



Aplicação de Resíduo Lignocelulósico como
Suporte de Imobilização da Lipase de *Yarrowia
lipolytica*

Julia de Macedo Robert

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Abril de 2014

APLICAÇÃO DE RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO COMO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Julia de Macedo Robert

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Prof^ª Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Prof^ª Evelin Andrade Manoel, M.Sc.

Ana Iraidy Santa Brigida, D.Sc.

Orientado por:

Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Abril de 2014

Robert, Julia de Macedo.

Aplicação de Resíduo Lignocelulósico como Suporte de Imobilização da Lipase de *Yarrowia lipolytica* / Julia de Macedo Robert. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014.

vi, 45 p.; il

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química,

2014. Orientadores: Bernardo Dias Ribeiro e Maria Alice Zarur Coelho

1. Imobilização. 2. Lipase de *Yarrowia lipolytica*. 3. Resíduo lignocelulósico. 4. Monografia (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Bernardo Dias Ribeiro, Maria Alice Zarur Coelho. I. Título

Aos meus pais,
que me ajudaram a não desistir,
mesmo quando parecia impossível chegar ao final.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Bernardo Dias e Maria Alice pelos conhecimentos transmitidos em matérias ao longo do graduação, as quais me fizeram ter certeza de que tinha escolhido a graduação certa, e também pela orientação neste trabalho final.

A equipe do BIOSE (Biological System Engineering Group), em especial Roseli, Etel, Diego e Gabriela, pelo apoio e paciência no começo em que eu precisava perguntar até onde estava um tubo falcon.

A equipe do LaBiM (Laboratório de Biotecnologia Microbiana), Antônio Carlos, Douglas e Fábio, pela compreensão da minha ausência e pelo espaço aberto quando precisei.

A pesquisadora Ana Iraidy da Embrapa - CTAA pela doação da casca de coco verde.

A APAEB (Associação de Desenvolvimento Sustentável e Solidário da Região Sisaleira) pela doação da folha de sisal.

A Roseli pela produção da lipase.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

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

APLICAÇÃO DE RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO COMO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE YARROWIA LIPOLYTICA

Julia de Macedo Robert

Abril, 2014

Orientadores: Prof. Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Com o intuito de se reduzir o impacto ambiental e desenvolver tecnologias mais “limpas” a tecnologia enzimática vem se difundindo ao longo dos anos como uma alternativa para os processos químicos. O alto custo para obtenção de enzimas e sua sensibilidade são os maiores impedimentos para que esta tecnologia seja mais utilizada, as alternativas que vem sendo estudadas são: o uso de genes recombinantes em cepas melhores adaptadas a produção; e a imobilização das enzimas que possibilita fácil recuperação e proporciona maior estabilidade.

Uma medida que possibilita agregar valor ao produto, diminuir o custo de produção e ainda contribuir para o ambiente é o uso de resíduos agroindustriais como suporte, que é o caso dos escolhidos para este estudo, a fibra de coco e de sisal.

O método de imobilização escolhido foi a adsorção por ser simples e de aplicabilidade generalizada bastando apenas uma simples mistura da enzima com o suporte nas condições de pH e força iônica adequados para viabilizar interações iônicas, ligações hidrofóbicas e forças atrativas de van der Waals.

O objetivo do trabalho foi comparar a eficiência de imobilização, entre fibras de coco e de sisal, padronizadas para +32 mesh, com diferentes tratamentos usando 3 líquidos eutéticos (ChCl/HAc; ChCl/Glicerol; ChCl/ureia) e 1 líquido iônico (Acetato de colina). Dentro os testados, o resíduo que teve melhor desempenho foi a fibra de sisal tratada com ChCl/Ureia. A condição ótima encontrada para catálise foi 40°C e pH 7 e a sensibilidade a variações de temperatura é muito maior que a de pH.

Índice

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Introdução | 1 |
| 2. | Revisão bibliográfica | 2 |
| 2.1. | Lipases | 2 |
| 2.2. | O processo de Imobilização | 5 |
| 2.2.1. | Imobilização por adsorção | 7 |
| 2.3. | Fibra de coco | 9 |
| 2.4. | Fibra de folha de sisal | 12 |
| 2.5. | Modificação das fibras..... | 15 |
| 2.6. | Solventes Eutéticos | 16 |
| 2.7. | Líquidos iônicos | 17 |
| 3. | Materiais e métodos | 18 |
| 3.1. | Materiais..... | 18 |
| 3.2. | Preparo e padronização das fibras | 19 |
| 3.3. | Tratamento das fibras | 20 |
| 3.4. | Imobilização | 21 |
| 3.5. | Medida da atividade enzimática livre..... | 23 |
| 3.6. | Medida da atividade do derivado | 24 |
| 3.7. | Medida da atividade proteolítica | 25 |
| 3.8. | Medida da concentração de proteína | 27 |
| 4. | Resultados e discussão..... | 27 |
| 4.1. | Comparação dos tratamentos na fibra de coco para imobilização..... | 27 |
| 4.2. | Comparação da imobilização entre os tratamentos na fibra de sisal | 31 |
| 4.3. | Teste de estabilidade..... | 34 |
| 4.3.1. | Temperatura..... | 34 |
| 4.3.2. | pH | 36 |
| 5. | Conclusão | 39 |
| 6. | Bibliografia..... | 40 |

1. Introdução

Segundo estudo da FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) de 2013, a produção agrícola mundial triplicou nos últimos 50 anos, incluindo tudo que consumimos como cereais, carne e frutas. Dessa produção, boa parte se perde na forma de resíduos durante o processamento mas não impossibilita sua utilização para outros fins.

O volume destes resíduos agroindustriais gerados pelo desenvolvimento da sociedade e o destino dado a eles é uma preocupação crescente de âmbito mundial, pois estes representam perdas econômicas e, se não tratados corretamente ou reutilizados, poderão se tornar problemas ambientais.

Importante ressaltar que existe uma diferença entre resíduo e rejeito. Resíduo é algo que fez parte de um processo produtivo e que eventualmente não está sendo aproveitado, mas apresenta ainda uma utilização potencial. Rejeito é a parte inaproveitável dos resíduos e devem ser dispostos adequadamente de forma a estarem inativos, neutralizados, descontaminados e desintoxicados. Conforme nossa tecnologia avança o que a alguns anos era um rejeito, hoje pode ser considerado resíduo e extensos estudos devem ser feitos para agregar valor e transformar esse material que seria descartado em algo de interesse para o mercado (Lei 12.305/2010, artigo 3º).

Após definido o que são resíduos, vê-se que eles são amplamente utilizados em processos biotecnológicos, permitindo sua valorização e a diminuição do impacto ambiental. A partir desses bioprocessos, vários resíduos como glicerina bruta, tortas oriundas de extração de óleo e fibras

vegetais podem gerar produtos como biocombustíveis, polissacarídeos, ácidos orgânicos e enzimas (TAMANINI et al, 2004; COELHO et al, 2001; WUST, 2004).

Além dessas finalidades, também vem sendo utilizados como suporte para imobilização de leveduras, como na produção de riboflavina e polibutilacrilato (MARTINS, 2012; SOUZA, 2013; SANTOS, 2008), e para imobilização de enzimas, como lisozima e lipases (POZZANI et al, 2011; BRIGIDA, 2006).

As enzimas são bastante visadas para imobilização por serem substâncias orgânicas, em sua grande maioria proteínas, produzidas dentro das células de organismos vivos e que possuem atividade catalítica. Funcionam como catalisadores de reações bioquímicas e podem atuar como reguladoras das vias metabólicas (COELHO et al, 2008).

Neste contexto, o trabalho aqui apresentado fez uso de técnica de imobilização para que seja possível a reutilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* agregando valor a dois resíduos agroindústrias de impacto no Brasil - fibra de coco verde e fibra de sisal.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Lipases

As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, o mais importante grupo de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. As lipases (EC 3.1.1.3) são carboxil esterases que catalisam a hidrólise (e

a síntese) de triacilgliceróis de cadeia longa, a diacilglicéóis, moacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres, como mostra a Figura 1.

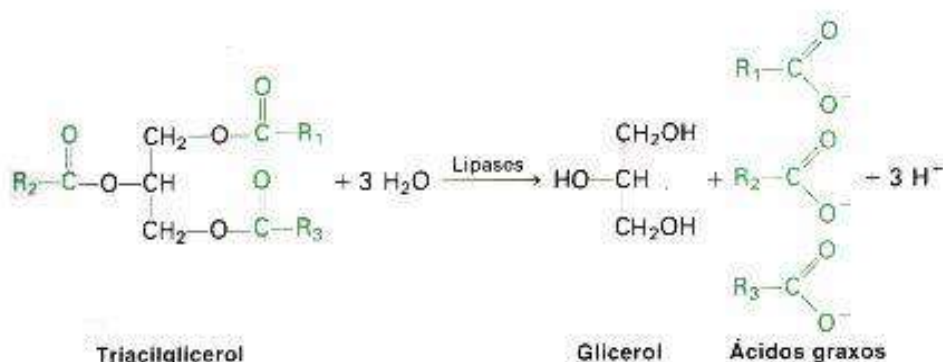


Figura 1: Reação de hidrólise catalisada por lipase

A questão da diferenciação entre lipases (E.C.3.1.1.3) e esterases (E.C.3.1.1.1) foi estudada por vários autores e ainda existem controvérsias. Em geral, as lipases são consideradas “verdadeiras” quando são capazes de catalisar a hidrólise de substratos, que possuem grupamento aciléster com número superior ou igual a 10 átomos de carbonos. As reações ocorrem principalmente na interface lipídio-água (JAEGER et al., 1998; SUDBRACK, 2012).

Dentre as formas de obtenção de lipases, as microbianas tem sido de grande interesse devido às características próprias das enzimas, como estabilidade e também por ampla perspectiva de aplicação, incluindo produtos para consumo humano, já que o controle de parâmetros como pH, temperatura é eficiente e a presença de substâncias prejudiciais pode ser controlada (REED et al, 1975; SANTOS et al, 2012).

Devido a limitações tecnológicas o custo da produção industrial da lipase microbiana ainda não é competitivo. É necessário aumentar a produtividade dos processos fermentativos utilizando micro-organismos que sejam melhores produtores, otimizar as condições de cultivo (HADEBALL et al, 1991) ou ainda modificar geneticamente organismos

que servem como plataforma de expressão para alcançar o objetivo desejado (JAEGER et al 2002).

Os estudos tendo lipases aplicadas giram em torno de sua adição em detergentes para utilização doméstica e industrial, devido a capacidade de hidrolisar lipídeos, na indústria de papel, para remover componentes hidrofóbicos como triglicerídeos e ceras da madeiras, que poderiam causar problemas durante a fabricação (JAEGER et al 2002), e para obtenção de biodiesel, já que o interesse em combustíveis alternativos aos provenientes de petróleo é enorme.

A lipase é capaz de transesterificar moléculas de ácidos graxos de elevado peso molecular e sabendo-se que as várias matérias-primas agropecuárias são ricas em gorduras e óleos, o emprego delas como fonte de bio-combustíveis ganha notável importância tecnológica, social e econômica (LEE et al, 2002).

Apenas alguns gêneros de leveduras são capazes de sintetizar lipases, como: *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Saccharomycopsis sp.* e *Yarrowia sp.* A lipase utilizada neste estudo é a produzida por *Yarrowia lipolytica* e sua representação tridimensional é mostrada na Figura 2. A imobilização deste lipase é também alvo de estudo a fim de poder reutilizá-la.

