apropriados para a utilização em escala industrial. Dentre as vantagens, pode-se citar: maior resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e, em alguns casos, fácil regeneração por processo de pirólise. Entretanto, a maioria dos suportes comerciais são produzidos a partir de suportes orgânicos, graças principalmente à possibilidade da inserção de grupamentos funcionais, visando à otimização do procedimento de imobilização através de ligações covalentes (Gontijo, 2011).

Dentre os suportes estudados para imobilização de enzimas, podemos citar os suportes comerciais de sílica (Vescovi, 2012), fibra de coco (Brigida 2006; 2010) e os suportes comerciais de agarose (Gontijo,2011), quitosana (Vieira,2009), 2009), Poli-hidróxibutirato (Mendes,2009), agarose (Vieira,2009) entre vários outros tipos de suportes.

1.3.2. FIBRA DE COCO – COQUEIRO ANÃO

O coco verde é amplamente produzido no Brasil para a obtenção da água de coco. A diferença deste para o coco maduro é que o primeiro é coletado antes de atingir seu estado final de maturação, aproximadamente entre o sexto e sétimo mês, no momento em que o coco possui seu maior volume de água no interior (Aragão et al., 2002). Na Figura 5 (Martins, 2010) é possível verificar que os coqueiros anão e híbrido, principais variedades utilizadas para produção de coco verde, correspondem

a 30% da produção total nacional. Já o coqueiro gigante, principal produtor de coco maduro, utilizado principalmente na culinária, apresenta 70% do total produzido.

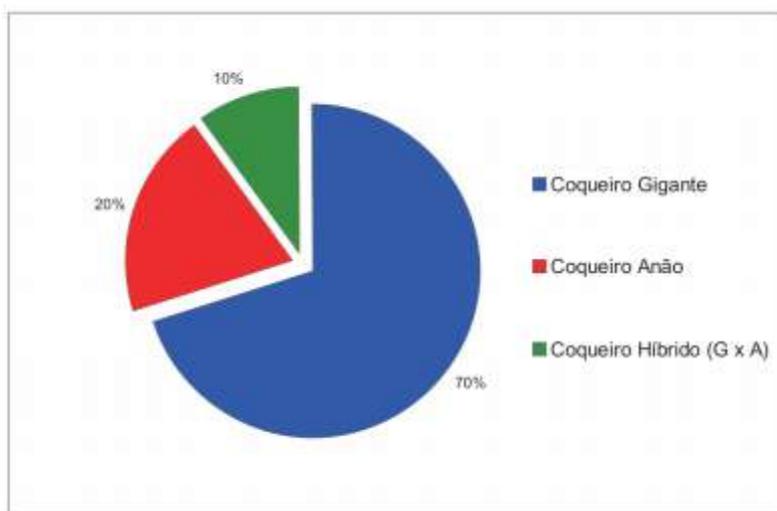


Figura 5 - Distribuição dos grupos varietais explorados comercialmente no Brasil (Martins, 2010).

A casca de coco verde, resíduo da extração/consumo de água de coco é, em grande parte, descartada. Tal geração de resíduos se apresenta como um problema para os centros urbanos, pois o material, geralmente depositado em aterros sanitários ou lixões, é de lenta degradação e volumoso (Rosa et al, 2002).

A partir da casca de coco, é possível extrair a fibra de coco. E, dentre algumas aplicações que vem sendo estudada para o aproveitamento da mesma, a literatura reporta alguns trabalhos que utilizam a fibra de coco verde como suporte para imobilização. Por exemplo, Silveira et al. (2011), produzindo um suporte de fibra de coco com lactase imobilizada, Soares (2014) avaliando a imobilização de lipase de *aspergillus niger* em diferentes tipos de suportes, dentre eles, a fibra de coco. Brigida (2006), que conseguiu um produto 363 vezes mais estável que a enzima livre, ou Cristóvão et al (2011) gerando um catalisador capaz de promover a degradação de corantes com capacidade de reutilização,

A partir da Figura 6, os principais grupos funcionais presentes na superfície da fibra de coco verde podem ser visualizados. Picos de absorvância próximo do número de onda de 3344 cm^{-1} é um sinal característico de fibras lignocelulosicas e caracteriza a vibração axial (O-H) de moléculas de celulose (Brígida, 2010). A banda 2893 cm^{-1} é o sinal característico de grupamentos (C-H); 1373 cm^{-1} é o sinal

característico de grupamentos (C-CH₃). Segundo Dam et al. (2004), a presença de bandas entre aproximadamente 1130 e 1600 cm⁻¹ são características de lignina tipo guaiacil-siringil, típico de monocotiledoneas, que é o caso do coqueiro. O sinal em 1728 cm⁻¹ significa a presença de carbonos anoméricos. Segundo Macedo (2005), bandas entre 1517 á 1447 cm⁻¹ significam o estiramento das ligações (C=C) de grupamentos aromaticos da lignina. Na fibra analisada por Brígida, estas bandas estavam deslocadas para 1508 á 1423 cm⁻¹. A banda apresentada em 1373 cm⁻¹ representa as deformações das ligações (C-H) nos grupos de celulose e hemicelulose (D’Almeida, 2007). As vibrações de esteres, eteres ou grupos fenois se apresentam no sinal 1238 cm⁻¹. Sinais referentes as deformações de ligações (C-O-C) de grupos metoila ou (C-O) presentes em celulose, hemicelulose e lignina. A presença de grupamentos (O-H) possibilita, principalmente, a funcionalização da superfície da fibra visando imobilização covalente.

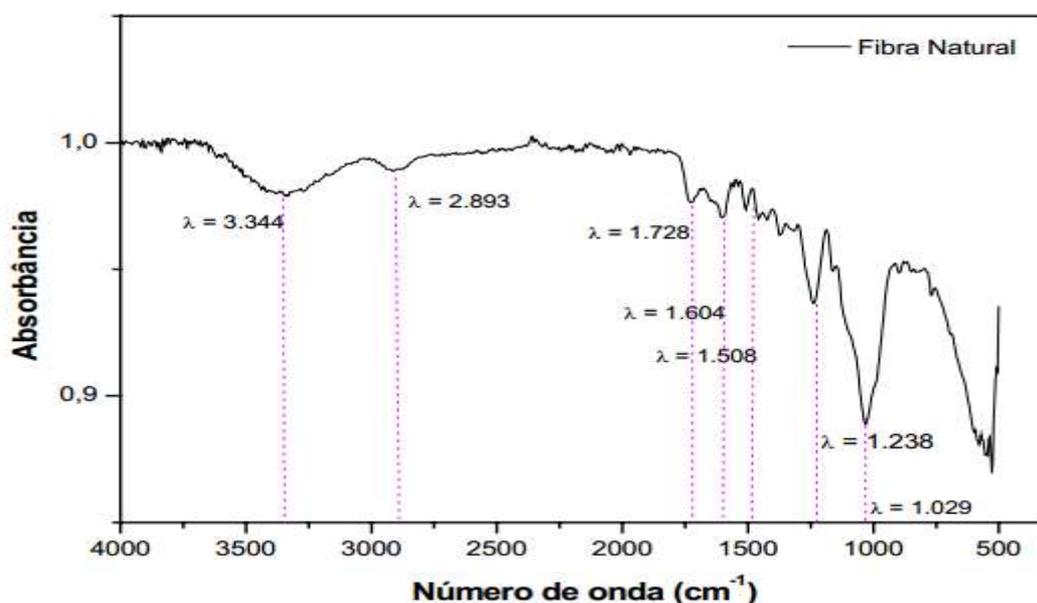


Figura 6 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da fibra de coco verde (Fonte: Brígida, 2010).

A caracterização química da fibra de coco verde foi realizada por Brígida (2010) e segue apresentada na Tabela 3. Segundo o trabalho apresentado, a fibra apresenta o valor de 82,11% de holocelulose, sendo que este é formado de hemicelulose e celulose. O valor de celulose apresentado foi de 45,93%, portanto, existe 36,18% de hemicelulose. Este valor está de acordo com a faixa de valores 14 - 30% citados por

Satyanarayana (2007). Os valores de lignina e celulose encontram-se dentro da faixa reportada para fibras de coco, segundo descrito por Rosa et al. (2002).

Tabela 2 – Teores de Lignina, Celulose e Hemicelulose da fibra de coco. Fonte: Brígida et al., 2010.

Parâmetro	Valor
Lignina Klason Solúvel	2,92% (6,73 ± 1,00 mg/L)
Lignina Klason insolúvel	40,22 ± 5,79%
Celulose	45,93 ± 1,50%
Holocelulose	82,11 ± 3,21%
Hemicelulose	36,18%

Análise morfológica da fibra realizada por Brígida (2010) mostra que a fibra possui diâmetro com valores variando de 0,069 - 0,495 mm, sendo o valor médio obtido de $0,157 \pm 0,087$ mm. A Figura 7 comprova a irregularidade da superfície das fibras com imagem da fibra de coco verde.

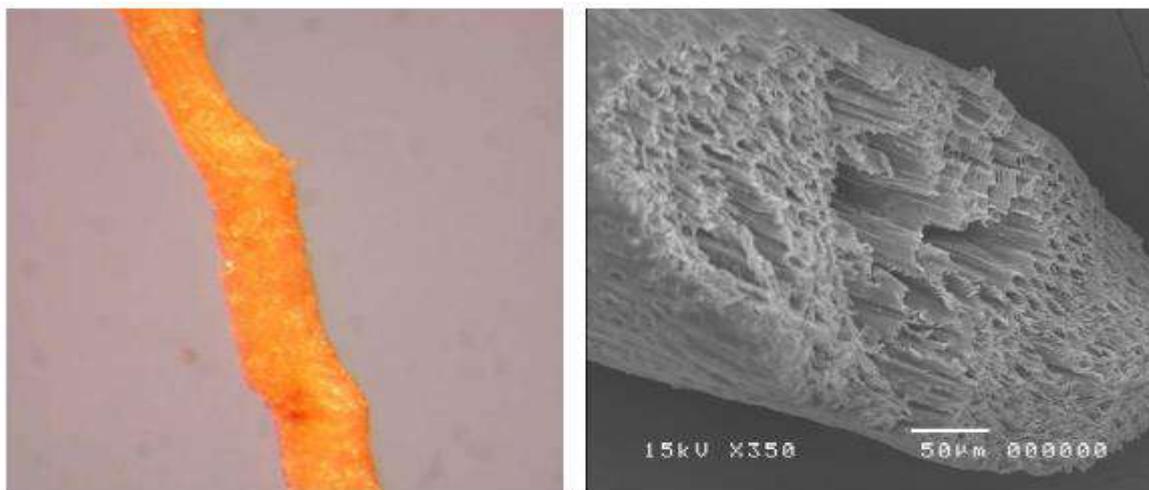


Figura 7– Fibra de coco verde. Fonte: Brígida, 2010.

1.3.3. SILICA

A sílica é um suporte comercial amplamente difundido na indústria, conhecido por sua alta área superficial, favorecendo a imobilização de grande parte das enzimas presentes no extrato enzimático.

O suporte comercial de sílica é basicamente composto por silício (Si) e oxigênio (O). O silício em muitas situações se comporta como o carbono, formando estruturas coordenadas tetraédricas, possuindo rede cristalina idêntica a do diamante. A denominação sílica compreende uma grande classe de óxidos, sendo eles com as fórmulas gerais SiO_2 ; $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Neste arranjo tetraédrico, o átomo de silício encontra sua estabilidade quando coordenado por quatro átomos de oxigênio, independentemente do estado, temperatura ou pressão do meio (Shriver, 2008).

Este suporte possui algumas importantes características:

- É considerado macro poroso, ou seja, não possui problemas relacionados a tamanho dos poros, que poderia inviabilizar a imobilização enzimática no interior da matriz de sílica;
- Alta área superficial, que permite um maior rendimento da imobilização
- Utiliza a adsorção como método de imobilização primário;
- É um suporte não iônico, o que favorece mais a imobilização pelo método de adsorção.

Variados trabalhos já se utilizaram da sílica como matriz sólida para a imobilização enzimática. Podemos citar os trabalhos abaixo:

- Comparação entre fontes de lipase e suportes (Canilha, et al., 2006)
- Produção de biodiesel através de lipases vegetais (Vescovi, 2012);
- Produção de biocatalisador a base de β -glucosidase imobilizada em sílica (Gontijo,2011);
- funcionalização da sílica e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* (Silva, 2012);

A sílica comercial foi utilizada neste estudo, pois, além de ser amplamente utilizada industrialmente, possui a hidroxila (O-H) como principal grupo funcional, assim como a fibra de coco. Portanto, também permite a funcionalização para trabalhos com imobilizações por ligação covalente.

CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. ENZIMAS

As enzimas utilizadas neste estudo foram lipases de duas fontes distintas descritas a seguir:

2.1.1.1. Lipase de *Yarrowia Lipolytica* (LYL)

O extrato bruto, rico em lipase de *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682, microrganismo isolado da baía de Guanabara (Hagler, 1981), foi obtido através de processo descrito por Amaral (2007). Inicialmente, preparou-se um pé de cuba a partir de 2 alças de cultivo sólido de *Yarrowia Lipolytica* IMUFRJ 50682 inoculada em 200 mL de meio YPD (2% de glicose, 1% de extrato de levedo e 2 % de peptona). O crescimento foi realizado a 160 rpm e 28°C por 48 horas. A partir do pé de cuba, inoculou-se um biorreator de 2L (com 1,5L de volume útil) contendo YPD (2% de glicose, 1% de extrato de levedo e 0,64% de peptona) de forma que a concentração inicial foi de 1 mg/mL de células. A produção ocorreu a 28°C, 650 rpm, 1,5 L/min de vazão de oxigênio e 20% de perfluorocarboneto (PFC). Após 24 horas de cultivo, todo o material foi centrifugado a 3000 g, 10°C, por 10 min, e posteriormente filtrado em membrana Millipore de 50 micras a fim de separar as células e obter o extrato bruto rico em lipase de *Y. Lipolytica*.

2.1.1.2. *Candida antarctica* tipo B (CALB)

A lipase de *Candida antarctica* foi utilizada com o objetivo de otimizar um protocolo já existente de imobilização por ligação covalente em fibra de coco. A solução de lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) foi gentilmente cedida pela Novozymes Latin America Ltda, Paraná, Brasil.

2.1.2. SUPORTES

2.1.2.1. Fibra de coco

As fibras de coco foram gentilmente cedidas pela Embrapa Agroindústria Tropical, sendo utilizadas apenas fibras entre 32 a 35 mesh. Antes de serem utilizadas estas foram lavadas exaustivamente com água para remoção de impurezas e posteriormente secas até peso constante em estufa a 60°C.

2.1.2.2. Silica (IB-S60S)

A sílica utilizada no estudo foi adquirida através do grupo Chiralvision. O modelo em questão é o Immobead S60S. Possui tamanho médio de partícula de 60 - 200 µm e contem 2% de água.

O suporte de sílica comercial utilizado foi utilizado pois apresenta grande área superficial, características não iônicas (favorecendo a imobilização por adsorção) e grupamentos hidroxila necessários para as reações. Este suporte foi gentilmente cedido pelo Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) por intermédio do Prof. Paulo Waldir Tardioli.

2.1.3. REAGENTES

Para as reações de hidrólise foram utilizados p-nitrofenil laurato (Fluka) e azeite de oliva (Galo) como substratos. Para determinação de proteína utilizou-se soro albumina bovina (Merck) como padrão, azul de Coomassie brilhante G-250 (Vetec), álcool etílico P.A. e ácido orto-fosfórico P.A. da Vetec. 3-Glicidoxipropil trimetoxisilano (Aldrich Chemical Co) foi utilizado como agente funcionalizante na imobilização por ligação covalente da fibra de coco. Octiltriethoxisilano gentilmente cedido pelo Departamento de Química da UFSCAR utilizado como agente funcionalizante da sílica. Outros reagentes também foram utilizados como: hexano P.A. (Synth), fosfato de sódio monobásico P.A. (Vetec), fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec), hidróxido de sódio P.A. (Vetec), periodato de sódio P.A. (Vetec), biftalato de potássio P.A. (Vetec), boro-hidreto de sódio (Vetec), fenolftaleína P.A. (Vetec), ácido nítrico P.A. (Reagen), ácido sulfúrico P.A. (ACS), dentre outros reagentes, todos de grau analítico e de marcas diversas.

2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.2.1. ATIVIDADE ESTERÁSICA EM P-NITROFENIL LAURATO

A reação de hidrólise de p-nitrofenil laurato (pNFL) foi definida como a metodologia padrão para a medida de atividade esterásica neste trabalho.

2.2.1.1. Atividade da enzima livre

A atividade enzimática foi quantificada através de um método utilizando a espectrofotometria. Uma solução de pNFL contendo 560 µM em tampão fosfato de potássio a 50 mM e pH 7 foi utilizada como substrato.

Para a produção desta solução primeiro a massa de p-nitrofenil laurato foi dissolvida em dimetilsulfóxido na proporção 0,018g/mL e então diluído no tampão.

A determinação da atividade de enzima livre foi realizada adicionando-se 0,2 mL de solução da mesma em 1,8 mL de substrato a 37°C, e, medida através da variação de absorvância em 410nm durante 100 segundos (Amaral, 2007).

O cálculo da atividade foi realizado através da equação descrita abaixo.

$$A = \frac{\Delta Abs * D * f * V_R}{\Delta t * V_A}$$

sendo:

A - a atividade da enzima (U/L), onde uma unidade (U) de atividade enzimática esterásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de p-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio;

ΔAbs - a variação de absorvância no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorvância;

D - a diluição realizada para a leitura da solução enzimática;

f - o fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol, cujo valor é 245,1 µmol/L (para cubeta de acrílico) e 136,8 µmol/L (para cubeta de quartzo) para o espectrofotômetro utilizado;

Δt - o tempo decorrido de análise, em minutos;

V_A - o volume (L) da solução enzimática utilizada no ensaio e

VR - o volume (L) do meio reacional total.

2.2.1.2. Atividade da enzima Imobilizada

No caso da medida de atividade de lipase imobilizada, 30 mL de solução de *p*NFL descrita no item 2.1.1, foram colocados em contato com 0,3 g de enzima imobilizada, sendo o sistema mantido sob agitação magnética, a 37°C, por um período de 10 minutos. A reação foi acompanhada através da leitura de absorvância realizada em intervalos de 1 minuto (Brígida, 2010).

Neste caso, o cálculo da atividade foi realizado através da equação descrita abaixo

$$A = \frac{\Delta Abs \times f \times V_R}{\Delta t * V_A}$$

sendo:

A - a atividade da enzima (U/kg), onde uma unidade (U) de atividade enzimática esterásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto nas condições propostas;

Δ Abs - a variação de absorvância no intervalo de tempo Δ t (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorvância;

f - o fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol, cujo valor é 245,1 μ mol/L (para cubeta de acrílico) e 136,8 μ mol/L (para cubeta de quartzo);

Δ t - o tempo decorrido de análise, em minutos;

VR - o volume (L) do meio reacional total e

MA - a massa, em kg, de enzima imobilizada utilizada.

2.2.2. ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM EMULSÃO

A atividade hidrolítica das lipases foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva seguindo o método descrito por Vescovi (2012). O procedimento baseia-se na hidrólise de uma emulsão azeite de oliva-goma arábica a 37°C, sendo adicionado

1 mL de solução enzimática, ou de 0,3 g de imobilizado enzimático à 9 mL da emulsão com reação por 5 min e agitação constante de 200 rpm. Após o período de incubação a reação é paralisada com a adição de 10 mL de álcool etílico. Os ácidos graxos liberados foram quantificados por titulação em titulador automático Metrohm modelo Ti-Touch 916 utilizando NaOH 0,025M.

O meio reacional foi preparado misturando-se 48 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), 30 mL de azeite de oliva, 30 mL de água e 2,1g de goma arábica. Uma unidade (U) de atividade enzimática representa a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. O cálculo da atividade foi realizado pela equação descrita abaixo:

$$\textit{Atividade} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right) = \frac{(V_A - V_B) \times N \times 1000}{t \times m}$$

Sendo:

m - massa de enzima livre ou imobilizada (mg).

N - normalidade da solução de KOH (N).

t - tempo de reação (min).

VA - volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL).

VB - volume do KOH gasto na titulação do branco (mL).

2.2.3. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NO SUPORTE

2.2.3.1. Funcionalização da fibra de coco

O processo de funcionalização da fibra de coco verde com GPTMS teve por base o protocolo desenvolvido por Brígida et al. (2007). O suporte foi ativado utilizando um processo de 4 etapas demonstradas na Figura 8.

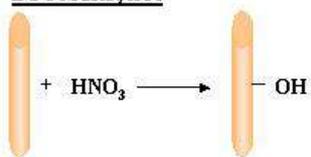
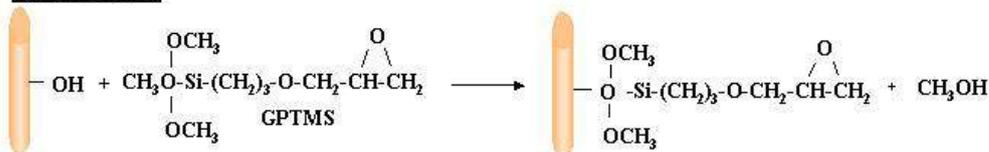
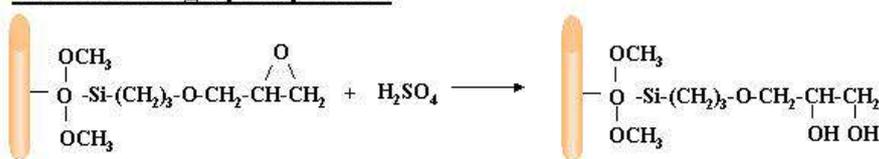
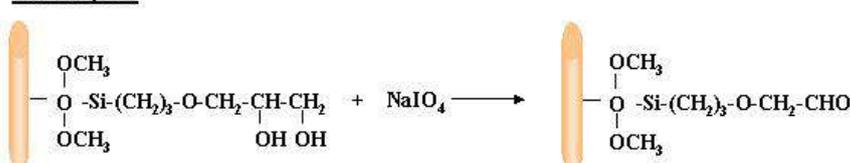
Protonação:**Silanização:****Hidrólise dos grupos epóxidos:****Oxidação:**

Figura 8 – Representação química do processo de funcionalização da fibra. Fonte: Brígida, 2006.

Para a realização da protonação das fibras, através da ativação dos grupamentos hidroxila do suporte, foram utilizados 30 mL de solução de ácido nítrico 10% (v/v) para cada grama do suporte. Em seguida foram realizadas sucessivas lavagens com ácido nítrico 10% e soluções de concentração crescente de acetona (20%, 50% e 100%) para posterior secagem em estufa a 60°C por uma hora.

Na etapa de silanização, novamente respeitando a relação de 30 mL por grama de suporte, a fibra foi posta em contato com uma solução de GPTMS com correção de pH para 8,5 com KOH. A incubação foi realizada por 5 horas a temperatura de 60°C com agitação constante. Ao final deste procedimento novamente foi realizado uma sessão de sucessivas lavagens com água destilada seguida de soluções de acetona (20%, 50% e 100%) e posterior secagem em estufa a 60°C por uma hora.

A hidrólise dos grupos epóxidos foi realizada, novamente respeitando a relação de 30 mL por grama de suporte, através do contato do suporte com uma solução de ácido sulfúrico 0,1 M com tratamento por 2 horas a 85°C com agitação constante e posterior lavagem com água, soluções de acetona e secagem em estufa a 60°C por uma hora.

A etapa final da funcionalização é a formação de terminações aldeídicas, através da oxidação do suporte com uma solução de periodato de sódio 40 mM. A relação solução/suporte neste caso é diferente sendo de 5 mL de solução para cada grama de suporte. A oxidação foi realizada a temperatura ambiente por uma hora, sendo a fibra posteriormente lavada exaustivamente com água destilada. Em seguida o suporte foi lavado com tampão fosfato 5 mM pH 7, respeitando a relação de 30 mL para cada grama de suporte, e posterior secagem a vácuo.

2.2.3.2. Funcionalização da sílica

O suporte de sílica (IB – S60S) foi ativado com o agente funcionalizante octiltrietoxissilano (C8 – TEOS), visando aumentar a hidrofobicidade do suporte, através da incorporação de grupamentos octil a matriz de sílica (Tonhi, 2002). O processo se baseia na reação da sílica com a solução do reagente em coluna de refluxo por 3 horas a 85°C, mantendo uma relação de 10mL de uma solução de octiltrimetoxissilano com hexano para 1g de sílica.

Após o final do processo, deixa-se o suporte em estufa até peso seco, devendo ser posteriormente armazenado em temperaturas baixas (Gontijo, 2011).

2.2.3.3. Tratamento químico das fibras com peróxido de hidrogênio

Para a oxidação da fibra de coco verde foi utilizado o protocolo relatado por Brígida et al. (2010), 100 mL de uma solução contendo 0,05g de NaOH e 18 mL de peróxido de hidrogênio (30% v/v) foi preparada. 2 g de fibra, previamente lavada com água, foram adicionados a 40 mL da solução, sendo deixado em banho-maria a 85 °C, sob agitação, por 2 horas. Posteriormente, uma lavagem com 200 mL de água quente (temperatura entre 90 e 100 °C) e água fria (a temperatura ambiente, 25 °C) em excesso foi realizada. Por fim, secou-se em estufa a 60 °C até peso constante.

2.2.4. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

2.2.4.1. Adsorção

A imobilização da lipase por adsorção (LYL em fibra de coco natural, fibra de coco tratada com peróxido e sílica funcionalizada) ocorreu a temperatura ambiente, por períodos de tempos definidos, fazendo-se uso da técnica de banho finito. O banho finito

foi realizado em seringas de 5 mL com agitação controlada por agitador rotativo, conforme demonstrado na Figura 9.