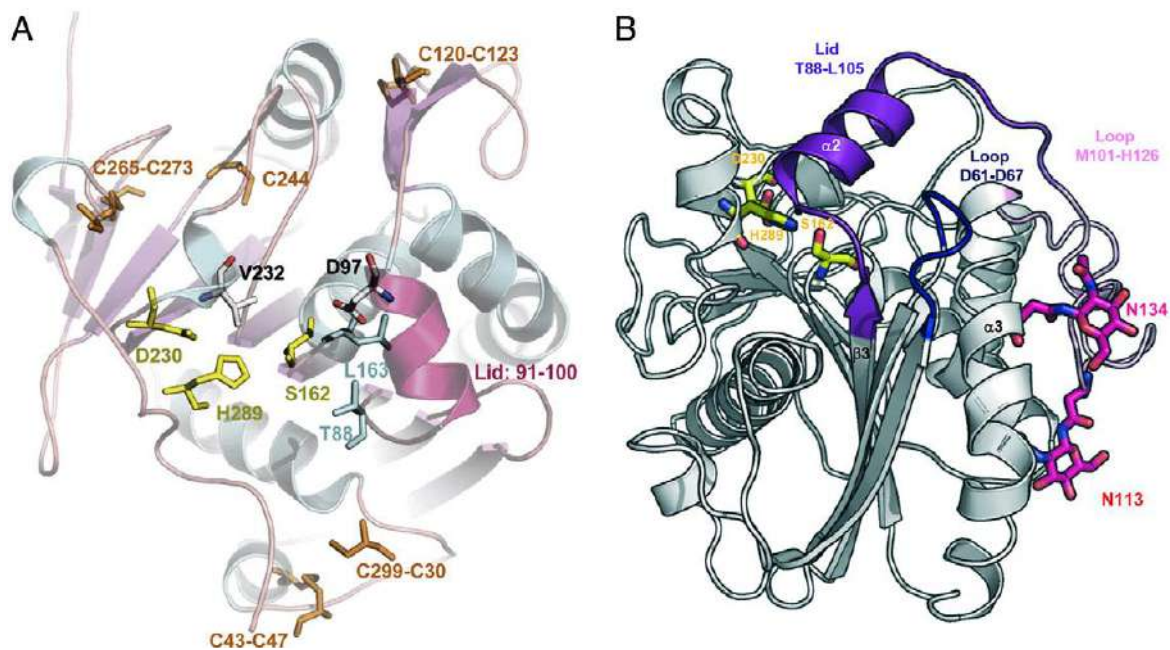


Figura 2: Representação da lipase de *Y.lipolytica* proposto por BORDES et al,2009. A) Triade catalítica e 4 ligações dissulfeto B) Baseada em cristalografia enfatizando loop e triade catalítica

2.2. O processo de Imobilização

A expansão do conhecimento e aplicações da catálise enzimática nos dias atuais, com todas as vantagens que lhe são inerentes, tem convocado a participação cada vez mais efetiva daqueles que detêm o conhecimento das ciências químicas e bioquímicas, para solução de alguns problemas (FERNANDES et al, 2010), como diminuir o consumo energético, abaixar o impacto ambiental de processos tipicamente químicos e minimizar o custo de produção de enzimas.

Uma técnica que tem sido bastante explorada para este fim é o uso de enzimas e, conseqüentemente, tornar seu uso vantajoso suficiente para competir com os químicos, já difundidos, é a imobilização. São consideradas imobilizadas aquelas que estão fisicamente confinadas, ou localizadas em certa região definida do

espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente (CHIBATA et al, 1978).

Esta possibilidade de recuperação e reutilização da enzima imobilizada em diferentes lotes de uma produção, diminui o custo final de processo e a torna atraente. O campo que mais utiliza este método é a indústria farmacêutica e alimentícia devido ao alto grau de pureza que se pode obter do produto. Outra característica que é possível atingir após o processo é o aumento da estabilidade enzimática, possibilitando que se trabalhe em meios não convencionais, o que não seria possível caso a enzima estivesse livre.

Há diversas maneiras de associar a enzima a um determinado suporte. Na Figura 3 estão expostas as mais estudadas. Existem outras classificações além desta apresentada, os métodos podem ser divididos para enzimas solúveis e insolúveis, sendo consideradas solúveis aquelas que permanecem na mesma fase em que estão seus substratos e produtos da reação, e insolúveis aquelas que constituem uma fase diferente do meio de reação (KENNEDY et al., 1998; GUIBAN, 2013).

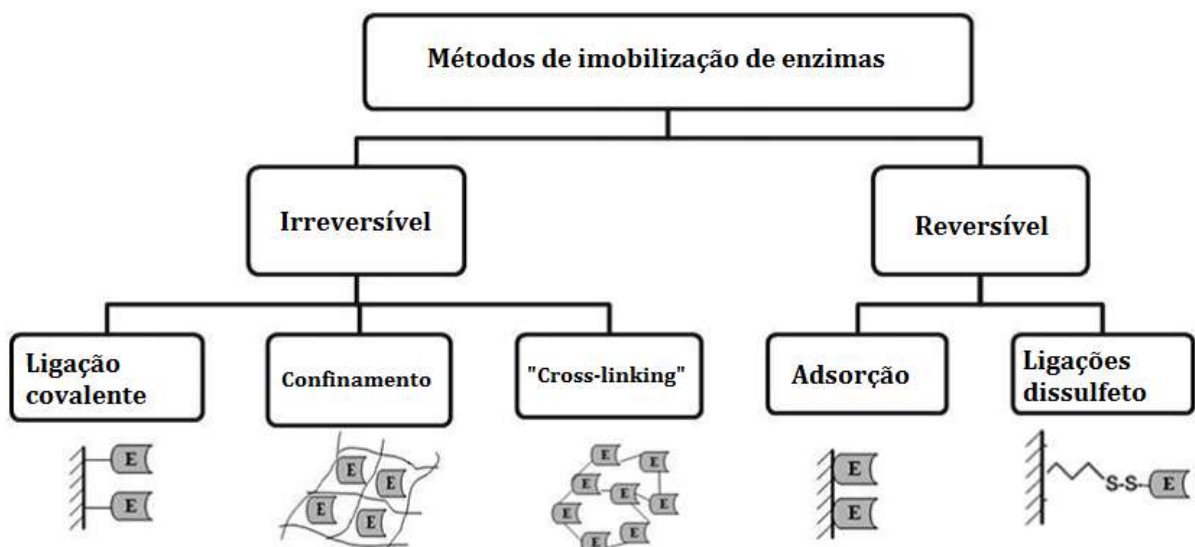


Figura 3: Esquema de representação dos principais métodos de imobilização de enzimas (tradução de GUI SAN, 2013)

A escolha do método depende da aplicação a que se destina e as condições operacionais a que será submetida, pois tais parâmetros irão se refletir no processo e no custo do produto final.

2.2.1. Imobilização por adsorção

A técnica de adsorção é maneira mais simples e de baixo custo conhecida. A interação suporte+enzima se dá através de fenômenos de superfície como interações iônicas, ligações hidrofóbicas e forças atrativas de van der Waals. Na Figura 4 um esquema da adsorção é mostrado.

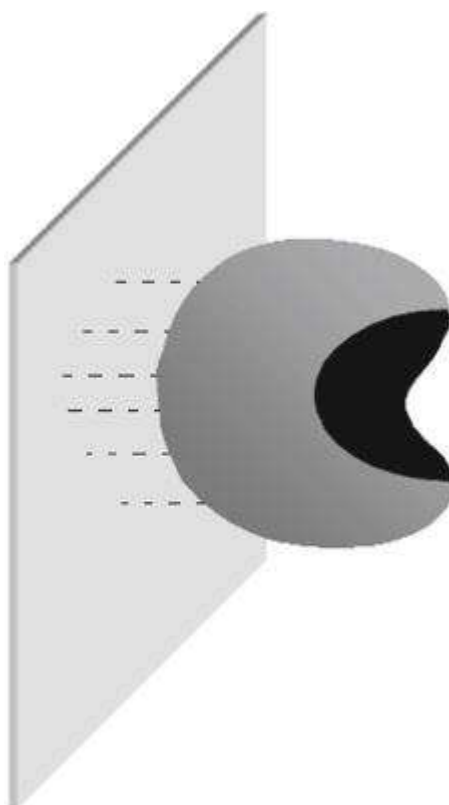


Figura 4: Esquema de adsorção (adaptado de GUI SAN, 2013)

Vemos que não há ligações covalentes entre suporte e enzima. Como essas ligações são fracas, a dessorção é fácil quando ocorre variações das condições a que estão expostas (temperatura, pH, força iônica) (KENNEDY et al, 1988).

Na Figura 5 é mostrada a possibilidade de outra camada de enzima seja adsorvida em cima da primeira, fazendo com que o sítio ativo fique indisponível, isso pode acontecer caso a carga enzimática seja maior que a área superficial disponível e o tempo de contato seja excessivo.

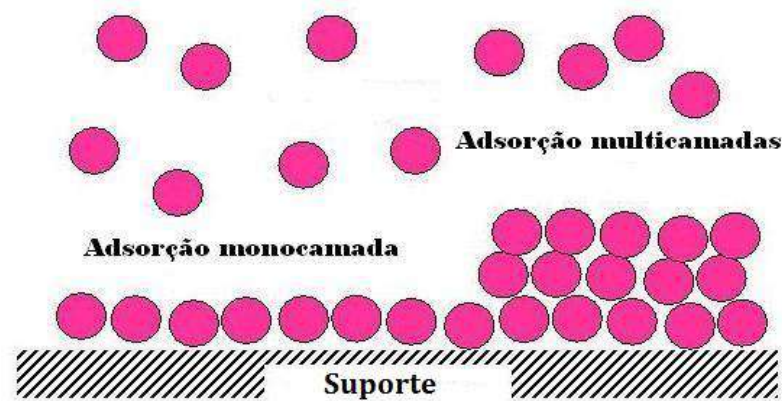


Figura 5: Tipos de adsorção

Os parâmetros ótimos para a adsorção ao suporte devem ser testados para cada caso, visto que tanto a quantidade de enzimas adsorvidas (a fim de evitar a adsorção multicamadas), quanto a orientação em que estão imobilizadas afetam sua atividade e estabilidade.

Como a imobilização pode afetar a estrutura da enzima, além de avaliar os parâmetros, é necessário determinar os valores de atividade recuperada e rendimento obtidos para um dado processo de imobilização (GITLESEN et al, 1997). O suporte e a área superficial

dele também interfere no processo imobilização e por isso deve ser estudado.

2.3. Fibra de coco

O coqueiro (*Cocos nucifera*) é originário das ilhas de clima tropical e subtropical do Oceano Pacífico, tendo o Sudeste Asiático como sua principal referência de centro de origem e diversidade, seu cultivo se estende também a América Latina, Caribe e África Tropical.

De acordo com a FAO, no ano de 2012, a produção de frutos desta árvore é de aproximadamente 2,88 milhões de toneladas. Conforme demonstrado na Tabela 1 pode-se perceber que o Brasil se destaca entre os produtores da América do sul, retendo cerca de 87% do total.

Tabela 1: Produção e área colhida dos países produtores de coco na América do Sul, em 2012 (FAO,2014)

| País | Área colhida (ha) | Produção (t) |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|
| Brasil | 257.742 | 2.888.532 |
| Venezuela | 19.000 | 165.000 |
| Colômbia | 12.900 | 204.000 |
| Guiana | 17.000 | 80.000 |
| Peru | 2.472 | 29.687 |
| Equador | 3.300 | 20.000 |
| Suriname | 550 | 4.000 |
| Guiana Francesa | 65 | 350 |
| América do Sul | 313.029 | 3.391.569 |

Existe um aumento crescente no consumo dessa produção e a industrialização da água de coco vem aumentando a geração de seu rejeito, que corresponde a 85% do peso do fruto (SENHORAS, 2004). A fibra de coco é um material pertencente à família das fibras duras, tem como principais componentes celulose e a lignina que lhe conferem elevados índices de rigidez e dureza, chamado também de material lignocelulósico. A composição da casca é 45% de lignina, 35% de

celulose e 20% de componentes secundários segundo CORRADINI et al(2009).