Figura 9 – Agitador rotativo utilizado durante a imobilização

A proporção enzima-suporte utilizada para imobilização foi a mesma descrita por Brígida et al. (2008), ou seja, para cada grama de suporte, devem ser utilizados 10 mL da solução contendo lipase em tampão fosfato 25 mM, pH 7. Após a adsorção, a solução sobrenadante é separada do suporte através de filtração, e o derivado submetido a lavagens com o tampão fosfato de sódio 100 mM e posterior secagem a vácuo.

2.2.4.2. Ligação covalente

A imobilização pelo método da ligação covalente (CALB em fibra de coco funcionalizada) segue o mesmo protocolo da imobilização por adsorção utilizando variadas soluções enzimáticas em tampão fosfato 25mM em pH 7. Entretanto, ao final do processo, após as lavagens com o tampão 100 mM e posterior secagem a vácuo, deve-se realizar as reduções das bases de Schiff geradas. Isto é realizado através da adição da solução de borohidreto de sódio em variadas concentrações ao suporte. Este contato da solução – suporte deve ser realizado por 30 minutos e a 4°C. Após o contato deve ser novamente realizada a lavagem com tampão 100 mM.

2.2.5. VARIÁVEIS DE RESPOSTA

2.2.5.1. Rendimento de imobilização

Além de acompanhar a atividade no biocatalisador gerado é necessária a informação do rendimento da imobilização. O rendimento de imobilização (R) pode ser definido como a quantidade de enzima teoricamente imobilizada no suporte. Ou seja, o percentual de enzimas que foram imobilizadas no suporte versus a quantidade de enzimas presentes na solução disposta para a imobilização, conforme equação abaixo:

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

Sendo:

Ats a atividade esterásica medida no sobrenadante após um dado período de imobilização (U);

Atb a atividade esterásica medida numa solução “branco” de mesma concentração inicial que a solução destinada a imobilização após o mesmo período destinado a Ats (U);

2.2.5.2. Atividade recuperada

Como o rendimento da imobilização, a atividade aparente (Atrecuperada) é outro cálculo necessário para avaliar a efetividade da imobilização. Neste cálculo consegue-se avaliar o percentual de enzimas que foram imobilizadas de forma eficiente, ou seja, sem alterar seu sítio catalítico. Portanto, é a relação de quantas, das enzimas teoricamente imobilizadas, se encontram ativas. A equação abaixo quantifica este valor:

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

Sendo:

Atd a atividade hidrolítica medida no derivado (U/g);

At0 a atividade hidrolítica na solução inicial de enzima (U);

Ms massa do derivado (g);

R o rendimento de imobilização (%).

2.2.5.3. Teor de Proteína

Para determinação do teor de proteína nas soluções enzimáticas, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado a partir da dissolução de 100 mg de azul de Coomassie em 50 mL de etanol 95% e posterior adição de 100 mL de ácido orto-fosfórico 85% (p/v). A solução final foi diluída com água destilada para um volume final de 1 L. Em um tubo de ensaio, adicionaram-se 3 mL do reagente de Bradford a 0,3 mL da amostra, agitou-se o tubo em agitador vortex e esperou-se por 2 minutos para realizar a leitura de absorbância ($\lambda = 595 \text{ nm}$) em espectrofotômetro.

Para obtenção da curva padrão da proteína, correlacionaram-se os valores de absorvância obtidos a partir da leitura de soluções de albumina de soro bovino em concentrações conhecidas de proteína, variando-se a concentração entre 0 e 300 μg de proteína/mL.

2.2.5.4. Estabilidade Térmica

Nos estudos de estabilidade térmica, a lipase (seja em seu estado livre ou imobilizado) foi suspensa em tampão fosfato 0,1M pH 7 e incubada a 60°C com posterior medida de atividade de hidrólise de p-nitrofenil laurato acompanhada ao longo do tempo. A atividade enzimática de hidrólise no instante zero foi definida como sendo 100%. Em intervalos de tempo predeterminados, a atividade enzimática, medida pelo método da atividade esterásica, foi medida e expressa em percentagens da atividade inicial. Com base no perfil de desativação térmica, foram calculadas as constantes de desativação térmica (kd), o tempo de meia vida aparente ($t_{1/2}$) e o fator de estabilização (F), sendo este último descrito por Brígida (2006) conforme a equação abaixo:

$$(F) = \frac{t_{1/2}(E_I)}{t_{1/2}(E_S)}$$

sendo $t_{1/2}$ (EI) tempo de meia vida aparente da enzima imobilizada e $t_{1/2}$ (ES) tempo de meia vida aparente da enzima solúvel, obtidas conforme descrito por Henley e Sadana (1985).

2.2.6. ESTABILIDADE OPERACIONAL

Nos estudos de estabilidade operacional, uma mesma massa de lipase imobilizada, teve sua atividade medida repetidas vezes. O processo de lavagem do catalisador entre as medidas de atividade se deu através de lavagens com tampão fosfato 100 mM pH 7 seguida de secagem à vácuo, para posterior pesagem do catalisador recuperado.

Os valores de atividades foram calculados conforme explicitado no item 2.1.2 do presente capítulo. O valor obtido na primeira medida foi definido como 100% e todos os outros expressados como percentual dele.

2.2.7. PULVERIZAÇÃO DE SUPORTES

O procedimento para a pulverização deste suporte foi desenvolvido em conjunto com o professor Paulo Waldir Tardioli da UFSCar, em São Paulo.

A pulverização tem como objetivo a cominuição dos suportes. Dessa forma, pode-se obter um suporte que apresente pouca ou quase nenhuma das barreiras difusionais apresentadas durante sua medida de atividade.

O procedimento realizado foi deixar uma amostra de suporte após o processo de imobilização suspensa em tampão fosfato em câmara fria (próximo de 0 °C) em agitação vigorosa na placa magnética. Após 24 h deve-se retirar a amostra e secá-la a vácuo.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Lipase tipo B de *Candida antarctica*

Estudos com a lipase tipo B de *Candida antarctica* (CALB) foram realizados com o objetivo de aperfeiçoar um protocolo de imobilização por ligação covalente já apresentado por Brígida *et al.* (2007). Para tanto, avaliou-se a influência do tempo de contato, da concentração de 3-glioxidopropil trimetóxi silano (GPTMS), das lavagens pós borohidreto de sódio na atividade e na estabilidade térmica da lipase imobilizada por ligação covalente.

3.1.1. Concentração de Borohidreto de sódio

Para que uma imobilização covalente ocorra, após o processo de contato entre o suporte funcionalizado com GPTMS e a enzima, devem-se reduzir as ligações de Schiff geradas a aminas secundárias (Adriano, 2004). A redução das bases de Schiff é uma reação não reversível e, portanto, promove uma ligação estável da enzima ao suporte evitando desprendimento.

O estudo da concentração do borohidreto, o agente redutor da reação, foi realizado visando a redução das ligações enzima-suporte formadas evitando perdas significativas na atividade e estabilidade das enzimas imobilizadas. O borohidreto, além de agente redutor, é responsável por converter os grupos aldeídos remanescentes no suporte após a imobilização em hidroxilas inertes (BLANCO, CALVETE e GUIÁN, 1989). Para tanto, testou-se duas concentrações de solução de borohidreto de sódio (0,5 e 1 mg/mL).

O efeito da redução da ligação na atividade do biocatalisador imobilizado foi realizado para os tempos de 2 e 4h de contato (Figura 10). Independente do tempo de contato, a atividade do derivado reduziu para 50 e 30 % da atividade inicial quando se utilizou 0,5 e 1 mg/mL de NaBH₄, respectivamente. A queda de atividade apresentada pode ser devido ao ataque do NaBH₄ às pontes dissulfeto da enzima, tornando-a inativa. Estes valores são ligeiramente menores quando comparados aos apresentados por Brígida *et al.* (2007) para concentrações de 0 a 6 mg/mL, contudo sem variação do tempo de contato. Entretanto o perfil formado pode ser considerado coerente com os dados.

Selecionando o tempo de 4h, devido a seu maior fator de estabilidade, como será esclarecido na tabela 3, visando garantir a formação das ligações covalentes, avaliou-se a estabilidade térmica a 60 °C dos 3 derivados obtidos após imobilização a pH 10 (Figura 11). Para as concentrações de 0 e 0,5 mg/mL, observou-se alta estabilidade do derivado obtido, mostrando que a ligação multipontual da lipase trouxe mais estabilidade a condições extremas. Contudo, a concentração de 1 mg/mL de NaBH₄, além de reduzir as bases de Schiff e inativado os grupamentos aldeídos remanescentes, deve ter quebrado pontes dissulfetos ou ligações peptídicas presentes na estrutura das enzimas, reduzindo a estabilidade das mesmas. Embora a concentração de 1mg/mL tenha sido utilizada para outras enzimas (Cárdias et al., 1999; Pereira et al., 1997), Brígida et al. (2007) também reportou grande perda de estabilidade quando utilizou NaBH₄ nesta concentração para CALB. Os dados da Figura 11 apresentam alta faixa de erro devido ao baixo valor absoluto de atividade enzimática aparente em suportes imobilizados em pH 10, portanto, favorecendo erros percentuais maiores.

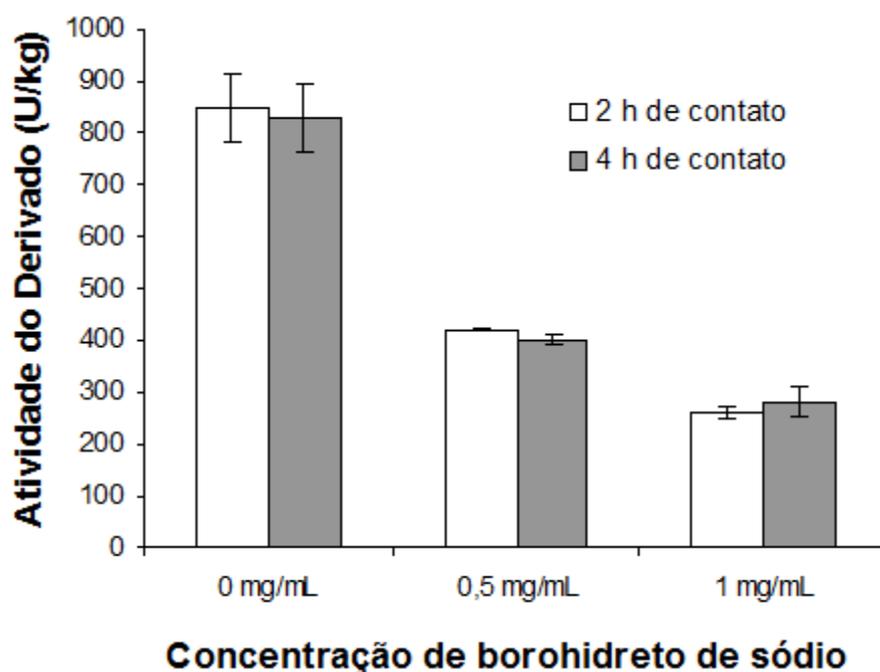


Figura 10 – Efeito da concentração de borohidreto de sódio na atividade de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 7 em fibra de coco funcionalizada com 5% de GPTMS.

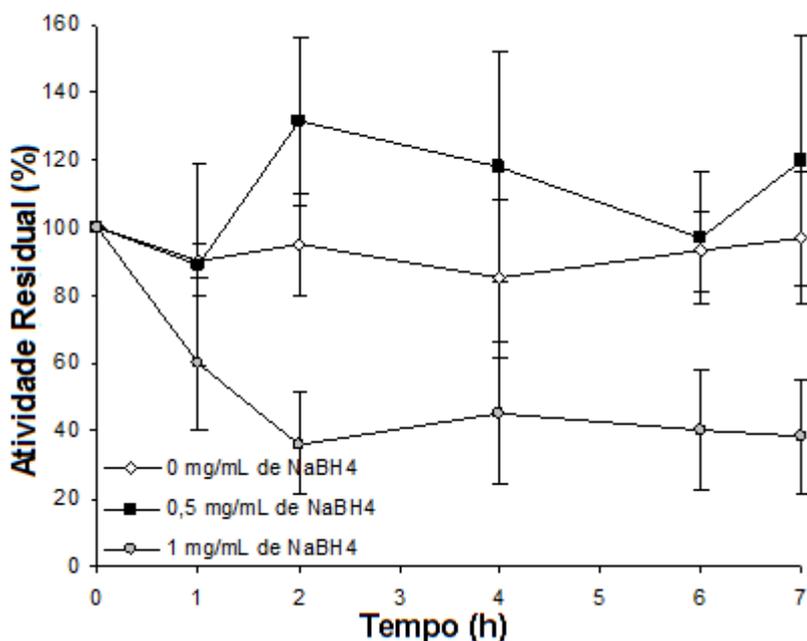


Figura 11 – Efeito da concentração de borohidreto de sódio na estabilidade térmica a 60°C de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 10 em fibra de coco funcionalizada com 5% de GPTMS .