Essa casca é o resíduo da indústria convencional do coco maduro. Esta parte do fruto pode ser usado como combustível para caldeiras ou na manufatura de cordoalha, tapetes, estofamentos e capachos. Estudos mais recentes sugerem ainda a utilização do resíduo da casca verde nas diversas atividade a seguir:

- Produção de manta e telas para proteção do solo: utilizadas para proteção de superfícies sujeitas a erosão e para recuperação de áreas degradadas pois tem lenta decomposição, aumenta a retenção de umidade e aumenta a atividade microbiana do solo criando condições favoráveis ao desenvolvimento vegetal (ARAGÃO, 2002);
- Alimentação animal: em nível mundial o coco é mais conhecido por suas propriedades oleaginosas. Depois de extraído o óleo da polpa, o resíduo, também chamado de torta, é empregado na alimentação de animais, por ser uma ração rica, com 20% de proteína (SIMÕES, 1996);
- Isolamento acústico: aliada ao aglomerado de cortiça expandido é um produto de alta qualidade, particularmente no caso do isolamento acústico, devido à absorção das baixas frequências, onde apresenta excelentes resultados dificilmente alcançados por outros materiais. O bom comportamento da cortiça em termos de estabilidade dimensional e elasticidade faz com que a fibra de coco seja a melhor solução técnica e natural para a resolução de problemas de isolamento acústico e térmico. (REGO et al, 1999);

- A indústria automobilística: ela sempre usou a fibra de coco na forração de bancos. Recentemente, a fibra vem substituindo a espuma injetada usada no estofamento, apresentando vantagens como não deformar e não esquentar, sendo excelente isolante térmico. Tecnicamente, a fibra do coco maduro é melhor do que a espuma derivada do petróleo, pois a espuma condensa o vapor do corpo, enquanto o produto feito de coco e látex permite a aeração, evitando assim, o incômodo do suor, uma vez que num país tropical, os produtos com essa fibra oferecem mais conforto. Não obstante, a utilização do coco verde também se mostra economicamente viável na fabricação de produtos de látex com fibras (ROCHA e GHELER JR., 2000);
- Compósitos: os biopolímeros compostos por fibra de coco verde acetilada e poliéster exibem alta capacidade de suportar tensão e resistência ao impacto. Já os contendo polipropileno como polímero e lignina como compatibilizador, mostram alta capacidade de flexão. No entanto, sem a presença de lignina, o biopolímero apresenta uma diminuição da resistência à tensão, à flexão, ao impacto e à elongação na ruptura. (DIAS, 2002)

Mesmo com estudos nos mais diversos campos, a demanda ambiental continua crescente. A utilização da fibra de coco como sorvente mostra potencial em seu uso como suporte para imobilização de enzimas contribuindo também para expansão e diversificação da tecnologia enzimática (BRIGIDA, 2006).

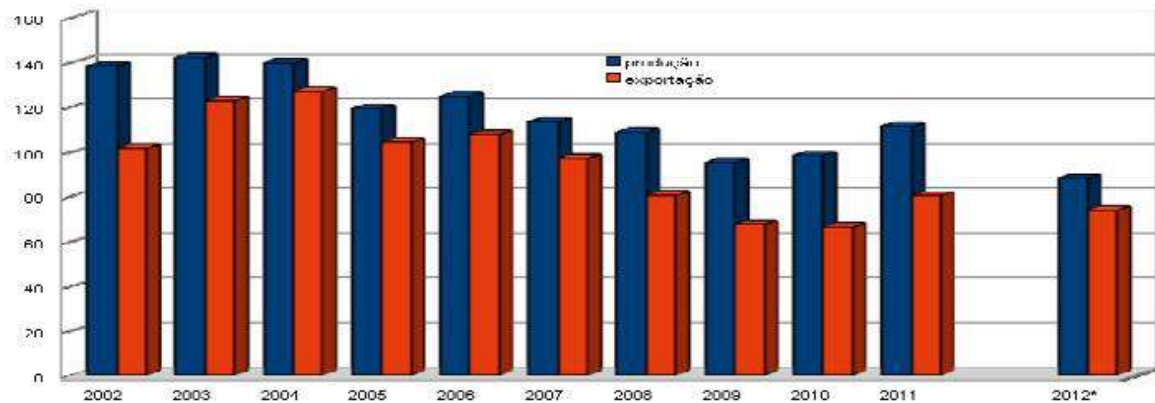
2.4. Fibra de folha de sisal

O outro suporte testado foi a fibra de sisal. Seu nome científico é *Agave sisalana* e é uma planta costumeiramente cultivada em regiões semi-áridas. Por ser resistente à aridez e ao sol intenso, os principais estados brasileiros que produzem são: Bahia (95,8% do total), Paraíba (3,5), Ceará (0,4%) e Rio Grande do Norte (0,3%) (FAO 2011). A produção em 2011 totalizou 111mil toneladas, representando cerca de 50% da produção mundial (AQUINO, 2011).

Todavia, o baixo nível tecnológico da cadeia produtiva gera um aproveitamento de somente 4% da planta para os fins bem difundidos como fabricação de cordas, tapetes e sacos. O restante chamados de resíduos de desfibramento, constituem, em média, 15% de mucilagem ou polpa (formado pela cutícula e por tecido paliçádico e parenquimatoso), 1% de bucha (fibras curtas) e 81% de suco ou seiva clorofilada (HARRISON, 1984). A composição da fibra curta é de 7% de lignina, 74% de celulose e 19% de componentes secundários (MOCHNACZ, 2003).

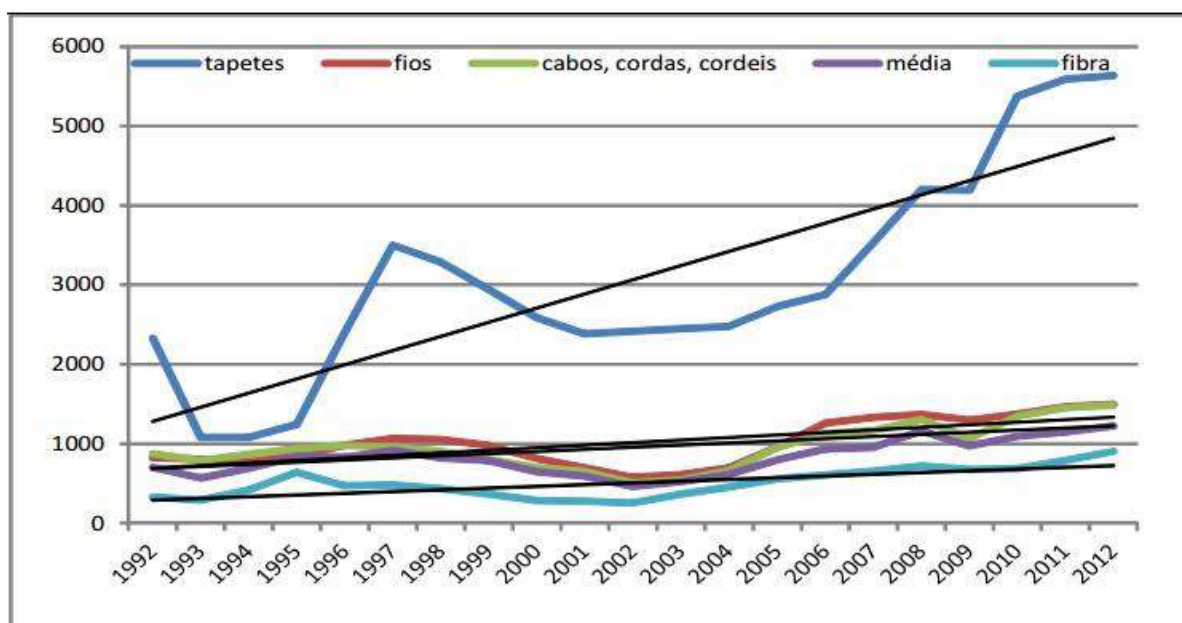
Mesmo com o baixo aproveitamento citado, na Figura 6 vemos um perfil de aumento da produção desde 2009. A queda na projeção de 2012 se deve a seca que assolou a região de cultivo no primeiro semestre. Na Figura 7, observamos que, para todos os produtos, os valores das

exportações realizadas estão em elevação com linha de tendência alta.
(CONAB, 2012/2013)



Fonte: SECEX e Conab
(*) projeção com base nas exportações até junho/2012

Figura 6: Produção e exportação brasileiras de sisal - mil toneladas



Fonte SECEX - Elaboração: Conab/Sugof/Gefip

Figura 7: Exportações brasileiras de sisal - 1992/2011 - R\$/t

Alguns usos alternativos para a fibra de sisal já estão sendo estudados e são encontrados na literatura como:

- Isolantes térmicos: funcionam como tal quando aplicadas em tubulações aquecidas com potencias de 22,5W, 40W e 62,5W,

no entanto, quando em contato com temperaturas médias maiores que 155°C, ocorre carbonização das fibras (NEIRA, 2005);

- Compósitos: tratamento superficial de fibras de sisal com NaOH visando aplicação em compósitos de matriz poliéster pois, após tratadas, se mostraram mais resistentes termicamente que as *in natura* (AMICO et al., 2004); híbridos vidro/sisal para utilização na construção civil, indústria de móveis, embalagens e no ramo automotivo. O compósito demonstra comportamento linear até a fratura final e apresentam propriedades mecânica superiores as fibras sintéticas usada sozinhas (BARROS, 2012); utilização de fibras de sisal em substituição às fibras sintéticas como reforço de compósitos poliméricos, é bastante atraente, principalmente por ser biodegradável, atóxica, de fonte renovável e apresentar baixo custo, o que condiz com os atuais esforços de proteção ao meio ambiente. Além disso, as fibras lignocelulósicas provocam pouco dano aos equipamentos durante os métodos convencionais de processamento de polímeros, quando comparadas às fibras e possuem também menor densidade (MATTOSO et al, 1997 e MARTINS, 2001); infiltração de fibras de sisal com sal alumínio para formação de fibras de alumina usando a técnicas de infiltração de nanopartículas para homogeneidade, isso garante melhor resistência mecânica das fibras em relação as sintéticas (ANDRADE JR. et al, 2005);
- Pasta celulósica: utilização industrial na fabricação de pasta celulósica para produção do papel Kraft de alta resistência, e de outros tipos de papel fino, como para cigarro, filtro, absorvente higiênico, fralda;

A revitalização da cultura do sisal deve ser feita agregando valor aos produtos derivados dela, como nos casos acima, ou ainda aproveitando os outros 96% da planta que são descartados (NEIRA, 2005).

Para este fim investir na incorporação de tecnologia ao processamento e a exploração de novas formas de utilização de seus derivados é imprescindível. O tratamento do mesmo é uma maneira de incorporar tecnologia pois pode melhorar suas propriedades e torna-lo ainda mais eficiente em suas funções.

2.5. Modificação das fibras

O tratamento das fibras é feito visando modificar a estrutura da mesma ou então retirar impurezas que possam interferir no processo para o qual será utilizada, a fim de obter maior área superficial. As duas categorias principais de modificação nas fibras dizem respeito aos agentes promotores de hidrólise e os oxidantes (MOCHNACZ, 2003).