3.1.2. Influência do Tempo de Contato

O tempo de contato enzima-suporte foi estudado visando determinar o tempo mínimo necessário para obter um derivado ativo com CALB imobilizada por ligação covalente (Tabela 4). Maior atividade foi encontrada após 6h de contato (467 U/Kg), entretanto sua estabilidade térmica foi menor quando comparada aos valores obtidos para 2 e 4h, tal queda na estabilidade pode ser justificada na formação de uma camada de enzimas adsorvidas sobre as enzimas ligadas na forma covalente, gerando um aumento da atividade aparente e uma menor estabilidade. Tais dados estão de acordo com os encontrados por Brígida (2007) para imobilizados com 0 mg ou 1,0 mg de borohidreto de sódio em CALB imobilizada em pH 7. O objetivo deste estudo foi avaliar um maior leque de opções para se otimizar este processo. Portanto, avaliando esses dois parâmetros e observando o tempo de meia vida e constante de desativação foi observado que para o tempo de 4h a enzima imobilizada após 4h de contato mostrou-se 25 vezes mais estável que a enzima livre.

Tabela 3 – Efeito do tempo de contato na atividade e estabilidade térmica de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 7 em fibra de coco funcionalizada com 5% de GPTMS.

Derivado	Ativ. do Derivado (U/kg)	t_{1/2} (h)	kd (h⁻¹)	F
CALB Livre	-	0,097	7,2	1
2h	411 ± 17	1,7	0,32	17,5 ± 0,6
4h	383 ± 30	2,5	0,26	25,5 ± 1,0
6h	467 ± 23	2	0,55	20,3 ± 0,6

3.1.3. Estudo do Número de Lavagens

O borohidreto de sódio, se não for completamente retirado durante as lavagens pós imobilização pode causar uma reação entre grupos amina da enzima com grupamentos aldeídicos do suporte, pois nenhum passo para transformar a base de schiff em ligações de aminas secundárias, mais estáveis, foram realizados. Portanto, a fim de identificar o número de lavagens com tampão fosfato que são necessárias para remoção do NaBH₄ residual que estaria em contato com o derivado após a redução das bases de Schiff, estudos comparativos após 2, 3, 4 e 5 lavagens foram realizadas avaliando a atividade final do derivado e a atividade residual (onde 100% foi considerado como a atividade do suporte imobilizado sem lavagens) deste quando submetido a 4h a 60°C em banho úmido (Figura 12). As lavagens não influenciaram no valor da atividade do derivado final, obtendo discretos aumentos devido a retiradas de NaBH₄ residual durante as lavagens que poderiam estar inibindo a atividade da enzima. Após 4 h de estudo de estabilidade térmica a 60°C, a atividade residual máxima foi de 50% no derivado submetido a 5 lavagens. Nos derivados submetidos a 2 e 3 lavagens, possíveis resíduos de NaBH₄ promoveram uma desativação de parte das enzimas imobilizadas refletindo numa atividade residual de 50 a 55%.

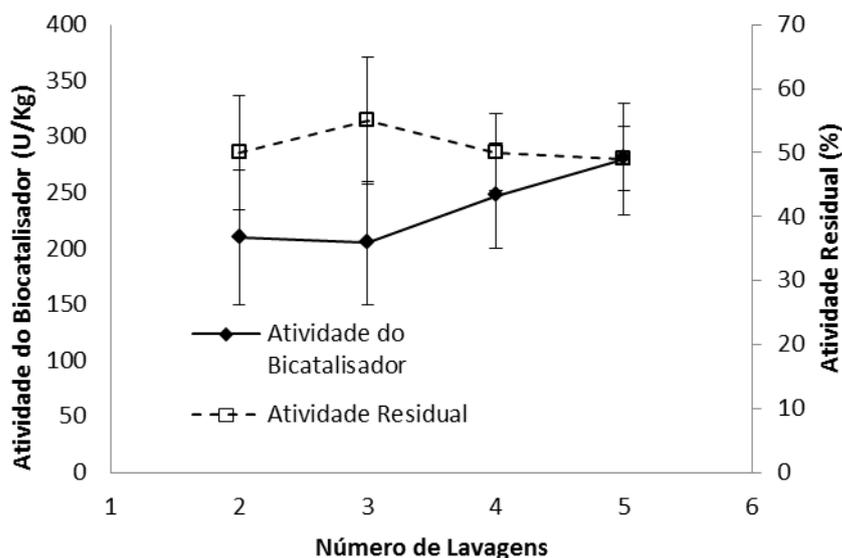


Figura 12 – Efeito do número de lavagens após tratamento com borohidreto na atividade logo após lavagem e na atividade residual após 4h a 60°C em banho úmido do derivado.

3.1.4. Efeito da Concentração de GPTMS na Estabilidade

O efeito da concentração de GPTMS na etapa de funcionalização foi avaliado visando o maior número de grupos funcionais disponíveis para a formação das bases de Schiff entre a enzima e o suporte. Estudos da concentração de grupamentos aldeídos formados a diferentes concentrações de GPTMS oferecidas mostraram o mesmo valor de aproximadamente 132 μmol de CHO/g, independente das concentrações de GPTMS utilizada. Este valor foi próximo a valores obtidos por Pereira (1997) e Brígida (2006) quando utilizaram 5% de GPTMS na funcionalização de sílica e fibra de coco respectivamente. Contudo, Othman e Apblett (2009), em material mesoporoso, conseguiram um suporte com 4500 μmol de CHO/g (ligação aldeídica), fazendo uso de outra metodologia de funcionalização. Com o aumento da concentração de GPTMS, também não foi observado variações nas atividades finais dos derivados obtidos após imobilização em pH 6, o que dá indícios de que não houve diferença entre os suportes funcionalizados. Em contraponto, Lathouder (2008) verificou um aumento na atividade da enzima imobilizada em diferentes funcionalizações com GPTMS.

Para garantir que não há diferença entre os derivados obtidos por imobilização a pH 7 e pH 10, foram realizados (Figura 13 e 14). Os derivados obtidos em pH 7 mostraram perfis de estabilidade semelhantes, independente da concentração de

GPTMS utilizada para funcionalizar. Quando imobilizado a pH 7, tem-se o favorecimento apenas de 1 ligação covalente entre a enzima e o suporte, de forma a considerarmos uma imobilização por ligação uni pontual. Como não se observou diferença na atividade do derivado, era de se esperar que os derivados apresentassem perfis semelhantes haja vista estarem ligados apenas por 1 base de Schiff ao suporte. Pereira (1997) observou uma redução na estabilidade térmica em derivados de sílica obtidos com altas concentrações de GPTMS. Contudo, nesse caso, houve diferença nas concentrações de grupamentos aldeídos nos suportes funcionalizados.

A lipase CALB, quando imobilizada a pH 10, tem outros grupamentos amins dos resíduos de lisina disponibilizados para reagir com o grupamento aldeído do suporte (Pereira, 1996). Logo, quanto maior a concentração de grupamentos aldeídos disponíveis para ligação, maior o número de bases de Schiff formadas numa mesma molécula de enzima, de forma a considerarmos uma imobilização por ligação multipontual. Ao avaliar a estabilidade térmica dos derivados obtidos a pH 10 (Figura 14), observou-se que também não houve influência da concentração de GPTMS haja vista a alta estabilidade com 1% de GPTMS. Os derivados obtidos em pH 10 neste trabalho foram mais estáveis do que os obtidos por Córdias et al. (1999), onde se observou tempo de meia-vida de 3h, também apresenta maior tempo de meia vida quando comparado com os dados obtidos para CALB em pH 10 com 1,0 mg/L de NaBH₄ em Brigida et al. (2007), onde este apresentou valores menores que 2 h. Portanto, foi determinado que a concentração ótima de GPTMS foi de 1% devido a seus perfis próximos, quanto comparados com as maiores concentrações, seu alto custo e toxicidade.

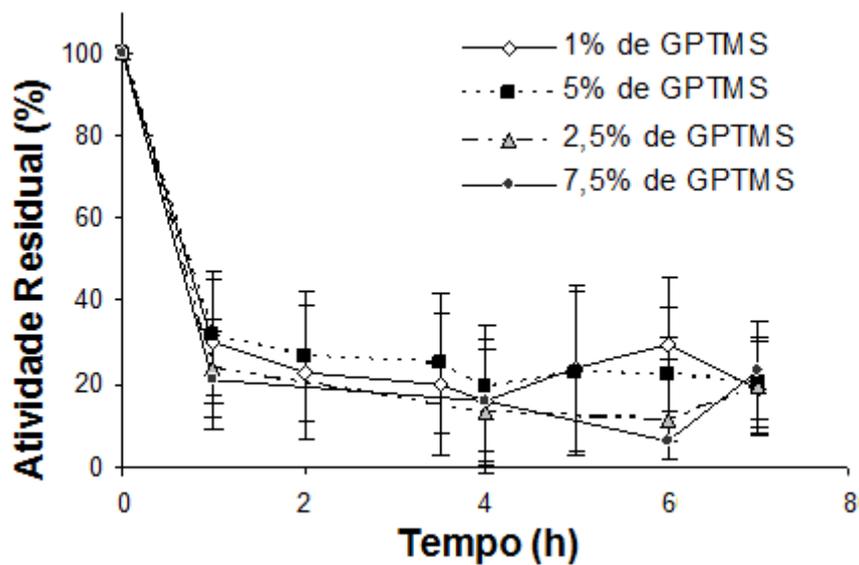


Figura 13 – Efeito da concentração de GPTMS na estabilidade de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 7 em fibra de coco.

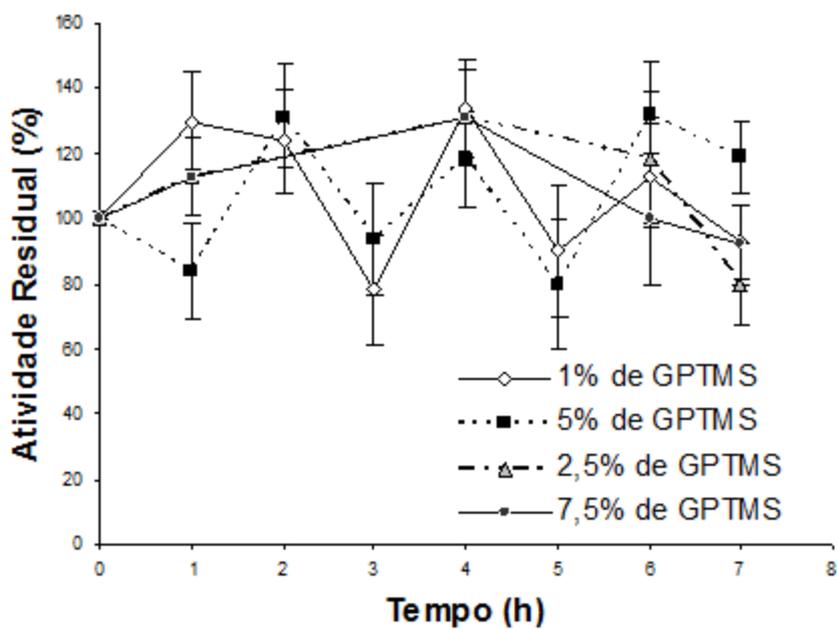


Figura 14 – Efeito da concentração de GPTMS na estabilidade de CALB imobilizada por ligação covalente a pH 10 em fibra de coco.

3.2. Lipase de *Yarrowia Lipolytica*

Os trabalhos com o extrato bruto de lipase de *Yarrowia Lipolytica* IMUFRJ 50682 (LYL) foram realizados com o intuito de gerar um biocatalisador de baixo custo com alta atividade aparente e estável, sendo portanto passível de ser utilizado pela indústria. Para tanto o estudo utilizou a imobilização por adsorção, para redução dos custos e dois tipos de suporte: a fibra de coco verde, rejeito agroindustrial de baixo custo; e a sílica, suporte com alta área superficial para imobilizações.

3.2.1. Imobilização em fibra de coco.

O trabalho apresentado por Brígida (2010) abordou a imobilização de LYL utilizando baixa carga enzimática, verificando que a atividade do biocatalisador atinge um máximo durante seu processo de imobilização seguido de uma posterior queda. Este efeito pode ser atribuído à presença de outras enzimas ou proteínas no meio. Portanto o que está ocorrendo é uma provável imobilização seletiva ao final do processo. Para entender melhor o processo de imobilização e buscando a saturação do suporte, realizou-se o estudo de imobilizações em altas concentrações enzimáticas.

3.2.1.1. FIBRA DE COCO NATURAL

Com o objetivo de verificar o efeito do aumento da carga enzimática foi realizado um estudo cinético de adsorção utilizando concentrações enzimáticas iniciais de 100 a 2500 U/L.

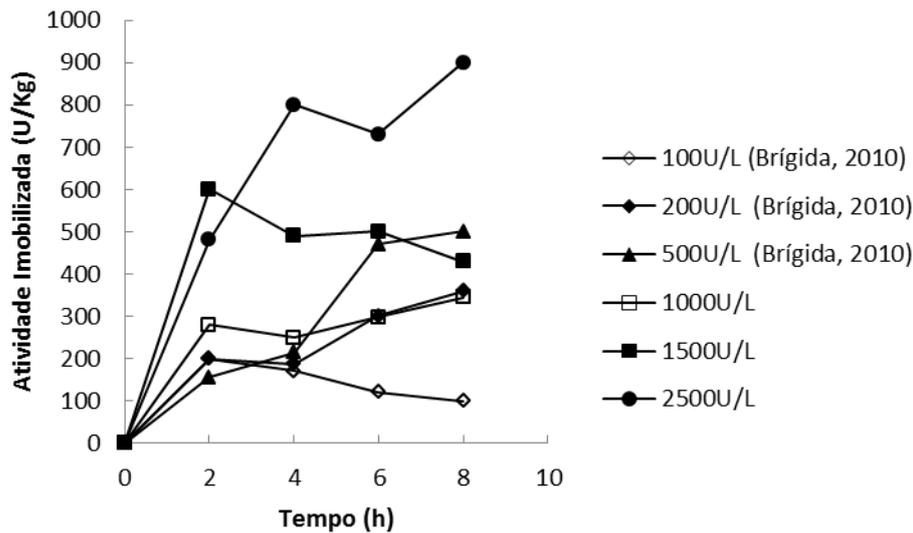


Figura 15 - Cinética de adsorção de lipase de *Y. Lipolytica* em fibra de coco verde natural.

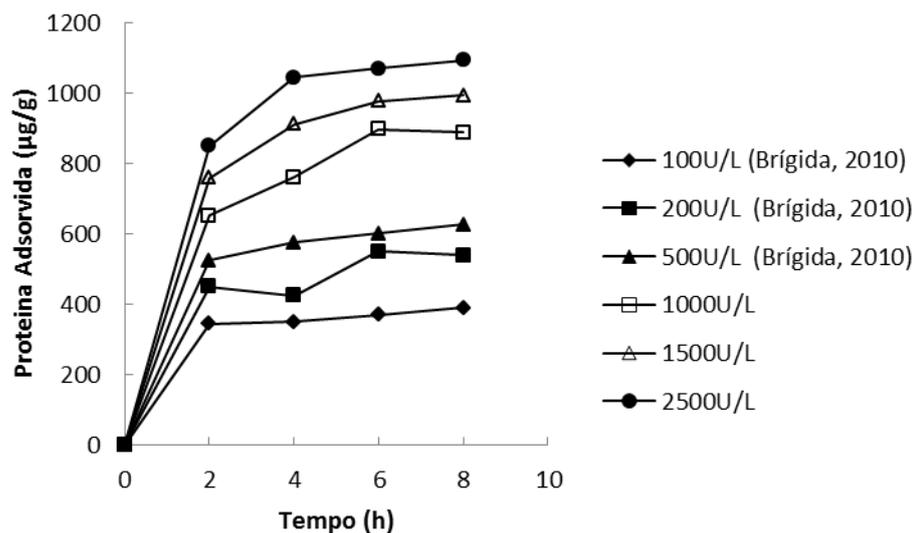


Figura 16 - Cinética de adsorção proteica de lipase de *Y. Lipolytica* em fibra de coco verde natural.

Em maiores concentrações pode-se verificar a presença de um patamar de atividade próximo de 600 U/Kg, enquanto pode ser observado na figura 16 que a proteína adsorvida ainda não atingiu uma constante, mantendo seu perfil com um crescimento positivo. Como observou-se atividades dos derivados crescente com as

concentrações iniciais de enzima utilizadas, associados ao fato da não estabilidade da proteína adsorvida no período de tempo de 10 h, estudos com maiores concentrações enzimáticas devem ser realizado para obter a carga máxima do suporte.

Além disso, pode-se observar que tal patamar aparenta ser uma adsorção seletiva do suporte por outras proteínas do meio, que não as lipases. O pico de atividade seguido de posterior queda corrobora com tal teoria. O perfil também foi apresentado nos experimentos de Brígida (2008) em seu estudo da imobilização de altas concentrações de CALB (30, 60, 90 U/mL) por adsorção em fibra de coco verde, enquanto a quantidade de proteínas adsorvidas permanece em uma crescente constante. Tal efeito seletivo já foi analisado por Silva (2005) em imobilizações por adsorção utilizando glutaraldeído.

3.2.1.2. FIBRA DE COCO TRATADA COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Com o objetivo de verificar o efeito do aumento da carga enzimática na adsorção de LYL em fibra tratada com peróxido de hidrogênio, foi realizado um estudo cinético para concentrações enzimáticas iniciais de 500 a 2500 U/L.

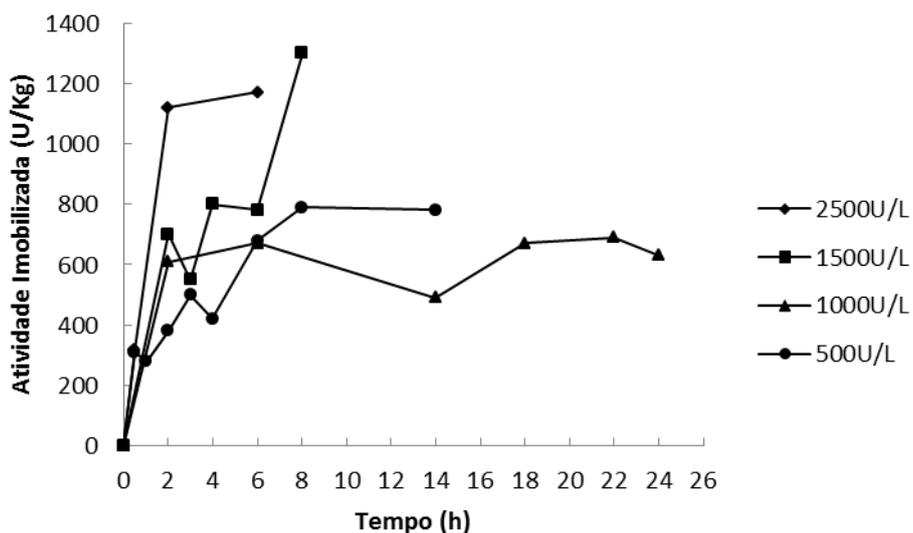
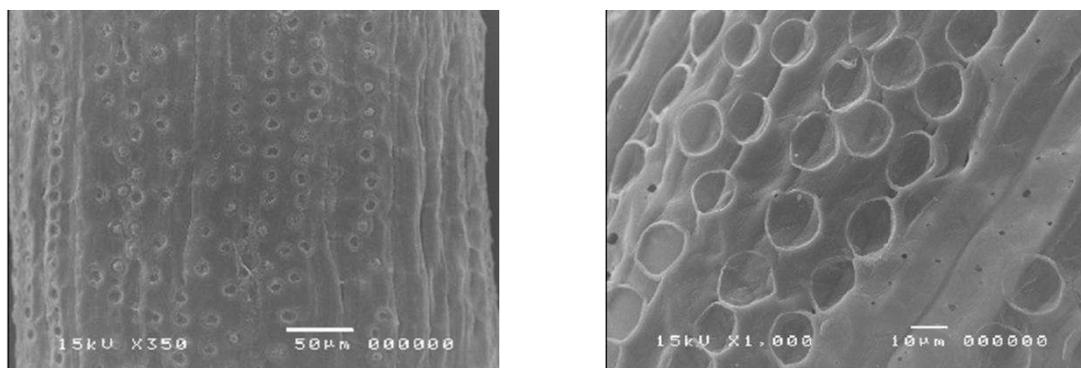


Figura 17 - Cinética de adsorção de lipase de *Y. Lipolytica* em fibra de coco modificada com peróxido de hidrogênio.

Primeiramente foi observado que o tratamento químico no suporte aumentou a carga de enzima imobilizada (1200 U/kg) em comparação aos dados obtidos para fibra natural (900 U/kg). Tal comportamento pode ser creditado ao fato de que após o

tratamento, a fibra obteve levemente aumento de sua área superficial através da limpeza química promovendo uma maior área disponível para a adsorção ou mesmo expondo pontos de maior afinidade enzima-suporte. Através de uma microscopia eletrônica para análise superficial da fibra, comparando novamente a fibra antes e após o tratamento químico, pode-se verificar um aumento significativo da área superficial.



(a) Natural

(b) Oxidada

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de fibra de coco: (a) natural e (b) tratada com peróxido de hidrogênio. (Brígida, 2010)

Novamente foi observado à presença de um patamar de atividade máxima, em 2 h para algumas concentrações. Entretanto, ainda não foi possível determinar a carga máxima para este suporte, merecendo um estudo mais profundo com maiores concentrações iniciais e tempos de contato. Ao compararmos com os dados obtidos por Brígida (2010), onde foi realizada um estudo cinético da adsorção de solução de 500 U/L de CALB em fibra de coco oxidada podemos notar que seu pico de atividade máxima ocorre em 1 hora de contato, já no estudo com 500 U/L de LYL observa-se uma constante crescente até se atingir o patamar após 8 horas de imobilização. Ou seja, do pool enzimático existente no extrato de LYL utilizado pode-se inferir que as enzimas mais seletivas para o substrato deste estudo são preferencialmente imobilizadas após um maior período de tempo, entretanto, para o caso da CALB pode-se inferir a presença de algum tipo de imobilização seletiva, e por isso, ocorre uma queda em seu poder catalítico quanto maior o período de imobilização.

3.2.1.3. IMOBILIZAÇÃO DE LYL EM FIBRA NATURAL X TRATADA COM H₂O₂

Ao final desses estudos foram construídas as isoterma de adsorção para os dois suportes estudados (fibra de coco natural e fibra de coco tratada com peróxido de hidrogênio), tendo como base a atividade aparente do catalisador ao final do processo e a quantidade de proteína adsorvida, como demonstrado abaixo nas Figuras 19 e 20.

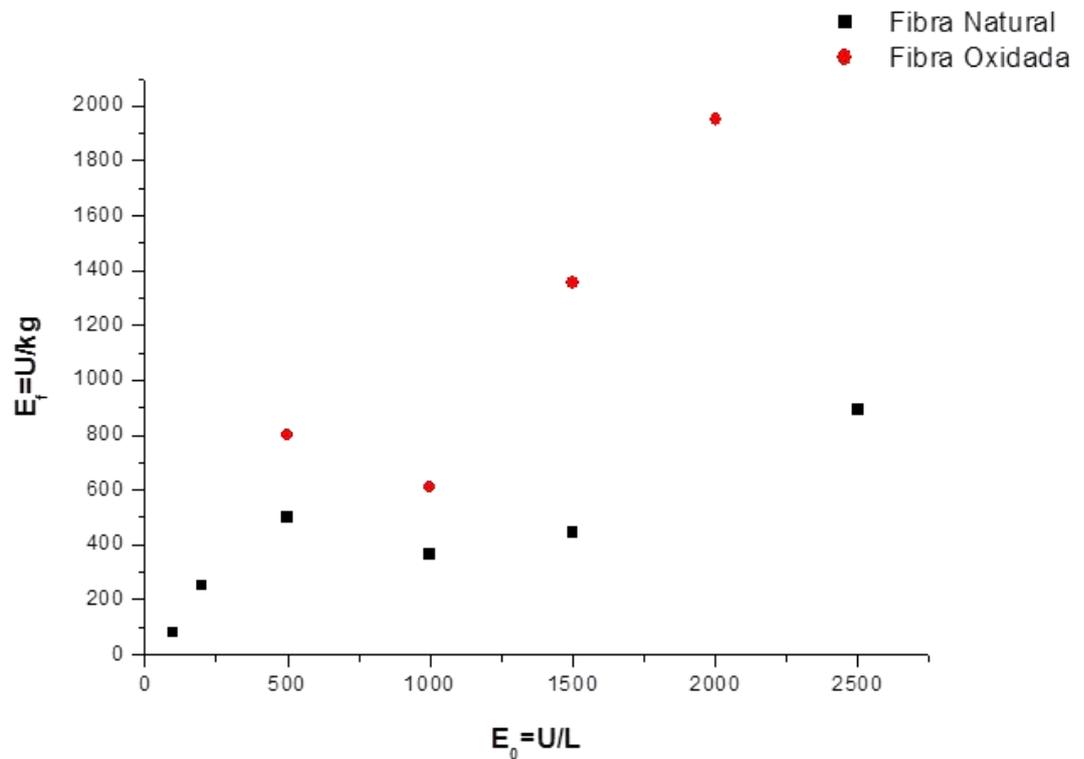


Figura 19 - Isoterma de adsorção com base na atividade de lipase de *Y. Lipolytica* imobilizada em fibra de coco natural e oxidada.