Os principais utilizados são os hidrolíticos, destacando-se o hidróxido de sódio (NaOH) e amônia (NH₃). No caso do NaOH a solubilização parcial da hemicelulose e reflexos sobre lignina, sílica, ácidos urônicos e grupamentos O-acetil são as ações que mais se destacam. Já no tratamento amoniacal é observado mudança das dimensões da fibra com remoção de impurezas, lignina e hemicelulose (MOCHNACZ, 2003).

Outro tipo de tratamento além dos hidrolíticos citados é adicionando sulfeto de sódio (Na₂S) para remover lignina do material, seguido de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para remoção da lignina residual e componentes que conferem cor (ABREU, 2011). Também podem ser feitos tratamento ácidos onde o íon hidrônio atacam as regiões amorfas

das fibras, liberando as regiões cristalinas causando aumento na área superficial e na sua acessibilidade para ataque de outras substâncias (ROSA et al, 2010).

Todos estes tratamentos são agressivos e utilizam reagentes químicos, que geram rejeitos que precisam ser tratados antes de serem descartados, pois podem ser tóxicos ou causar dano ao meio ambiente. Neste sentido, alguns solventes “verdes” vem ganhando espaço e dois tipos foram selecionados para este estudo, os solventes eutéticos e os líquidos iônicos.

2.6. Solventes Eutéticos

Os solventes eutéticos (deep eutectic solvents - DES) vem chamando atenção por possuírem algumas vantagens em relação aos solventes orgânicos convencionais como: baixo custo e não causar impacto ambiental. Podem ser formados por uma variedade de sais orgânicos (amônio ou fosfato) e um doador de elétrons como álcoois, ácidos carboxílicos ou aminas (ABBOTT et al, 2004).

Essa mistura se comporta como substância pura no processo de fusão, ou seja, sua temperatura mantém-se inalterada do início ao fim da fusão, e o ponto de fusão é menor que das substâncias puras, de modo que a possível separação por aumento da temperatura é ineficaz. A representação gráfica do fenômeno é mostrada na Figura 8.

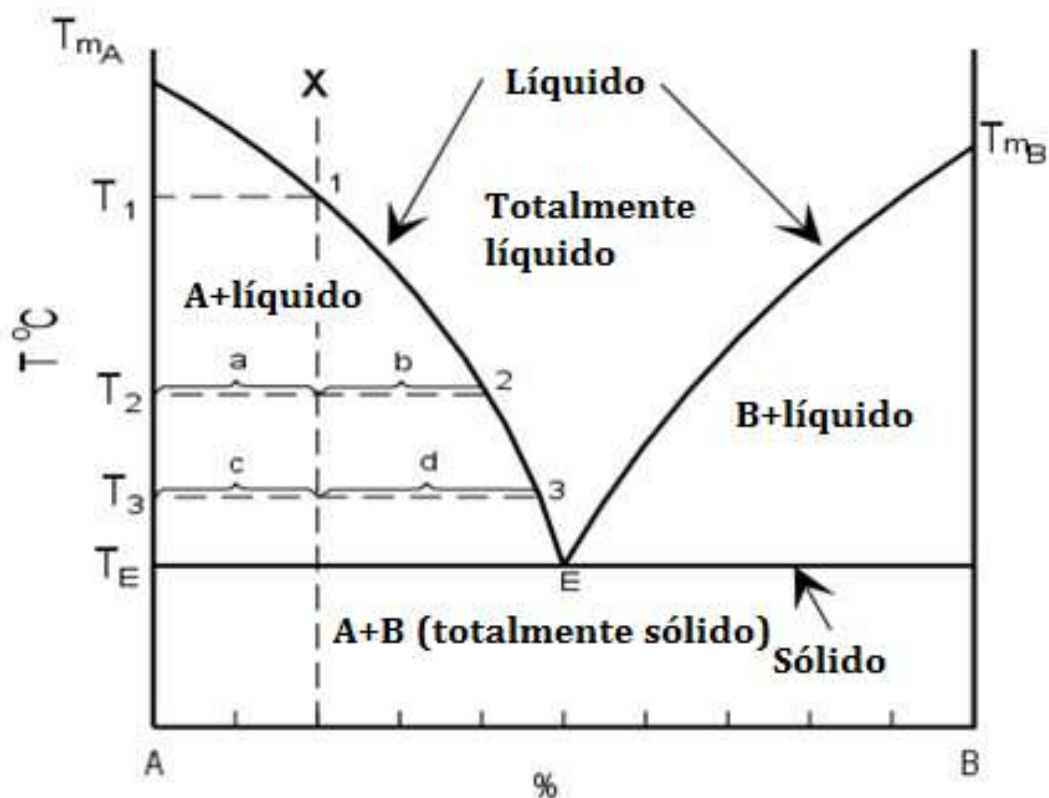


Figura 8: Diagrama de fase mostrando ponto eutético entre A e B

Os solventes eutéticos possuem diferentes aplicações na literatura, sendo a principal a dissolução de polímeros e metais como meio para biotransformação (WELTON, 1999; ABBOTT et al, 2004).

2.7. Líquidos iônicos

Os Líquidos Iônicos (LI) são sais fundidos que contém somente íons na forma líquida, apresentam ponto de fusão abaixo de 100°C, pressão de vapor desprezível, alta estabilidade térmica, e a dissolução de vários compostos.

Além disso, são bons solventes para várias substâncias orgânicas e inorgânicas. Possuem vantagens como: diferentes combinações de reagentes podem estar na mesma fase, tem potencial para ser altamente

polar mesmo com solventes não coordenados. Não são voláteis e por isso podem ser usados em sistemas a vácuo (WELTON, 1999).

Novas combinações de líquidos iônicos estão sendo sintetizados para serem funcionais, biodegradáveis e biocompatíveis. Podem ser uma alternativa ao uso de solventes na biocatálise em meios não-aquosos, e ainda podendo garantir a enzima uma melhor regiosseletividade e enantiosseletividade além da estabilidade química e térmica.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

- Casca de coco verde doada pela pesquisadora Dra. Ana Iraidy da Embrapa - CTAA;
- Folha de sisal (*Agave sisalana*) doada pela APAEB;
- Lipase produzida pelo crescimento de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em biorreator de bancada com capacidade de 2L, agitação magnética (650rpm) e controle de aeração (1,5 L/min) e temperatura (28°C);
- Solvente eutético preparado pelo aquecimento a 100°C da mistura 1/2 de cloreto de colina e a substancia escolhida (ácido acético, ureia ou glicerol), em proporção molar, até que se obtivesse uma mistura homogênea;
- Líquido iônico, acetato de colina (ChAc), preparado com a lenta adição do ácido acético ao bicarbonato de colina sob agitação, na proporção molar de 1/1. Depois da reação completa o líquido foi liofilizado para retirada completa da água presente.

3.2. Preparo e padronização das fibras

As fibras de coco e de sisal utilizadas no trabalho passaram por um processo de trituração seguido de peneiração para que se obtivessem fibras padronizadas e com mesma granulometria. Foi utilizado, em ambos os casos, as que passam da peneira de 32 mesh. A Figura 9 representa o fluxograma do preparo.

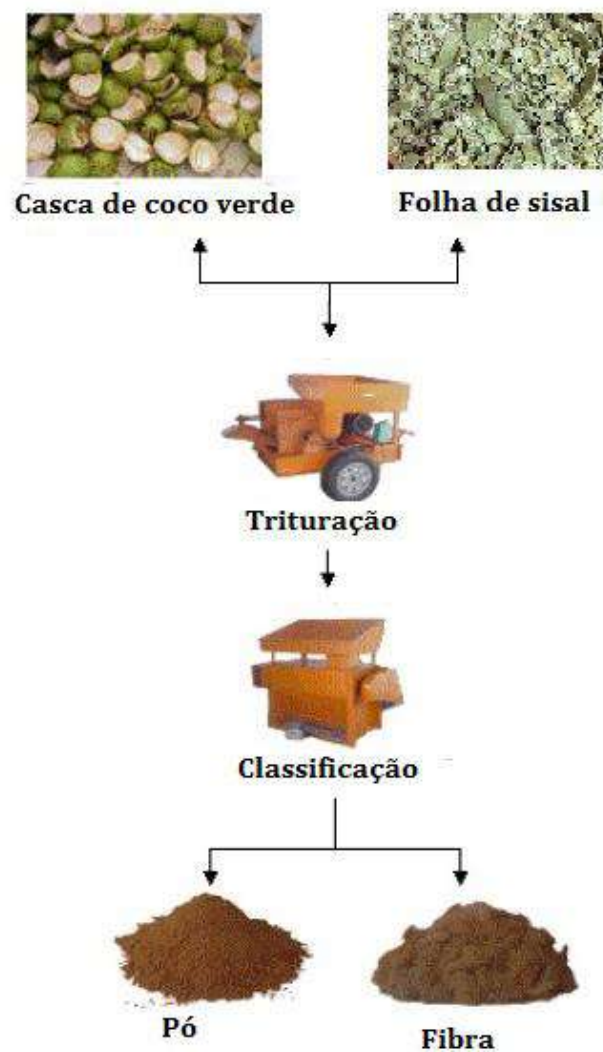


Figura 9: Fluxograma do processo de obtenção das fibras utilizadas, adaptado de Brígida, 2006

Depois de padronizadas ainda passaram por três lavagens, durante 1h a 28°C, a fim de retirar impurezas que pudessem dificultar a imobilização,

principalmente as saponinas presentes na fibra de sisal. Após lavagem foram filtradas e secas durante cerca de 16h em estufa a 60°C.

3.3. Tratamento das fibras

No estudo as fibras de coco e sisal foram tratadas com 3 solventes eutéticos diferentes: Cloreto de colina/Ureia (ChCl/Ureia); Cloreto de colina/Glicerol (ChCl/Glicerol); Cloreto de colina/Ácido acético (ChCl/HAc).

Os solventes e o líquido iônico foram preparados conforme descrito no item 3.1. As fibras foram cobertas com o solvente (mais ou menos 1g de DES a cada 100mg de fibra), a mistura foi aquecida a 100°C por 1h (Figura 10). Após, o tratamento a fibra passou por três lavagens com etanol para garantir que o solvente fosse completamente retirado. Para remoção completa da água as fibras foram colocadas em liofilizador.



Figura 10: Tratamento das fibras de coco e sisal com diferentes solventes

O objetivo destes tratamentos é modificar a forma estrutural da fibra a fim de aumentar sua área superficial e melhorar a adsorção das enzimas na fibra.

3.4. Imobilização

A imobilização foi feita em um sistema de seringas (Figuras 11 e 12) contendo 0,3g da fibra tratada e 3 ml da solução enzimática contendo a lipase de *Y. lipolytica* com carga enzimática em torno de 3000 U/L a temperatura ambiente durante 4h sob agitação. Estas condições foram otimizadas por experimentos prévios (BRIGIDA, 2010).

Na solução enzimática adicionou-se um inibidor de protease a fim de que a imobilização não fosse prejudicada, pois a ação da protease neste meio se mostrou bastante forte. O escolhido foi o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). Este foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para promover uma concentração final de 1mM. A cada 10ml do extrato enzimático foram adicionados 0,5ml da solução (BRIGIDA, 2010).

O embolo da seringa foi posicionado de forma que restasse o mínimo de ar dentro, para garantir que a solução enzimática e a fibra estejam em contato durante todo o tempo.

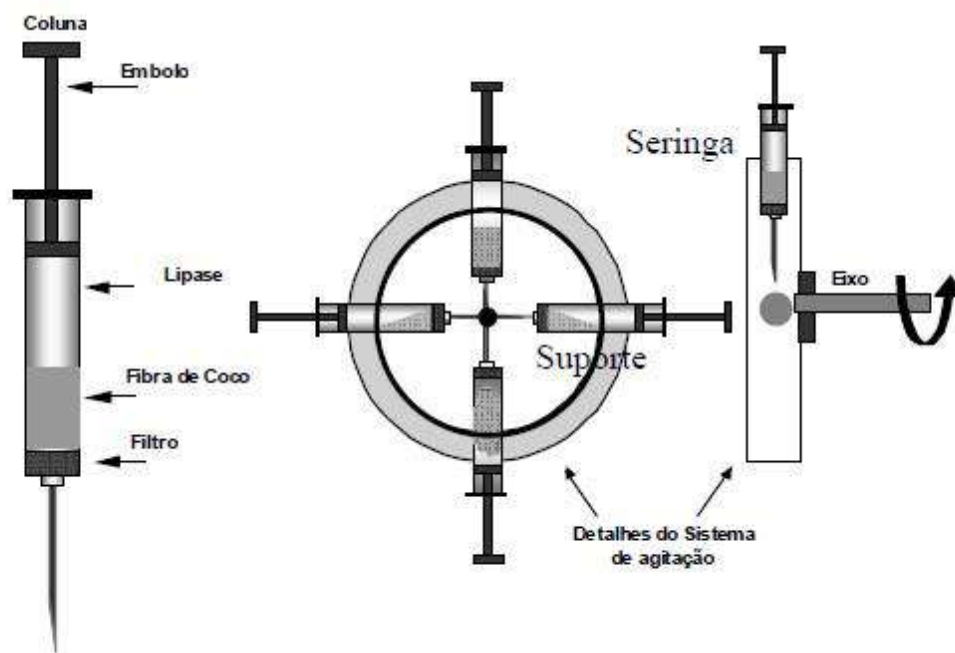


Figura 11: Esquema do aparelho utilizado para imobilização. (Veredas, 2000)



Figura 12: Equipamento real utilizado para imobilização

Ao final da imobilização o sobrenadante foi separado e guardado para futuras análises e a fibra lavada com 25ml de tampão fosfato de sódio 0,1M, filtrada e seca em uma placa de petri ao ar livre.

3.5. Medida da atividade enzimática livre

O método utilizado se baseia na formação de um produto cromóforo (*p*-nitrofenol) a partir da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato (PNFL) catalisada por lipases (Figura 13).

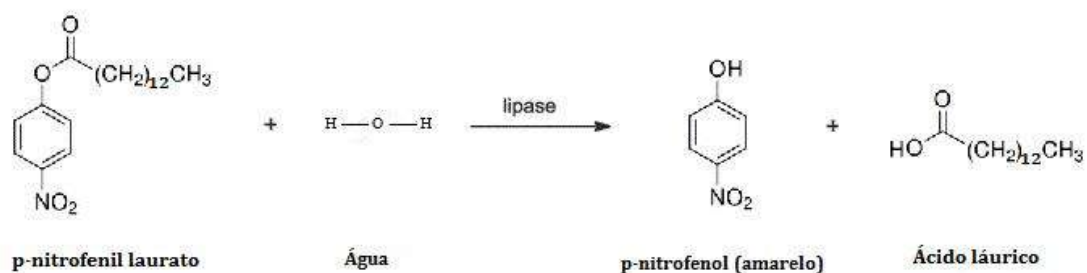


Figura 13: Reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato por lipase

O equipamento utilizado para acompanhar a cinética de formação do *p*-nitrofenol a 410 nm e 37°C foi o espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL da solução enzimática a 1,80 mL de uma solução contendo 0,018g de *p*-nitrofenil laurato (pNFL), 1mL de DMSO e 100mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. Uma unidade de atividade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 μmol de *p*-nitrofenil laurato por minuto nas condições de ensaio.

O cálculo da atividade enzimática foi feito pela Equação 3:

$$A_L = \frac{(\alpha \cdot F \cdot V_f)}{V_a} \cdot F_d \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

A_L = atividade (U/mL)

α = coeficiente angular da reta (Abs. x tempo)

F = fator da curva padrão (Abs. x concentração de p-nitrofenol)

V_f = volume final (mL)

V_a = volume de amostra (mL)

F_d = fator de diluição (Diluição/tempo)

3.6. Medida da atividade do derivado

A combinação fibra + enzima é chamado de derivado. Nesta medida utiliza-se o derivado lavado com tampão fosfato de sódio 0,1M, seco e pesado. Adicionou-se 0,3g do derivado a 30 ml da mesma solução utilizada para medição da atividade livre pela dosagem do *p*-nitrofenol, mantendo-se sob agitação constante.

A evolução da reação foi acompanhada durante 10 minutos retirando amostras de 2,5ml livre do derivado para leitura em espectrofotômetro a 410 nm a cada minuto, o volume retirado retornou a reação após leitura.

O valor da atividade é calculado de acordo com a Equação 4.

$$A = \frac{\alpha * f * V_R * 1,4738}{m * 0,001} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde:

A = atividade do derivado (U/kg)

α = coeficiente angular da reta (Abs. x tempo)

f = fator da curva padrão (Abs. x concentração de p-nitrofenol)

V_R = volume de reação (mL)

m = massa de derivado usada (g)

Além deste valor, para uma comparação efetiva entre a quantidade imobilizada e o que realmente apresenta atividade, são calculados a atividade recuperada ($At_{recuperada}$) e o rendimento de imobilização (R) a partir das Equações 5 e 6.

$$At_{recuperada} = \frac{At_d}{At_0 - At_f} * 100 \quad \text{Eq. 5}$$

$$R(\%) = \frac{At_0 - At_f}{At_0} * 100 \quad \text{Eq. 6}$$

Onde:

At_d = atividade hidrolítica no derivado (U)

At_0 = atividade hidrolítica na solução inicial de enzima (U)

At_f = atividade hidrolítica no sobrenadante após um dado período de imobilização (U)

3.7. Medida da atividade proteolítica

Para a medida da atividade de proteases no meio foi utilizado 0,5 ml de solução 0,5% (p/v) de azocaseína em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 como substrato. Ao substrato, adicionamos 0,5 mL do extrato enzimático e incubamos a mistura por 40 minutos a 32°C em banho-maria. Completado o tempo, adicionou-se 0,5 ml de ácido tricloroacético (15%

p/v), objetivando a precipitação de moléculas proteicas não hidrolisadas pelas enzimas proteolíticas (CHARNEY et al, 1947).

Em seguida a amostra foi centrifugada a 3000 rpm, por 15 minutos. Após, 1 ml do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo para o qual se adicionou 1 ml de KOH 5N, o que gerou uma cor laranja – rosada, característica dos grupamentos azo em pH alcalino. A intensidade desta coloração foi lida em espectrofotômetro a $\lambda = 428$ nm, contra um branco (onde não houve reação). No branco o TCA (ácido tricloroacético) foi adicionado antes do extrato enzimático. (CHARNEY et al, 1947).

Neste método uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,01 de absorvância, que a amostra apresentou em relação ao branco por minuto nas condições de reação, e pode ser calculada de acordo com a Equação 7.

$$A_L = \frac{ABS_L - ABS_B}{0,01 * t * V_a} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde:

A_L = atividade (U/mL)

ABS_L = absorvância da amostra lida

ABS_B = absorvância do branco

t = tempo de reação (min)

V_a = volume de amostra (mL)

3.8. Medida da concentração de proteína

A reação do corante coomassie brilliant blue G-250 com a proteína modifica a cor refletida de vermelho para azul e possibilita a quantificação das proteínas totais na amostra. O procedimento se encontra descrito por BRADFORD (1976). A leitura foi feita no aparelho leitor de microplacas a 595nm em microplacas de 96 poços contendo 0,01mL da amostra e 0,19mL do reagente de Bradford da Bio-Rad.

4. Resultados e discussão

4.1. Comparação dos tratamentos na fibra de coco para imobilização

Uma vez que a adsorção nas fibras tem características de uma troca-iônica, há probabilidade de serem adsorvidas outras moléculas além da lipase de interesse, a mais provável neste extrato de *Y. lipolytica* seria protease, por possuir afinidade por regiões hidrofóbicas (HAMILTON et al, 2000).

Na Tabela 2 verifica-se que realmente há uma forte ação de proteases no extrato com o qual se trabalhou. A atividade do derivado encontrada foi de 19,93U/kg na fibra sem tratamento, o que é muito baixo se comparado com os valores da literatura que chegam a 500 U/kg (BRIGIDA, 2010). Na fibra tratada com ChCl/Ureia o valor foi um pouco mais elevado mas não correspondeu à realidade esperada.

Pode ser verificado então que a atividade proteolítica no meio é bastante elevada (291,67 U/L) quando as reportadas são em torno de

100U/L. (BRIGIDA, 2010). O baixo valor na concentração de proteínas é a evidência definitiva de que mesmo antes de imobilizado, as enzimas presentes no extrato já estavam sendo inativadas pela presença de protease no meio bruto.

Tabela 2: Atividade do derivado, proteolítica e concentração de proteína referentes a imobilização sem presença de PMSF em fibra de coco.

| Fibra de coco | Atividade do derivado (U/kg) | Atividade proteolítica (U/L) | | Concentração de proteínas (mg/L) | |
|----------------|------------------------------|------------------------------|----------------|----------------------------------|--------------|
| | | Início | Final | Início | Final |
| Sem tratamento | 19,93 ± 6,95 | 291,67 ± 37,86 | 288,89 ± 71,38 | 13,33 ± 1,01 | 6,34 ± 1,69 |
| ChCl/Ureia | 92,46 ± 17,85 | 291,67 ± 17,24 | 240,83 ± 20,53 | 52,75 ± 1,95 | 28,63 ± 2,10 |

A adição de um inibidor de protease no extrato enzimático foi necessária para que as imobilizações fossem viáveis e estáveis. O selecionado foi o PMSF por sua concentração ideal, a fim de que inibisse as proteases e não prejudicasse a atuação da lipase e por já ter sido estudada anteriormente para lipase de *Y. lipolytica* por BRIGIDA (2010).

Após o interferente ser controlado, novas imobilizações foram feitas utilizando os quatro tipos de fibra tratada e uma fibra natural para ser o ponto de comparação com a literatura. Os estudos de BRIGIDA (2010) mostraram rendimento de imobilização em torno de 47% e a atividade do derivado em 500 U/Kg, os melhores resultados, no entanto, foram obtidos com o extrato pré-purificado e a fibra tratada com peróxido de hidrogênio, obtendo 2000 U/kg.

Neste estudo obtivemos rendimento de imobilização acima de 98% em todas as fibras tratadas, com exceção da fibra não tratada que ficou com 81%. Em termos de atividade do derivado, apesar do rendimento menor em comparação as outras, a fibra natural foi a que obteve melhor resultado (360

U/Kg) enquanto as tratadas ficaram em torno de 250 U/Kg. O tratamento com ChCl/Ureia foi o menos eficaz. A Tabela 3 resume os resultados.

Quando comparado à concentração de proteínas da Tabela 2 e 3, percebe-se que realmente a adição de PMSF foi efetiva e a lipase está se mantendo conservada no extrato.