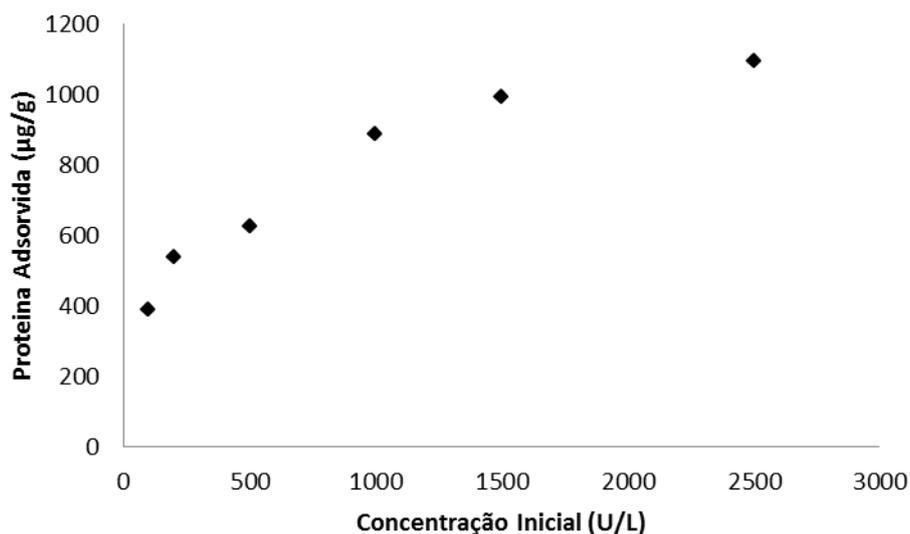


Figura 20 - Isoterma de adsorção com base na proteína adsorvida de lipase em fibra de coco natural.

A isoterma de adsorção com base na proteína adsorvida, apresentada na figura 20 se adequa a parâmetros conhecidos como os de Langmuir utilizados por Oliveira (2011). Já a figura 19, comparando as isotermas de adsorção com base na atividade obtida após a análise dos dados das cinéticas de adsorção de LYL em fibra de coco verde natural e tratada quimicamente possuem um perfil mais próximo ao linear, conforme apresentado por Anastácio (2004). As isotermas da figura 20, com fibra natural e tratada apresentam o mesmo perfil em atividades baixas, sendo isto devido a possíveis preferências proteicas da fibra. O perfil difere em maiores concentrações enzimáticas devido a exposição de sítios de afinidade e maior área superficial da fibra oxidada, favorecendo um aumento de atividade para a fibra tratada quimicamente.

3.2.2. Estudo do processo de imobilização em suportes de sílica

Os estudos utilizando o suporte de sílica foram produzidos devido à previamente discutida área superficial existente na sílica, além disso, devido a sua facilidade de trabalho, não toxicidade e sua já usual utilização em estudos visando a aplicação industrial (Gontijo, 2011). Tais fatores favorecem a obtenção de um biocatalisador com maior atividade aparente, e diminuição dos custos através da utilização da lipase de *Yarrowia*.

3.2.2.1. CINÉTICA DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

Durante a cinética de imobilização foram avaliadas as atividades enzimáticas no derivado gerado e no sobrenadante obtido ao final do processo. Os resultados, medidos através da hidrólise da emulsão do azeite de oliva, podem ser analisados nas Figuras 21 e 22.

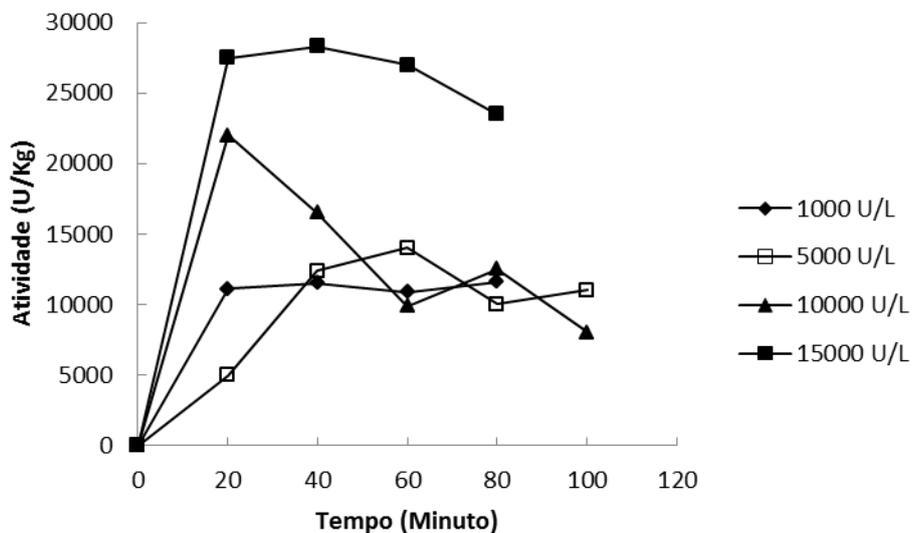


Figura 21 – Cinética de adsorção de lipase de *Y. Lipolytica* obtida a partir de extrato bruto e imobilizada em suporte de sílica ativada

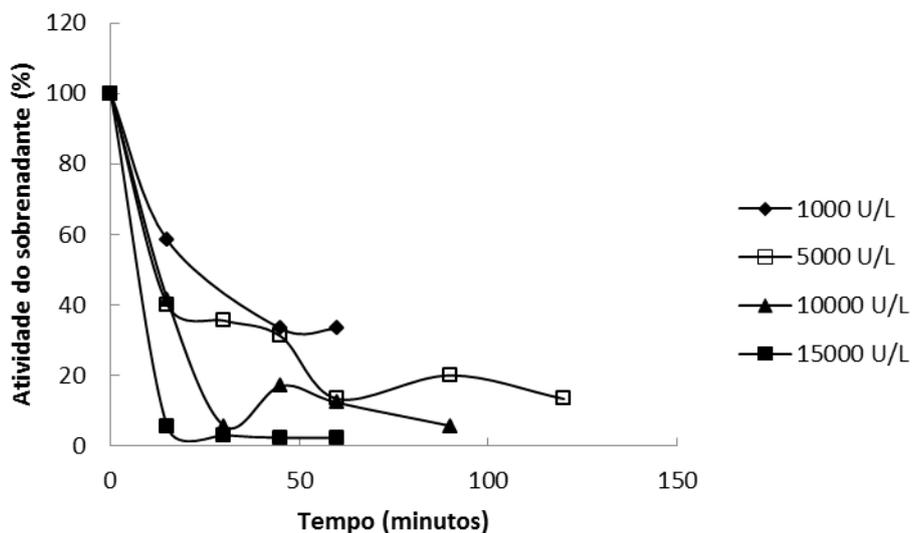


Figura 22 – Atividade hidrolítica apresentada no sobrenadante após a imobilização.

Os resultados demonstram uma alta atividade no derivado em baixos tempos de imobilização e posterior queda, principalmente visualizado na solução inicial de 10000 U/L. Tal fato pode ser explicado através de uma possível barreira difusional, descrita por Nemen (2010), mascarando o potencial catalítico real pois quando comparadas as Figuras 21 e 22 é notável que grande parte das enzimas esteja de alguma forma adsorvida no suporte, entretanto não em uma forma ativa ou com uma barreira difusional.

Comparando os valores obtidos de atividade recuperada e rendimento de imobilização respectivamente nas tabelas 5 e 6 podemos observar que durante o estudo foi obtido um máximo de atividade recuperada de 90,5% e com o rendimento de imobilização máximo em 97,7%, em tempos de imobilização e concentrações iniciais diferentes. No trabalho apresentado por Cunha et al. (2008), utilizando lipase tipo 2 de *Y. Lipolytica* em octil agarose, apresentou 71% de rendimento e 34% de atividade recuperada máximos. Já quando Cunha e colaboradores analisaram a imobilização em MANAE-agarose a atividade recuperada máxima foi de 61%. No trabalho de Brígida (2010) é possível verificar que o máximo atingido foi na imobilização utilizando fenil-agarose, obtendo 93% de atividade recuperada e 99% de rendimento de imobilização, valores mais próximos e compatíveis com os obtidos neste trabalho.

Tabela 4 – Atividade recuperada do processo (%)

Tempo (min)	Atividade Recuperada			
	1KU/L	5KU/L	10KU/L	15KU/L
15	78,4%	21,8%	39,9%	26,2%
30	90,5%	50,7%	20,1%	26,3%
45	49,0%	53,3%	13,7%	24,8%
60	49,0%	31,7%	15,8%	21,6%
90		35,9%	10,1%	

Tabela 5 – Rendimento do processo (%)

Rendimento de imobilização				
Tempo (min)	1KU/L	5KU/L	10KU/L	15KU/L
15	41,7%	60,0%	58,5%	94,6%
30	41,7%	64,4%	94,3%	96,9%
45	66,7%	68,9%	83,0%	97,7%
60	66,7%	86,7%	87,7%	97,7%
90		80,0%	94,3%	

Para elucidar a questão da possível barreira difusional foi realizado um teste utilizando o derivado obtido após 90 minutos de imobilização com 10000 U/L devido ao seu alto rendimento e diminuto valor de atividade recuperada para a produção de um estudo através da pulverização deste visando à diminuição das barreiras difusionais geradas pelo suporte com o meio (Gonçalves, 1996). Os resultados seguem abaixo:

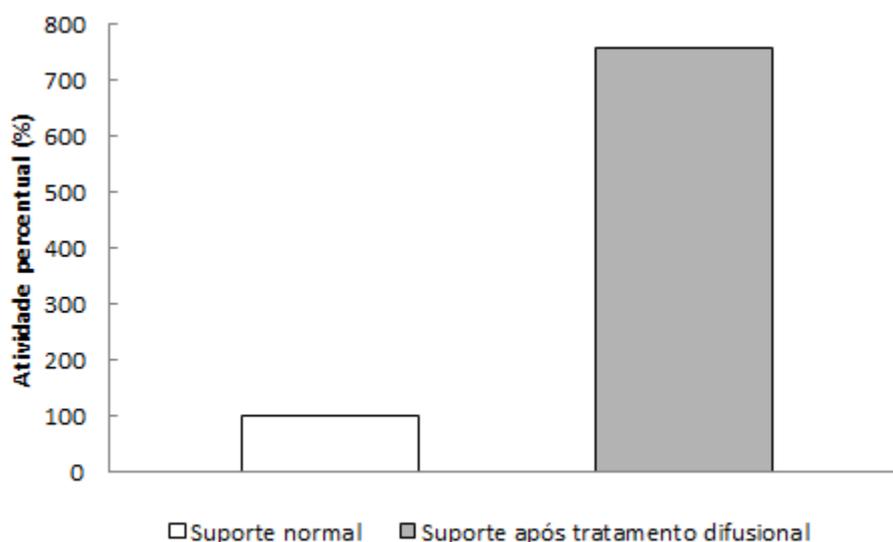


Figura 23 – Atividade hidrolítica apresentada no suporte antes e após a pulverização do suporte.

A Figura 23 reforça a hipótese levantada. Após o tratamento o derivado obtido teve um aumento de aproximadamente 8 vezes seu valor inicial, mostrando que o suporte de sílica apresenta fortes barreiras difusionais quando é feita uma imobilização com um extrato não purificado de lipase de *Yarrowia Lipolytica*. Por tal motivo se faz necessário também um estudo com o suporte de sílica em menores concentrações enzimáticas iniciais, para evitar quaisquer erros devido às barreiras geradas, conforme observado por Becaro (2008), onde devido à alta concentração enzimática cedida, ocorrem muitas imobilizações nos poros, dificultando a difusão do substrato nos interstícios.

3.2.2.2. ESTABILIDADES TÉRMICAS E OPERACIONAIS

A estabilidade operacional é um processo onde o derivado obtido após a imobilização tem sua atividade esterasica medida várias vezes para se calcular o número de bateladas máximas possíveis por catalisador produzido. O gráfico abaixo mostra o percentual de atividade do catalisador em 10 ciclos de reuso, onde o 100% corresponde ao valor da atividade no primeiro ciclo.

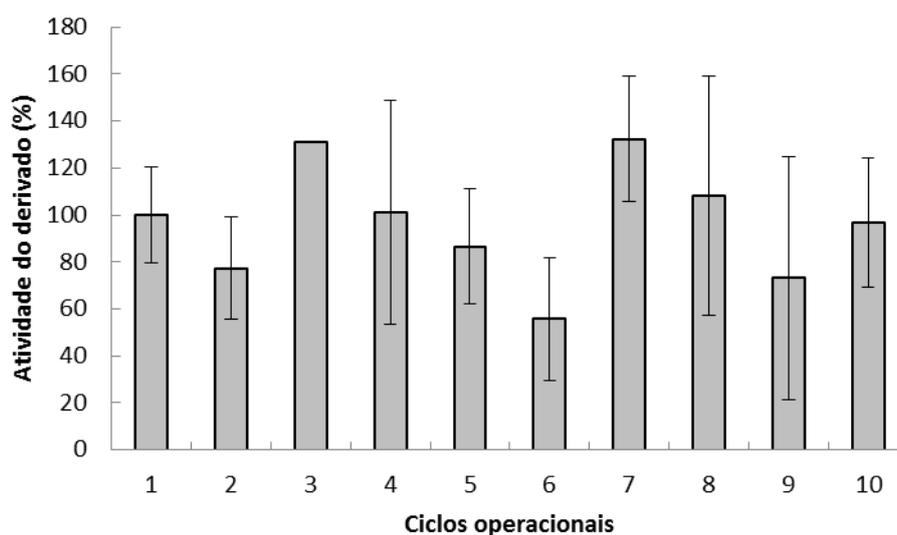


Figura 24 – Estabilidade operacional de 10 ciclos realizada com derivado (LYL em sílica) obtido em 90 minutos e a 10000 U/L

Como pode ser visto na Figura 24 o gráfico possui grandes variações devido às barreiras difusionais que o meio utilizado apresenta, além disso, este foi um estudo realizado através da hidrólise de azeite de oliva com fenolftaleína analisado por titulometria, ou seja um método com maior faixa de erro. Entretanto, mesmo frente a tal dificuldade pode-se afirmar que o derivado mantém sua atividade inicial após 10 ciclos, pois grande parte de seus pontos experimentais ainda se encontram na faixa entre 80-100% Sendo assim este suporte pode ser caracterizado como um suporte passível de reuso, diminuindo assim, gastos industriais com a produção de catalisadores.