Tabela 3: Rendimento de imobilização, atividade do derivado e concentração de proteínas referentes à imobilização com presença de PMSF em diversos tratamentos com fibra de coco.

| Fibra de coco | Rendimento de imobilização (%) | Atividade do derivado (U/kg) | Concentração de proteínas (mg/L) | |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------|
| | | | Início | Final |
| Sem tratamento | 81,68 | 360,09 ± 27,95 | 139,61 ± 15,00 | 87,06 ± 3,60 |
| ChCl/HAc | 98,41 | 243,96 ± 18,43 | 103,54 ± 14,40 | 5,89 ± 1,42 |
| ChCl/Ureia | 98,50 | 190,44 ± 17,85 | 92,71 ± 10,80 | 27,86 ± 2,59 |
| ChCl/Glicerol | 99,79 | 240,59 ± 24,17 | 103,54 ± 14,40 | 37,36 ± 5,56 |
| Acetato de colina | 99,76 | 263,11 ± 11,42 | 103,54 ± 14,40 | 3,89 ± 2,75 |

Para que seja possível comparar efetivamente todos os tratamentos, a atividade recuperada foi calculada. Dessa forma, pode-se estudar outros parâmetros através de uma única equação. Na Figura 14, fica claro o quanto o tratamento com ChCl/Ureia foi prejudicial para a imobilização efetiva, as fibras tratadas com ChCl/HAc, ChCl/Glicerol e Acetato de colina tiveram desempenhos bem similares. A fibra natural se destacou tendo uma atividade recuperada de 8%. Existem resultados superiores a este, no entanto, foram utilizando lipases de outros micro-organismo como em BRIGIDA (2006) abrangem uma faixa de 15 a 48% de atividade recuperada.

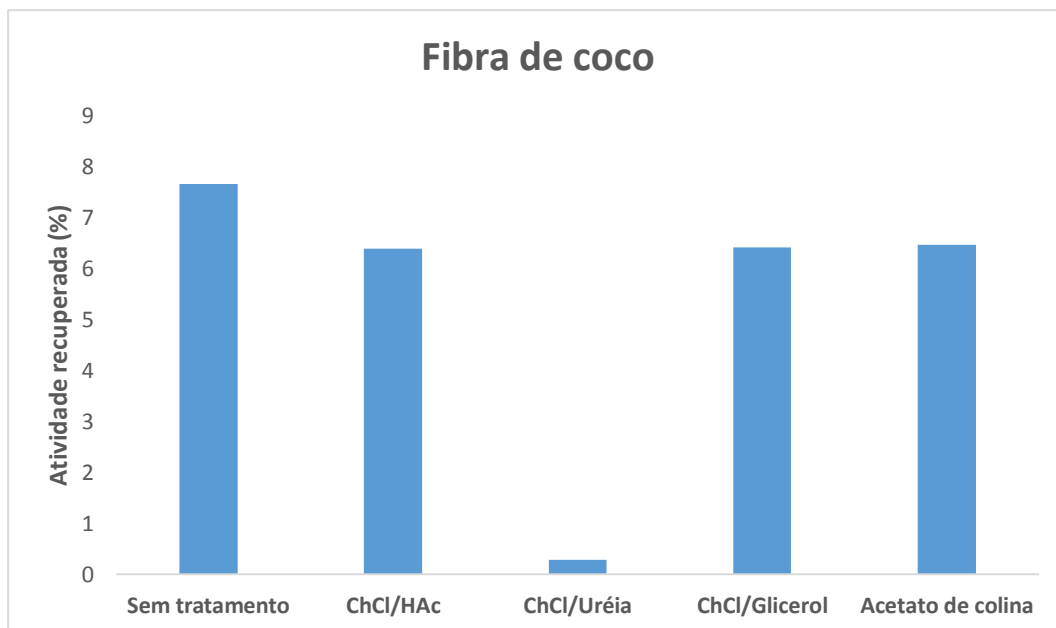


Figura 14: Comparação da atividade recuperada entre os tratamentos da fibra de coco

A diferença entre a eficiência das imobilizações pode ter ocorrido devido a interação que ocorreu entre a fibra e o solvente com o qual foi tratado. Ambos tratamentos com a estrutura HCOO^- , ChCl/HAc e acetato de colina, tiveram uma concentração de proteína retida maior que a dos outros (97,65 e 99,65 mg/L, respectivamente), no entanto, não se refletiu na melhora da atividade, em relação a fibra sem tratamento. Isso leva a acreditar que a interação com a fibra, além da possível retirada de lignina e hemicelulose da estrutura, pode ter levado interações que prejudicam a atividade lipolítica.

Outro tratamento que também prejudicou a atividade, ainda mais fortemente, foi o com ChCl/Uréia. A modificação estrutural da fibra com este tratamento pode ter feito com que a enzima imobilizasse em uma posição onde o acesso ao substrato tenha sido dificultada com o sítio ativo com impedimento estérico. Já o tratamento com ChCl/Glicerol possivelmente não modificou muito a estrutura da fibra já que os resultados foram similares a sem tratamento.

De forma geral, mesmo com todos esses tratamentos o que mostra ser o principal componente que inibiu a lipase é o alto teor de lignina presente na fibra de coco (em torno de 45%), os solventes utilizados não foram bem sucedidos na remoção deste componente pois, quando tratada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), chega a atingir uma atividade recuperada de 86,3% (BRIGIDA, 2010).

4.2. Comparação da imobilização entre os tratamentos na fibra de sisal

A fibra de sisal tem características próprias que dificultam sua utilização. Depois de tratada e pronta para uso, fica um material muito leve e não é facilmente separado da fase líquida depois de hidratado.

Após a imobilização, chega a reter 81,77% de água em peso e mesmo 48h em dessecador não chega a ficar completamente seco. Esse fato dificulta sua recuperação e possível reutilização.

A fim de padronizar os experimentos, o PMSF também foi colocado no extrato para prepara-lo para o processo de imobilização. Não foram encontrados na literatura testes feitos utilizando a fibra de sisal para fins de imobilização. A finalidade mais estudada é a aplicação desta na obtenção de compósitos.

A recuperação da fibra sem tratamento não foi possível devido grau de umidade, pois secar a fibra em equipamentos que modificam a temperatura do derivado, a fim de eliminar a água, poderia afetar a atividade enzimática, prejudicando a comparação dos resultados.

Diferente da primeira fibra testada, os tratamentos tiveram efeito bem variado e todos tiveram rendimentos de imobilização acima de 99%. Quando

usado o ChCl/HAc a atividade do derivado ficou bem próximo do que era obtido com a fibra de coco, em torno de 290 U/Kg, já com o Acetato de colina e o ChCl/Glicerol esse resultado passou para 460 e 690 U/Kg, respectivamente. O tratamento mais eficiente para a fibra de sisal foi com ChCl/Ureia, alcançando 873,67 U/Kg. Os resultados estão resumido na Tabela 4. A concentração de proteínas mostra que o uso do PMSF também foi eficiente nesta fibra.

Tabela 4: Rendimento de imobilização, atividade do derivado e concentração de proteínas referentes aos diversos tratamentos com fibra de sisal.

| Fibra de sisal | Rendimento de imobilização (%) | Atividade do derivado (U/kg) | Concentração de proteínas (mg/L) | |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------|
| | | | Início | Final |
| Sem tratamento | 81,72 | 1694,58 ± 124,03 | 185,63 ± 12,20 | 47,29 ± 10,31 |
| ChCl/HAc | 99,85 | 296,38 ± 25,66 | 103,54 ± 14,40 | 37,40 ± 5,19 |
| ChCl/Ureia | 99,79 | 873,67 ± 26,49 | 191,04 ± 21,82 | 47,85 ± 6,10 |
| ChCl/Glicerol | 99,78 | 694,90 ± 22,60 | 103,54 ± 14,40 | 74,31 ± 7,99 |
| Acetato de colina | 99,95 | 463,72 ± 31,36 | 103,54 ± 14,40 | 41,77 ± 8,67 |

Após calcular a atividade recuperada em cada um dos casos vemos, na Figura 15, que o perfil de melhora entre os tratamentos se mantem e o que se destaca é o feito com ChCl/Ureia que alcança 21% de atividade recuperada.

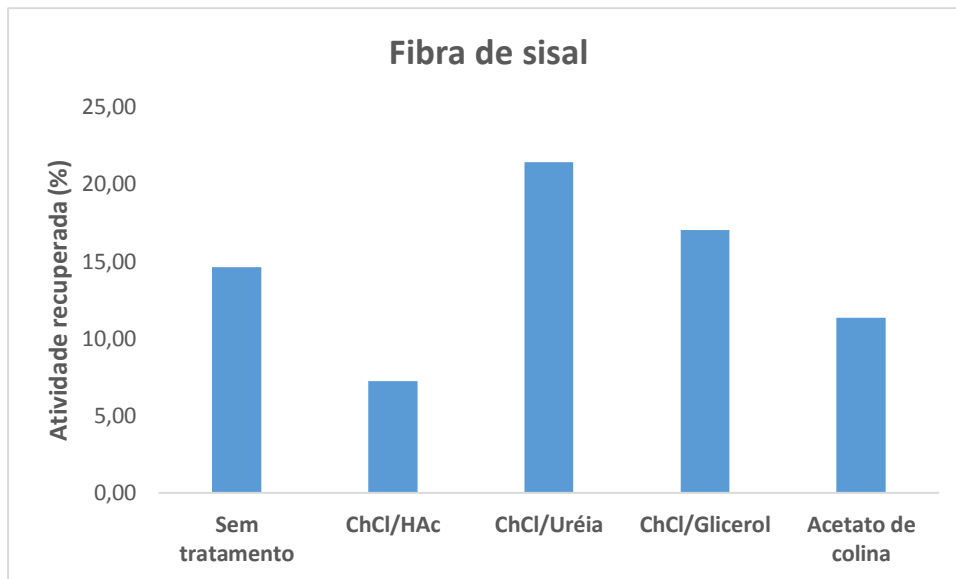


Figura 15: Comparação da atividade recuperada entre os tratamentos da fibra de coco

Essa grande melhora dos resultados entre a imobilização com fibra de coco e a de sisal já era esperada, tendo em vista que o sisal tem apenas 7% de lignina em sua composição. Um dos componentes secundários que poderiam causar alguma baixa eficiência de imobilização são as saponinas, as quais inibem a atividade lipolítica como visto por CASTRO et al (2009).

Os tratamentos apresentam a vantagem de contribuírem para a diminuição deste componente, já que elas são hidrolisadas na presença de ácidos e/ou bases, devido a hidrotermólise (aquecimento na presença de água) (RIBEIRO, 2012). A posterior lavagem com etanol contribui para extração do residual que possa ter ficado na estrutura.

Outra vantagem dos tratamentos é a modificação estrutural já discutida. É interessante destacar, que o tratamento com ChCl/Ureia aqui, teve comportamento exatamente oposto ao que ocorreu com a fibra de coco, neste caso, graças a baixa quantidade de lignina e a hidrólise das saponinas, todos os interferentes foram retirados, deixando a superfície toda hidrofílica, ideal para a adsorção da enzima em sua melhor forma conformacional.

Quando comparadas as Figuras 15 e 14 fica claro que a imobilização da lipase de *Y. lipolytica* em fibra de sisal tratada com ChCl/Ureia é a mais promissora, por isso os estudos de estabilidade serão baseadas nesta combinação.

4.3. Teste de estabilidade

4.3.1. Temperatura

Com o tratamento mais promissor definido, a estabilidade da imobilização é igualmente importante para que seja possível uma futura aplicação. No caso da enzima livre, a estabilidade em diferentes temperaturas foi estudada por BRIGIDA (2010) e PEREIRA-MEIRELLES (1997). No primeiro deles, a atividade máxima foi reportada em 40°C, sendo observada a perda de 50% da atividade entre 25 e 35°C e entre 45 e 65°C apresentou queda constante chegando a quase zero, após 200 minutos de incubação. Em 37°C, a enzima ainda reteve 30% da atividade. No segundo caso, os perfis observados nas diversas temperaturas foram semelhantes, mas após 200 minutos de incubação reteve 60% da atividade.

O comportamento observado após a imobilização da lipase em fibra de sisal tratada com ChCl/Ureia foi bastante próximo do observado na literatura. A Figura 16 mostra o perfil, em 40°C temos o pico da atividade do derivado, enquanto a 50, 60 e 70°C o decaimento

rápido, mais da metade da atividade já é perdida a 50°C e em 70°C a enzima não apresenta atividade.

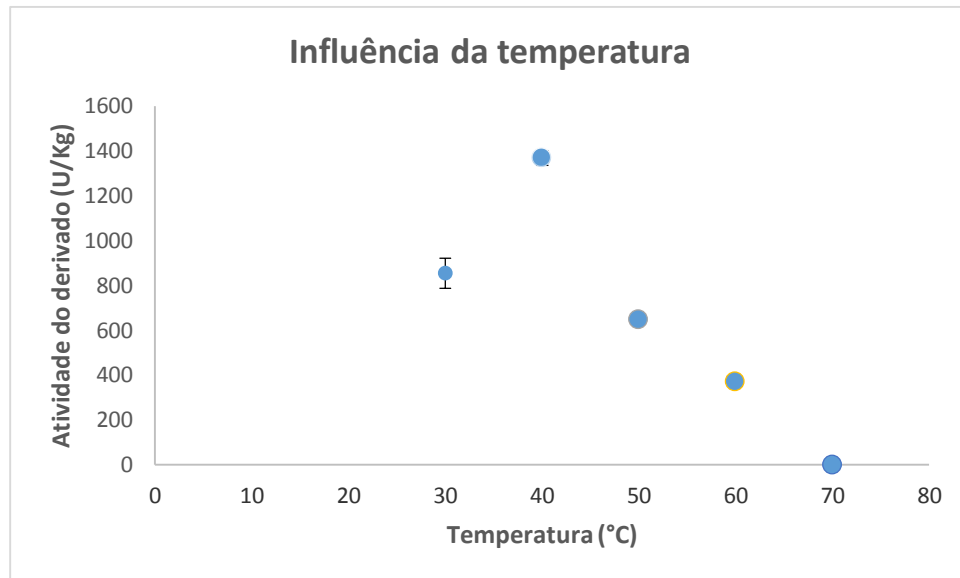


Figura 16: Influência da temperatura na atividade do derivado após 30 minutos de contato

A queda brusca da atividade de 50, 60 e 70°C se deve a inativação da enzima por desnaturação pela temperatura. Devido à alta energia disponível, as ligações que mantem a estrutura terciária da enzima se quebram e causa a perda de função. Já a temperatura mais baixas como em 30°C, a baixa atividade se deve a menor agitação das moléculas o que dificulta o choque entre substrato e enzima para acontecer a reação, ou seja, a reação enzimática não atinge a velocidade máxima.

Ao longo do tempo de exposição do derivado à condição adversa, a atividade retida também se modifica. Como podemos acompanhar na Figura 17, a queda de atividade no derivado a 40°C é bem mais lenta do que quando comparada a segunda melhor temperatura, 30°C, após 4h de incubação somente cerca de 30% foi perdida.

Nas outras temperaturas com apenas 2h de incubação mais de 50% da atividade já tinha sido perdida, não apresentando mais viabilidade para aplicação.

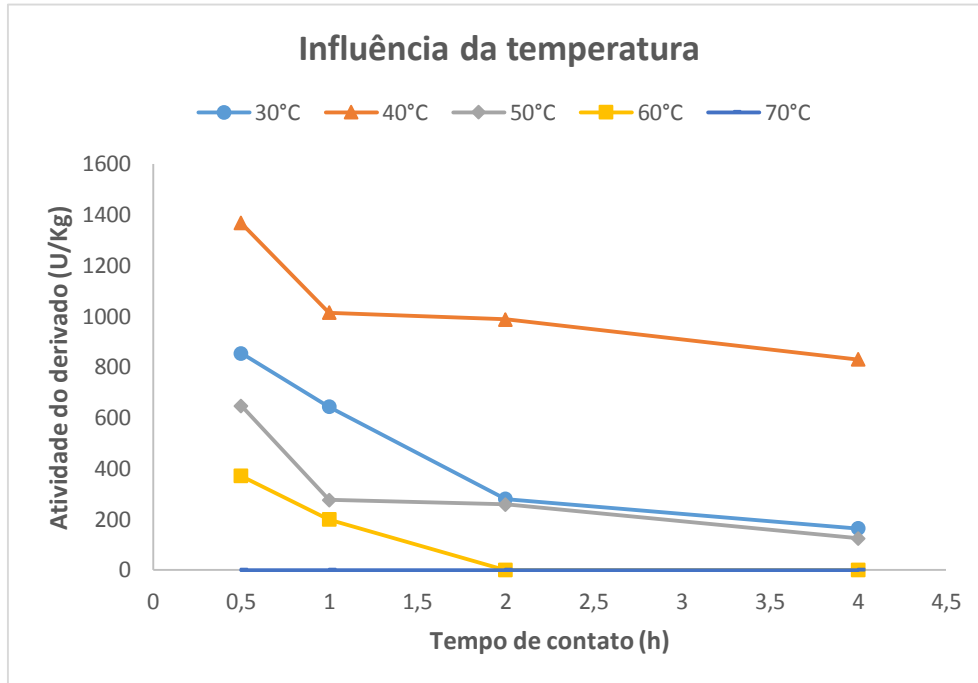


Figura 17: Influência da temperatura ao longo do tempo

Os efeitos de desnaturação continuam agindo ao longo do tempo de contato do derivado com a temperatura, o que significa que a enzima perde atividade até que toda ela seja perdida. O que se tem é que quanto mais perto da temperatura ótima, maior é o tempo de meia vida da enzima (tempo quando metade da atividade é perdida).

Com a temperatura ótima definida, deve-se estudar a estabilidade no segundo parâmetro que mais tem influência sobre a atividade enzimática, o pH.

4.3.2. pH

O pH do meio em que acontecerá a reação enzimática também deve ser alvo de estudo, para que o processo não seja prejudicado

com perdas. Trabalhos anteriores de BRIGIDA, 2010 mostraram que a enzima livre, a 37°C, possui um pico de atividade hidrolítica em pH 7 e cai pela metade já no pH 8, no entanto, em pHs mais ácidos ela se mantém bem estável. Outro estudo que investigou a estabilidade da lipase de *Y.lipolytica* livre foi o de PEREIRA-MEIRELLES (1997), que não foi estudado o comportamento em pH ácido. O autor obteve o pico de atividade também em pH 7 mas ainda permaneceu estável em pH 8, mesmo após 30 minutos de incubação, já em pH 9 a queda foi bem acentuada e, após 20 minutos, já não se observava atividade.

Com a enzima imobilizada, a atividade enzimática ficou bastante estável na faixa de pH entre 6 e 8. Nos pontos mais extremos a perda foi grande, em torno de 60% como podemos ver na Figura 18.

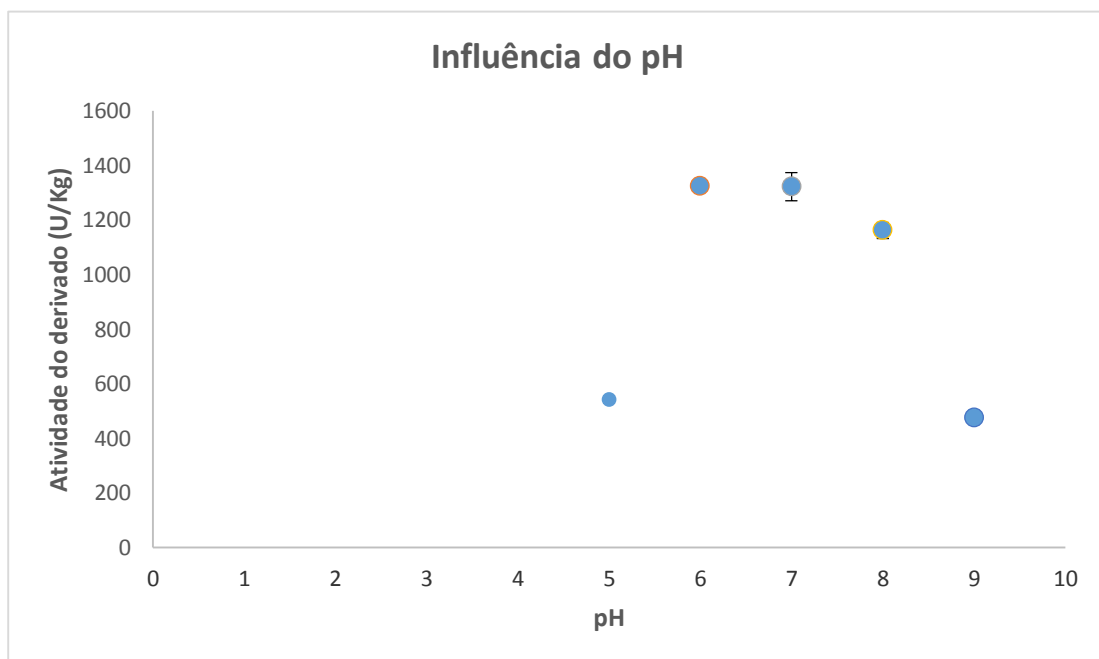


Figura 18: Influência do pH na atividade do derivado após 30 minutos de contato

Neste caso, o pH influencia não só na enzima como na superfície do suporte, ambos tem a carga superficial alterada devido a maior ou menor concentração do íon H^+ no meio. Em relação ao suporte, a mudança de pH de ácido a básico dá um caráter de troca-iônica a ele,

deixando sua superfície carregada positiva ou negativamente, respectivamente.

A mesma coisa acontece com a carga superficial da enzima, no entanto, a protonação e dissociação decorrente da alteração do pH pode afetar os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo e com isso prejudica a catálise enzimática.

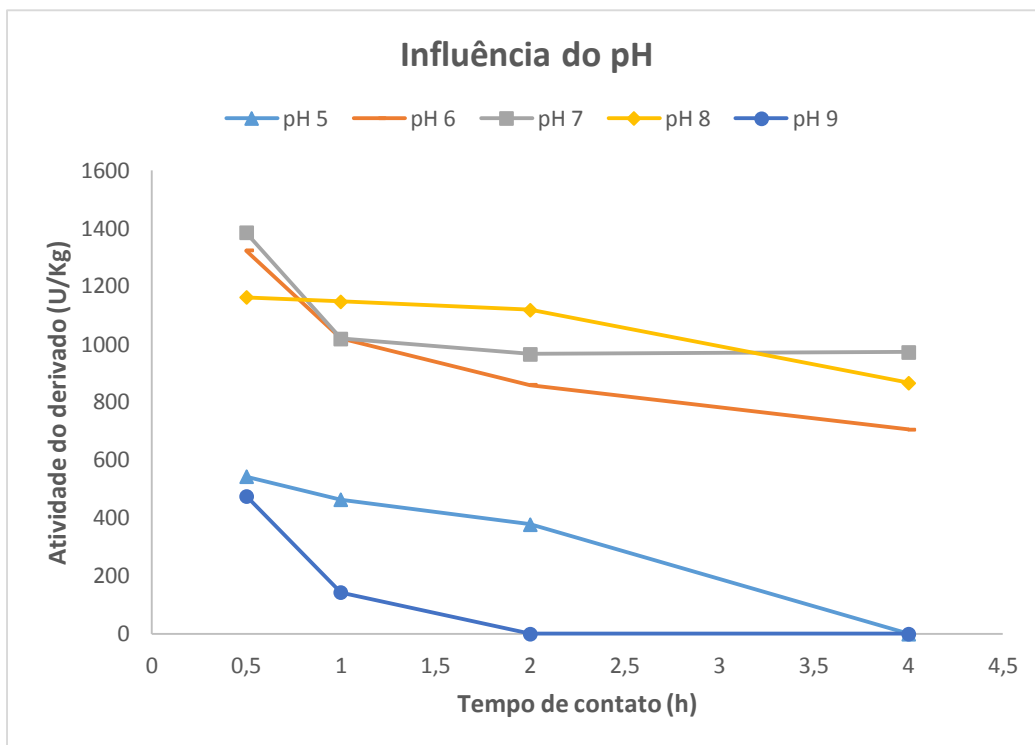


Figura 19: Influência do pH ao longo do tempo

Mesmo após avaliar estes efeitos de carga causados pelo pH, é importante verificar sua influência ao longo do tempo. Então, quando analisado o decaimento de atividade, é possível perceber que, apesar da maior atividade inicial ser obtida em pH 7, logo em 1h de contato vemos uma queda nesta e se matem depois, em pH 6 o mesmo perfil é notado. No pH 8 ela é bem estável e se mantém quase constante até 2h de incubação. Os pH extremos, 5 e 9, após 4h já não se há nenhuma atividade retida. A Figura 19 resume os resultados.