A estabilidade térmica foi conduzida a 60°C, por motivo de comparação com outros trabalhos como os de Brigida e Guisan, que também utilizam tal temperatura, utilizando também o derivado produzido com o extrato de 10000 U/L em uma imobilização de 90 minutos produzindo o perfil abaixo descrito:

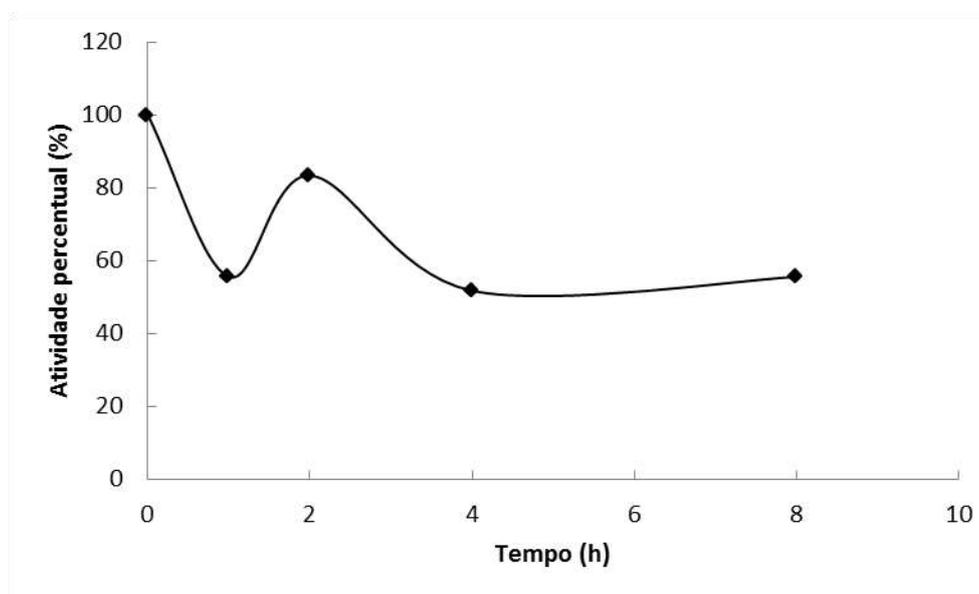


Figura 25 – Estabilidade térmica a 60°C realizada com derivado (LYL em sílica) obtido em 90 minutos e a 10000 U/L

Conforme pode ser visto na Figura 25, o derivado obtido possui uma queda de atividade de 40% após 8h a 60°C, sendo necessários mais pontos para a construção de uma curva de decaimento, mas é passível de afirmar que o catalisador é bastante tolerável a altas temperaturas quando comparado com os dados obtidos por Brígida (2006), onde após 8h de estabilidade térmica o derivado da fibra de coco imobilizada com CALB possuía 15% da atividade inicial, sua constante de desativação térmica

era de $0,17 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2}$ de 3,7 h e fator de estabilização (F) de 64. Valores comparáveis aos melhores experimentos apresentados por Brígida (2010) em estudo de otimização da imobilização de CALB em fibra de coco e melhores do que os dados obtidos por Mendes (2013) em imobilizações utilizando quitosana.

Portanto, o catalisador apresentado possui boas características operacionais, seja suportando altas temperaturas ou variados ciclos operacionais, e alta atividade enzimática no derivado, que somente tende a aumentar com a utilização de extratos de lipase purificados.

CONCLUSÕES

Os estudos de aperfeiçoamento do protocolo de imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* em fibra de coco funcionalizada com GPTMS através de ligação covalente obteve derivados estáveis, o que comprova o potencial da fibra de coco funcionalizada como suporte de imobilização. A concentração ótima do borohidreto de sódio para o processo de redução das bases de Schiff foi definida como 0,5 mg/mL., sendo 4h o tempo de contato entre a enzima e o suporte necessário para obtenção de um derivado estável. O número de lavagens para a retirada de borohidreto residual foi de 5 lavagens. Ea concentração ótima de GPTMS para a imobilização foi definida como 1% tanto para pH 7 ou pH 10, devido a seu alto custo e toxicidade.

Os estudos de imobilização por adsorção de lipase de *Yarrowia Lipolytica* em fibra de coco natural ou oxidada obtiveram dados compatíveis com a literatura. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que, na faixa de concentração de enzima estudada, quanto maior a quantidade de enzima oferecida, mais atividade foi observada nos derivados obtidos, de forma que a carga enzimática máxima não foi observada até 2500U/L, tanto em fibra natural quanto em tratada, necessitando estudos posteriores em maiores concentrações enzimáticas. Além disso, o tratamento químico da fibra promoveu maior atividade no derivado, possivelmente devido às mudanças físicas e químicas promovidas pelo tratamento.

O estudo de imobilização de extrato bruto de lipase de *Yarrowia Lipolytica* em sílica através do método de adsorção obteve derivados estáveis térmica e operacionalmente, além de apresentar alta atividade aparente. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

As curvas cinéticas do suporte possuem um pico de atividade em 15 minutos de imobilização, visualizado principalmente em altas concentrações, como analisado na solução inicial de 10000 U/L. Seguido de queda na atividade, mesmo em maiores concentrações enzimáticas. Isto caracteriza uma possível barreira difusional;

A imobilização possui alto rendimento quando comparado a dados da literatura;

Pulverização do derivado em ambiente controlado comprovou a existência de barreira difusional, causada pelo entupimento dos poros impedindo a chegada de substrato ao sitio ativo, e, portanto, explicam a queda de atividade e baixa atividade recuperada no derivado obtido;

O derivado gerado é estável frente a 10 ciclos operacionais em batelada, mostrando pouca ou nenhuma perda em sua atividade;

O biocatalisador produzido é estável frente à estabilidade térmica por 8 h a 60 °C, mostrando resultados acima dos encontrados na literatura.

Portanto, dentre os experimentos apresentados no presente trabalho, a imobilização com maior possibilidade de se tornar viável industrialmente é a imobilização por adsorção utilizando a sílica ativada onde a enzima utilizada foi a lipase de *Yarrowia Lipolytica*. Tal escolha foi devido a sua alta atividade, quando comparado com a mesma massa de suporte da fibra de coco.

REFERÊNCIAS

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W.; Enhanced Activity Of Intracellular Lipases From *Rhizomucor Miehei* And *Yarrowia Lipolytica* By Immobilization On Biomass Support Particles. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1347-1361, 2004.

ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA J. A.; GONÇALVES, L. R. B.; Estudos Da Imobilização De Penicilina G Acilase Em Quitosana: Desenvolvimento De Um Novo Biocatalisador Para A Produção De Antibióticos Beta - Lactâmicos. Dissertação de Pós-graduação em engenharia química, UFC, 2004

ALMEIDA, V. M.; Acilação Enzimática De Naringina Com O Ácido 12-Hidróxi-9-Z-Octadecenóico, Catalisada Por Lipase B De *Candida Antarctica*. Dissertação de Pós-graduação em biotecnologia, UEFS, 2011

AMARAL, P. F. F.; Produção De Lipase De *Yarrowia Lipolytica* Em Biorreator Multifásico. Tese De Doutorado Em Engenharia Química, UFRJ, 2007

ANASTACIO, S. A.; GUERREIRO M.C. Método De Estudo Da Adsorção De Triadimenol Com Micro-Colunas De Solo E Centrifugação. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 3, 499-502, 2004

ARAGÃO, W. M.; RESENDE, J. M.; CRUZ, E. M. O.; REIS, C. S. SAGGIN JUNIOR, O. J.; ALENCAR, J. A.; MAREIRA, W. A.; PAULA, F. R.; LIMA FILHO, J. M. P.; Fruto Do Coqueiro Para Consumo Natural. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 76p.

BARBOZA, M. N. L.; ARRUDA, E. J. M.; O Comportamento Do Consumidor Tecnológico Diante Dos Valores Ecologicamente Corretos: Ideologia Verde Versus Responsabilidade Social. *Intercom – RBCC São Paulo*, v.35, n.1, p. 157-182, jan/jun 2012.

BECARO, A. A.; Imobilização E Estabilização De D-Hidantoinase Para A Produção De N-Carbamoil-D-Fenilglicina. Tese de mestrado em biotecnologia, UFSCar, 2008

BLANCO, R.M.; TERREROS, P.; PÉREZ, M. F.; OTERO, C.; GONZÁLEZ, G.; Functionalization Of Mesoporous Silica For Lipase Immobilization Characterization Of The Support And The Catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 83–93, 2004.

BLANCO, R. M.; CALVETE, J. J.; GUISÁN, J. M. Immobilization-Stabilization Of Enzymes; Variables That Control The Intensity Of The Trypsin (Amine)-Agarose (Aldehyde) Multipoint Attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p. 353-359, 1989.

BRADFORD, M. M.; A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, V. B.; Síntese E Caracterização De Catalisadores De Oxido De Ferro Suportados Em Titanados Lamelares. Tese de mestrado em química, UFG, 2008.

BRÍGIDA, A. I. S.; Estudo Da Imobilização De Lipase Tipo B De *Candida Antarctica* Utilizando Fibra Da Casca De Coco Verde Como Suporte. Tese de mestrado em engenharia química, UFC, 2006

BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization Of *Candida Antarctica* Lipase B By Covalente Attachment To Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 67 – 80, 2007.

BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization Of *Candida Antarctica* Lipase B By Adsorption To Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 173-187, 2008.

BRÍGIDA, A. I. S.; Imobilização De Lipases Utilizando Fibra Da Casca De Coco Verde Como Suporte Para Aplicações Industriais. Tese de doutorado em engenharia química, UFRJ, 2010

CANILHA, L., CARVALHO, W., SILVA, J. B. A.; Biocatalisadores Imobilizados; *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*; ano IX; N° 36; 2006

CARDIAS, H.C.T.; GRININGER, C.C.; TREVISAN, H.C.; GUISAN, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; Influence Of Activation On The Multipoint Immobilization Of Penicillin G Acylase On Macroporous Silica. *Braz. J. Chem. Eng.* [online], v. 16, n. 2, 1999.

CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B.; MORAES, M. C. M.; Imobilização De Enzimas Em Suportes Cromatográficos: Uma Ferramenta Na Busca Por Substâncias Bioativas. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 175-187, 2009

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S.; Uso De Biocatalisadores Imobilizados: Uma Alternativa Para A Condução De Bioprocessos. *Revista Analytica*, N°23, 60-70, 2006

COSTA JR., N. P.; COSTA, F. E. DA; MESQUITA, C. H.; HAMADA, M. M.; Otimização Da Metodologia De Fabricação De Plásticos Cintiladores Utilizando Catalisadores Químicos. - 4°. ENCONTRO NACIONAL DE APLICAÇÕES NUCLEARES, Agosto, 18-22, 1997, Poços de Caldas - M G Brasil -p.12 2

COUTINHO, F. M. B.; COSTA, T. H. S.; Síntese E Caracterização De Catalisadores Ziegler-Natta A Base De $TiCl_3$ Para Polimerização De Propileno Polímeros. Ciência e Tecnologia -Nov/Dez-91

CRISTÓVÃO, R. O.; TAVARES, A. P. M.; BRIGIDA, A. I. S.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. R.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. Z.; Immobilization Of Commercial Laccase Onto Green Coconut Fiber By Adsorption And Its Application For Reactive Textile Dyes Degradation; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic V.72, p. 6– 12, 2011

CUNHA, A.G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN, J.; PAIVA, L.M.C.; FREIRE, D.M.G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Immobilization Of *Yarrowia Lipolytica* Lipase – A Comparison Of Stability Of Physical Adsorption And Covalent Attachment Techniques. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 146, p. 49-56, 2008.

D´SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S.; Immobilization Of Invertase On Rice Husk Using Polyethylenimine. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v. 52, p. 59-62, 2002.