O tempo de contato, assim como no caso da temperatura, também continua atuando e afetando o tempo de meia vida da enzima. Estando otimizadas as condições de utilização do derivado, deve ser dada uma aplicação a fim de tornar útil a agregação de valor da fibra.

5. Conclusão

O presente estudo buscou aliar e avaliar a viabilidade da utilização de um resíduo agroindustrial como suporte para imobilização da lipase de *Y.lipolytica*. Dentro os testados, o resíduo que teve melhor desempenho foi a fibra de sisal tratada com ChCl/Ureia. O fato de o resíduo ter sido tratado com solventes eutéticos e líquido iônico diferencia o trabalho, pois, nos métodos mais difundidos e utilizados (tratamentos químicos), os tratamentos são feitos com solventes químicos que são agressivos para o meio ambiente.

Em termos de estabilidade, a enzima não apresentou mudanças de comportamento quando comparada com a enzima livre. A condição ótima encontrada para catálise foi 40°C e pH 7. A influência da temperatura na atividade é bem mais significativa que a do pH, nas temperatura adjacentes a ótima, 30 e 50°C, a enzima só retém 50% de atividade, quanto nos pHs de 6 a 8 a queda não é alarmante.

Mais estudos são necessários para tornar a aplicação do derivado desta imobilização interessante. A alta umidade que o suporte carrega torna difícil sua recuperação e manipulação, o que, nas condições em que foram realizados os estudos, é um impedimento para o sucesso de sua utilização em hidrólises.

6. Bibliografia

ABBOTT, A.P.; BOOTHBY, D.; CAPPER, G.; DAVIES, D.L.; RASHEED, R.K.
- *Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids* - Journal of the American Chemical Society
2004 126 (29), 9142-9147

ABREU, A.L. – *Modificação química de resíduo lignocelulósico para a preparação de compósito* – Dissertação de mestrado, Universidade federal de lavras, 2011

AMICO, S.C.; MOCHNACZ, S.; SYDENSTRICKER, T.H.D. – *Tratamento melhora propriedades de fibra de sisal para uso em compósitos.* – Ver. *Plástico Industrial.* – pp.72-80, 2004

ANDRADE Jr., T. E.; MARTINELLI, A. E.; MELO, D. M. A.; NASCIMENTO, R. M.; RAMBO, C.; SIEBER, H.; GREIL, P.; - *Infiltração de sal de alumínio em fibras de sisal para obtenção de fibras de alumina.* - Associação Brasileira de Cerâmica, 2005

AQUINO, DJALMA - *F. Sisal - Proposta de Preço Mínimo 2012/2013: Conab, 2012 – Estudos Internos*

ARAGÃO, W. M. - *Coco: Pós-Colheita. Série Frutas do Brasil -*. Brasília: Embrapa, 2002.

BARROS, C.C.; LACERDA, T.S.P.; LISBOA, V.S.; GOULART, S.A.; MULINARI, D.R. – *Propriedades mecânicas dos compósitos híbridos Vidro/Sisal – Cadernos UniFOA, ed.18, 2012*

BORDES F, CAMBON E, DOSSAT-LETISSE V, ANDRE I, CROUX C, NICAUD, J.M. - *Improvement of Yarrowia lipolytica lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site.-* Chembiochem 2009;10:1705–13.

BRADFORD, M. - *A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein Dye Binding -* Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.

BRIGIDA, A.I.S.; - *Estudo da imobilização de lipase tipo B de Candida antarctica utilizando fibra da casca de coco verde como suporte –* Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006

BRÍGIDA, A.I.S.; - *Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais. –* Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010

CASTRO, L.C.; LIMA, E.S.; AMARAL, A.C.F.; SILVA, J.R.A. – *Atividade inibitória sobre a α -glucosidade de saponinas isoladas da planta Ampelozizyphus amazonicus –* 49º Congresso brasileiro de química, Porto alegre/RS, 2009

CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M. - *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. -* Journal Biology Chemistry, v. 23, p. 501-505, 1947.

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T.; MORI, T.; - *Immobilized Enzymes - Research and Development. -* Chibata, I.; Wiley: New York, 1978, p.1.

COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.A.L. – *Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde* – B.CEPPA, Curitiba, v.19, n.1 p.33-42, 2001.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.S.; RIBEIRO, B.D. – *Tecnologia enzimática* – Editora EPUB, p.8, 2008.

CORRADINI, E.; ROSA, M.F.; MACEDO, B.P.; PALADIN, P.D.; MATTOSO, L.H.C. – *Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde* – Ver. Bras. Frutic. v.31, n.3, p.837-846, 2009

DIAS, M. L. - *Propriedades térmicas e mecânicas de materiais reciclados à base de pet e fibra de coco*. - Projeto de Pesquisa. Rio de Janeiro: UFRJ, 2002.

FERNANDES, K.F.; LIMA, C.S.; LOPES, F.M. – *Técnicas de imobilização de enzimas* – Revista processos químicos, 2010

GITLSEN, L.; BAUER, M.; ADLERCREUTZ, P. – *Adsorption of lipase on polypropylene powder*. – Biochimica et Biophysica Acta, v. 1345, p. 188-196, 1997.

GUISAN, J. M., - *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition, Methods in Molecular Biology* - vol. 1051, 2013.

HADEBALL, W. – *Production of lipase by Yarrowia lipolytica* – Acta Biotechnology, v.11, p. 159-167, 1991.

HAMILTON, G.E.; LUECHAU, F.; BURTON, S.C.; LYDDIATT, A. – *Development of a mixed mode adsorption process for the direct product sequestration of an extracellular protease from microbial batch cultures*. – Journal of Biotechnology, v.79, p.103-115, 2000.

HARRISON, D.G. - *Subprodutos del sisal como alimentos para los ruminantes*. -Rev. Mund. Zootec., v. 49, p.25-31, 1984.

JAEGER, K.E.;REETZ, M. – *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology*. – Tibtech, v.16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E; EGGERT, T. – *Lipases for biotechnology* – Current Opinion in Biotechnology, v.13, p. 390-397, 2002

KENNEDY, J.F.; WHITE, C.A.; MELO, E.H.M. – *The immobilization of enzymes and cells*. – *Chimicaoggi*, p. 21-29, 1988

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. – *Industrial enzyme applications*. – *Current Opinion Biotechnology*, v.13, p. 345-351, 2002.

LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. – *Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease*. – *JAACS*, v.79, p. 191-195, 2002

MARTINS, L.R. – *Imobilização do mediador redox riboflavina em fibra de celulose para degradação anaeróbia do azo corante amarelo ouro remazol RNL* - Dissertação de mestrado, Universidade federal de ouro preto, 2012.

MARTINS, M. A. - *Fibra de Sisal: Mercerização, Acetilação e Aplicação em Compósitos de Borracha de Pneu Triturado* - Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2001)

MATTOSO, L. H. C.; FERREIRA, F. C. & CURVELO, A. A. S. - *Lignocellulose-Plastic Composites* - Leão, A. L.; Carvalho, F. X.; Frollini, E. (ed.), USP & UNESP, São Paulo (1997)

MENEZES et al., - *Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações* - v(8), nº 8, p. 1761-1776, SET-DEZ, 2012.

MOCHNACZ, S. – *Preparação e caracterização de fibras de sisal (Agave sisalana) para utilização em compósitos poliméricos* – Dissertação de mestrado, Universidade federal do paraná, 2003

NASCIMENTO, R.F.; Rocha-Leão, M.H.M.; Coelho, MAZ; BRIGIDA, A.I.S.; FREITAS, S.P. - *Kinetic study of enzymatic biodiesel production from macauba acid oil using Candida antarctica B lipase immobilized in coconut fiber*. – 10^o International Chemical and Biological Engineering Conference, Minho, Portugal, 2008

NEIRA, D.S.M. – *Fibras de sisal (Agave sisalana) como isolante térmico de tubulações* – Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005

PELIZER, H. L.; PONTIERI H. M; MORAES O. I. *Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental*. Journal of Technology Management & Innovation. v. 2, 2007.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V. – *Produção de lipases por Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682*. – Rio de Janeiro, 180 p. Dissertação de Doutorado, Programa de Pós-graduação do Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

POZZANI, L.S.; COSTA, S.M.; PESSOA Jr., A. – *Imobilização de lisozima nas fibras têxteis à base de quitosana para aplicações na área médica* – USP, SP, 2011

REED, G. *Enzymes in food processing*. 2. Ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573p.

REGO FILHO, L. M. et al. - *A cultura do coco verde – perspectivas, tecnologias e viabilidade*.- Niterói: Pesagro, 1999.

RIBEIRO, B.D. – *Estratégias de processamento verde de saponinas da biodiversidade brasileira* – Tese de doutorado, Univerdade federal do rio de janeiro, 2012

ROCHA, E. C. & GHELER Jr., J. - *Aproveitamento de resíduos gerados na aglomeração de fibra de coco com látex natural* -. Matéria Técnica SENAI. Rio de Janeiro, 2000.

ROSA, M.F. – *Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior*. – Carbohydrate polymers, London, v.81, n.1, p. 83-92, 2010.

SANTOS, A.M. – *Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco* – Dissertação de mestrado, Universidade federal de alagoas, 2008

SANTOS, J. S., DORS, G., OLIVEIRA, D., & MONTE BLANCO, S. F. M. - *Glicerólise de óleo de peixe catalisada por lipase comercial de Rhizomucor miehei em meio com surfactante de grau alimentício*. - Quím. Nova, 2012.

SENHORAS, E.M.; - *Oportunidades da Cadeia Agroindustrial do Coco Verde - Do coco verde nada se perde, tudo se desfruta* – Revista acadêmica urutágua, 2004

SIMÕES, R. - *Coco tem aproveitamento integral* -. Agencia Brasil. Salvador, 18 de Outubro de 1996.

SOUZA, M.M. – *Imobilização térmica de poli(butil acrilato) em suportes de vidro cerâmico e sílica fundida para aplicação em micro-extração em fase sólida (SPME)* – TCC, Universidade federal de santa catarina, 2013.

SUDBRACK, T.S. - *Imobilização de lipase em montmorilonita e aplicação em reações oleoquímicas.* - 2012.

TAMANINI, C.; HAULY, M.C.O. – *Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol* – Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.25, n.4, p.315-330, 2004.

VEREDAS, V. – *Purificação da α -Lactalbumina a partir do soro de queijo em leite fixo e expandido de resinas.* – Campinas, 91 p. Dissertação de mestrado em engenharia química, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

WELTON, T.; - *Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis.* - Chem Rev 99: 2071–2084, 1999

WUST, E. – *Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos* – Dissertação de mestrado, Universidade regional de Blumenau, 2004.