D´ALMEIDA, A. L. F. S.; Influência De Tratamento Superficiais No Comportamento Mecânico De Compósitos Poliméricos Reforçados Por Fibras Lignocelulósicas. Tese de doutorado em engenharia química, UFRJ, 2007

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas De Lipases Imobilizadas Em Polímeros. Química Nova, v. 27, p. 623-630, 2004.

FABER, K.; Biotransformations In Organic Chemistry. 3. ed. Berlin: Springer, 1997. 402p.

FEIHRMANN, A. C.; Avaliação Da Atividade Enzimática De Lipases Imobilizadas Em Fluidos Pressurizados. Tese de mestrado em engenharia de alimentos, URI, 2005

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; COCCA, J.; MATEO, C.; MORO, P.; TERRENI, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M.; Régio-

Selective Deprotection Of Peracetylated Sugars Via Lipase Hydrolysis. *Tetrahedron*, v. 59, p. 5705-5711, 2003.

FERREIRA, T. F.; Emprego De *Yarrowia Lipolytica* Na Degradação De Óleo Cru; Tese De mestrado Em Ciências , UFRJ, 2009

FIGUEIREDO, L.H.; PENTEADO, M. I. O.; MEDEIROS, P. T.; Patentes em Biotecnologia: Patentamento em Biotecnologia Agropecuária: Cenário Brasileiro. *Biotecnologia: Ciencia e desenvolvimento*, nº 36, p.32-36 ,2006

FLEURI, L. F.; KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H.; Production, Purification And Application Of Extracellular Chitinase From *Cellulosimicrobium Cellulans* 191. *Brazilian Journal of Microbiology* (2009) 40: 623-630

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; Produção De Biossurfactante Por Levedura. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 8, 2091-2099, 2008

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-Free Ethyl Oleate Synthesis Mediated By Lipase From *Candida Antarctica* B Adsorbed On Polypropylene Powder. *Catalysis Today*, v. 107-108, p. 23-30, 2005.

GONÇALVES, L. R. B. Estudo Do Processo De Obtenção De Etanol A Partir De Amido Liquefeito, Usando Enzima E Microrganismo Coimobilizados Em Gel De Pectina. Tese de mestrado em engenharia de química, UFSCar, 1996

GONTIJO, D.; Preparação De Derivados De B-Glicosidase Por Imobilização Em Suportes Sólidos Derivatizados. Tese de mestrado em engenharia química, UFSCar, 2011.

FONSECA, H. H.; Editorial. *Revista científica, FCV-LUZ/ Vol XX N° 2*, 225-226, 2010.

HAEGLER, A.N.; MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeast From Marine And Astuarine Waters With Different Levels Of Pollution In The State Of Rio De Janeiro, Brazil, *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 41(1),pp.173-178, 1981.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization Of Enzyme Deactivations Using A Seriestype Mechanism. *Enzyme And Microbial Technology*, v. 7, p. 50-60, 1985

ILLANES, A.; Stability Of Biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 12, 1999. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol2/issue1/full/2>>.

IUPAC; Classification And Chemical Characteristics Of Immobilized Enzymes. *Pure and Applied Chemistry*, v. 67, p.597-600, 1995.

JUNIOR, A. C.; Imobilização De Lipase De *Candida Antarctica* B Em Quitosana Para Obtenção De Biodiesel Por Transesterificação Do Óleo De Mamona. Tese de mestrado em engenharia química, UFSC, 2007.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; MELO, E. H. M. The Immobilization Of Enzymes And Cells. *Chimicaoggi*, p. 21-29, 1988.

LATHOUDER, K.M.; BENTHEM, D.T.J.; WALLIN, S.A.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M.; KAPTEIJN, F.; MOULIJN, J.A. Polyethyleneimine (PEI) Functionalized Ceramic Monoliths As Enzyme Carriers: Preparation And Performance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 50, p. 20-27, 2008.

LEHNINGER, A.; *Principios de Bioquímica de Lehninger*. 3° ed, sarvier, 2002

LOCK, L. L.; Seleção De Leveduras Lipolíticas Isoladas De Bromélias E Produção E Caracterização De Lipase Bruta De *Debaryomyces Melissophilus B181*. Tese de mestrado em microbiologia, UFRS, 2007.

MACHADO, A. C. O.; Obtenção De Intermediários Quirais Utilizando Lipases Em Reatores Assistidos Por Membranas. Tese de doutorado em engenharia química, UFRJ, 2011.

MARQUES, S. F. F.; *Biotecnologia Enzimática: Produção De Complexo Multienzimático De Trichoderma Harzianum E Sua Aplicação Na Alimentação De Frangos De Corte*. Tese de mestrado em veterinária, UFGO, 2007.

MARTINS, C. R.; JUNIOR, L. A. J.; *Evolução Da Produção De Coco No Brasil E O Comércio Internacional - Panorama 2010*. Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 164

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement Of Enzyme Activity, Stability And Selectivity Via Immobilization Techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MELO, A. F.; *Produção E Aplicação De Lipase No Desenvolvimento De Um Biossensor Potenciométrico*; Tese De Doutorado Em Engenharia Química, UFRJ, 2012.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JUNIOR, A. *Aplicação De Lípases No Tratamento De Águas Residuárias Com Elevados Teores De Lípidos*. *Química Nova*, v. 28, p. 296-305, 2005.

MENDES, A. A.; Seleção De Suportes E Protocolos De Imobilização De Lipase Para Síntese Enzimática De Biodiesel. Tese De Doutorado Em Engenharia Química, UFSCar, 2009

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem De Suportes Orgânicos E Protocolos De Ativação Na Imobilização E Estabilização De Lipase De *Thermomyces lanuginosus*. Quim. Nova, Vol. 36, No. 2, 245-251, 2013

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; Imobilização De Lipases Produzidas Por Fermentação Em Estado Sólido Utilizando *Penicillium Verrucosum* Em Suportes Hidrofóbicos. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(2): 440-443, abr.-jun. 2009

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; Lipases Microbianas: Produção, Propriedades E Aplicações Biotecnológicas. Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011

MESSING, R. A.; Immobilized Enzymes For Industrial Reactors. London: Academic Press Inc., 1984.

MURUCI, L. N. M.; SANTOS, L. O.; COURI, S.; PENHA, E. M.; DAMASO, M. C. T.; Melhoramento Da Produção De Lipase De *Aspergillus Niger* Em Fermentação Semi-Sólida Utilizando Subprodutos Agroindustriais. XVIII Simposio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM 2011

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On The Adsorption Of Proteins On Solid Surfaces, A Common But Very Complicated Phenomenon. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 91, n. 3, p. 232-244, 2001.

NCUBE, I. ET AL.; Fatty Acid Selectivity Of A Lipase Purified From *Vernonia Galamensis* Seed. Biochimica et Biophysica acta, V. 1257, 149-156, 1995

NEMEN, D.; Sistemas Nanoestruturados Lipídicos Contendo Resveratrol: Preparação, Caracterização E Avaliação Da Penetração Cutânea. Tese de mestrado em farmacia, UFSC, 2010.

NUNES, P. M. B.; Estudo Do Efeito Do Farnesol Sobre A Morfologia Celular De *Yarrowia Lipolytica*. Tese de mestrado em Tecnologia de processos químicos, UFRJ, 2011.

DE OLIVEIRA G. C., DE LIMA L. N., GIORDANO R. L. C., TARDIOLI P.W.; Estudo Da Adsorção Física De Lipase De *Pseudomonas Fluorescens* Em Suportes

Hidrofóbicos. IX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Iniciação Científica 2011

OTHMAN, Z.A.; APBLETT, A.W. Synthesis Of Mesoporous Sílica Grafted With 3-Glycidoxypopyltrimethoxy-Silane. *Materials Letters*, v. 63, p. 2331-2334, 2009.

PALOMO, J.M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase-Lipase Interactions As A New Tool To Immobilize And Modulate The Lipase Properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 447-454, 2005.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A.; Lipases De Látex Vegetais: Propriedades E Aplicações Industriais. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1, 93-99, 2006

PEREIRA, G. H. A.; Estudo Da Imobilização Multipontual Da Penicilina G Acilase Em Sílica Ativada Com Grupos Glioxil. Tese de mestrado em engenharia química, UFSCar, 1996.

PEREIRA-MEIRELLES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; SANT'ANNA JR., G. L.; A Stable Lipase From *Candida Lipolytica*: Cultivation Conditions And Crude Enzyme Characteristics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 63-65, p. 73-85, 1997.

PIROZZI, D.; GRECO JUNIOR, G.; Activity And Stability Of Lipases In The Synthesis Of Butyl Lactate. *Elsevier*, V 34, 94-100, 2004

POPPE, J. K.; Síntese De Esteres Metílicos Catalisada Por Lipase B De *Candida Antartica* Imobilizada Em Suportes Hidrofóbicos. Tese de mestrado em engenharia química, UFRJ, 2012.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise Enzimática De Casca De Arroz Utilizando-Se Celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. *Química Nova*, v. 21, p. 140-143, 1998.

RIEBEL, B. R.; *Biocatalysis Fundamentals And Applications*. Wiley-vch - 2004

ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P.; Effects Of Additives On The Activity Of A Covalently Immobilised Lipase In Organic Media. *Journal of Biotechnology*, v. 66, p. 61-67, 1998.

ROCHA, C.; DUCSO, L.; GONÇALVES, M. P.; TEIXEIRA, J. A.; Spent-Grains And Zeolites As Potencial Carriers For Trypsin Immobilisation. *Mercosur Congress on Process Systems Engineering*, 4, 2005, Costa Verde. CD-ROM de Anais do 4º Mercosur Congress on Process Systems Engineering. Costa Verde: 2005.

ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; BRÍGIDA, A. I. S.; BRÍGIDO, A. K. L. Aproveitamento De Resíduos Da Indústria Da Água De Coco Verde Como Substrato Agrícola. Seminário Nacional de Resíduos Sólidos, VI, 2002, Gramado. CD-ROM do VI Seminário Nacional de Resíduos Sólidos. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, 2002.

SANTOS, A. M.; Fermentação Alcoólica Com Levedura Imobilizada Em Colmos De Bambu E Em Fibras De Coco. Tese de mestrado em engenharia química, UFAL, 2008.

SATYANARAYANA, K. G.; GUIMARÃES, J. L.; WYPYCH, F.; Studies On Lignocellulosic Fibers Of Brazil. Part I – Source, Production, Morphology, Properties And Applications. Composites: Part A, v. 38, p. 1694-1709, 2007

Shriver & Atkins; Inorganic Chemistry. Oxford 4^{ed}, 2008

SHUKLA, S. R.; PAI, R. S. Adsorption Of Cu(II), Ni(II) And Zn(II) On Modified Jute Fibres. Bioresource Technology, v. 96, p 1430-1438, 2005.

SILVA, A. L. P.; PREPARAÇÃO DE SÍLICAS ORGANOFUNCIONALIZADAS PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia Cepacia*; Tese De Mestrado Em Química, UFPA, 2012

SILVA, L. R. D.; GONDIM, A. C. S.; Efeito Do Glutaraldeído Na Adsorção De Extrato Proteico Da Ipomoea Batatas (L) Lam Na Superfície De Uma Zeólita Analcima. Cerâmica 51 (2005) 219-224

SILVA, H. M.; Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea. Tese de mestrado em medicina, UFGO, 2011.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The Production Of Fine Chemicals By Biotransformations. Current Opinion in Biotechnology, v. 13, p. 548-556, 2002.

TAVARES, A.S.; AMARAL, P.F.F.; FINOTELLI, P.V.; Imobilização De Lipase Com Magnetita Para A Produção De Biodiesel, p.618-621. São Paulo: Blucher, 2014. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobec-ic-07-eb-135

TONHI, E. ET AL.; Fases Estacionarias Para Cromatografia Liquida De Alta Eficiência Em Fase Reversa (Clae-Fr) Baseada Em Superfície De Oxidos Inorganicos Funcionalizados. Quimica nova V. 25, N^o4, 616-623, 2002.

VESCOVI, V.; Extração, Purificação E Imobilização De Lipases Vegetais Destinadas A Síntese De Biodiesel E Esteres. Tese de mestrado em engenharia química, UFSCar, 2012.

VIEIRA, D. C.; Imobilização De Enzima β -Galactosidase De *Kluyveromyces Fragilis* Em Agarose E Quitosana Utilizando Diferentes Protocolos De Ativação. Tese de mestrado em engenharia química, UFSCar, 2009.

VIEIRA, E. R.; Produção De Lipases Por *Yarrowia Lipolytica* E Potencial Aplicação Em Tratamento De Soro De Queijo; Tese De Mestrado Em Desenvolvimento de Processos Ambientais, PUC-PE, 2013

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing Lipases For Biocatalysis: A Survey Of Chemical, Physical And Molecular Biological Approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.

XAVIER, F. J. S.; Bio-Resolução De Adutos De Morita-Baylis-Hillman Mediada Pela Enzima Lipase Calb: Bioatividade De Seus Enantiômeros Puros. Tese De Mestrado Em Química, UFPa, 2013