



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

José Carlos Quilles Junior

Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e a aplicação em biocatálise.

São José do Rio Preto, 27 de junho de 2014.

José Carlos Quilles Junior

Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e sua aplicação em biocatálise.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Boscolo

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto, 27 de junho de 2014.

SUBSTITUIR ESSA PAGINA PELO ARQUIVO EM ANEXO

Quilles Junior, José Carlos

Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e sua aplicação em biocatálise. / José Carlos Quilles Junior. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2014.

103 f. ; 43 il. ; 30 cm.

Orientador: Maurício Boscolo

Co-orientador: Roberto da Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Lipases. 2. Imobilização. 3. Biodiesel. 4. Ácidos Graxos. 5. Quitosana
I. Boscolo, Maurício. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Imobilização reversível e irreversível de lipases para produção de derivados ativos e estáveis e sua aplicação em biocatálise.

CDU -

José Carlos Quilles Junior

Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e sua aplicação em biocatálise.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Maurício Boscolo

UNESP – São José do Rio Preto/SP

Orientador

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

UNIFAL – Alfenas/MG

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

UNESP – São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto, 27 de junho de 2014.

*Dedico essa conquista aos meus pais, que apesar
das suas dificuldades e simplicidade, sempre me
apoiaram a estudar.*

Obrigado por tudo, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por todas as oportunidades que me concedeu durante esses 28 meses de mestrado, pois às vezes acho que eu não merecia tanto.

Aos meus pais e meu irmão, que são a razão da minha vida e sempre estiveram comigo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo, meu orientador, por ter me recebido em seu laboratório e depositado confiança em meu trabalho, dando-me oportunidade de começar minha carreira acadêmica, sempre com incentivo e grande aprendizado.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pela co-orientação e aprendizagem.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima, por toda a ajuda e apoio durante a ausência física do meu orientador.

Ao Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, da UNIFAL, por todas as dicas e auxílios via e-mail.

Ao Prof. Dr. José Manuel Guisán, por me receber grandiosamente bem em seu laboratório durante seis meses e por toda a experiência adquirida.

Ao Dr. Caio Aragon, por todo aprendizado durante minha estadia no exterior, por me ensinar a ter olhar crítico e científico e pela nossa amizade.

À Dra. Ana Lucia Ferrarezi, minha mãe na pesquisa, por me ensinar tudo que sei hoje sobre enzimologia e imobilização, pela paciência com a qual me recebeu, sem eu saber de nada sobre o assunto, além da amizade construída.

Às minhas irmãs de pesquisa, doutorandas Janaina Pires e Rafaela Rodrigues, por todos os momentos de alegria, estresse, tristeza, emoção, tensão e viagens que passamos juntos. Tudo isso está bem guardado em minha memória.

Aos meus amigos de pós-graduação e do grupo “LBMA só a nata” no whatsapp: George Fetti, Maria Eduarda Fernandes, Izabel Zapparoli, Gisele Martins, Fernando Barbosa, Josiane Pereira, Isabela Delmaschio, Pedro Lucas e Diego. Foi muito bom passar ótimos momentos e risadas com vocês.

Aos alunos de iniciação científica Gabriel Pavani e Jéssica Baraldi e em especial aos meus queridos alunos Felipe Tomaselo e Jéssica Fernanda que tanto me ajudaram: vocês simplesmente me salvaram em vários momentos e foram essenciais para a execução do meu trabalho.

A todos os alunos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA) e do Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica (LSQA).

Aos amigos brasileiros conhecidos em Madrid: César Terrasan, Caio Aragon, Gysele, Cleiton Souza, Douglas Masui, Lígia Pietro, Ana Vici, Tanize Lima, Ana Michele e Gi Ortiz pelas aventuras pela Europa.

A todos meus amigos do vôlei de Votuporanga, em especial: Alessandra, Márcio, Cecília, Latoia, Brenner, Evelin, Aline e Vinícius, que nos finais de semana passávamos a tarde nos divertindo, seja na areia ou na quadra, onde eu descontava o stress da pós-graduação na bola.

Aos meus melhores amigos de hoje e sempre: Vinícius Martins, Lilian Osório e Aline Furlan. Espero que nossa amizade dure mais uma vida, porque nessa vida ela será até o fim.

À técnica do laboratório e responsável pelo GC-MS, Daniela, por toda ajuda.

Aos Departamentos de Engenharia e Ciências de Alimentos e de Física Biológica do IBILCE/UNESP.

À FAPESP e CNPq pelo incentivo à pesquisa.

“A tarefa é, não tanto para ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém ainda pensou, sobre o que todo mundo vê.”

(Erwin Schrödinger)

RESUMO

Na biocatálise faz-se necessária a imobilização destas enzimas em suportes inertes ao meio reacional, a fim de reutilizar, estabilizar, purificar e muitas vezes melhorar a atividade enzimática, levando à uma hiperativação. O presente trabalho teve como objetivo principal utilizar técnicas de imobilização de enzimas sob diferentes suportes (iônicos, hidrofóbicos e covalentes) e aplicá-los na imobilização de distintas lipases para avaliar o efeito da imobilização na atividade, seletividade, estabilidade e purificação dessas proteínas. O Capítulo 1 do trabalho relata algumas técnicas de imobilização e pré-purificação das lipases brutas obtidas a partir do fungo *Acremonium* sp, no qual as enzimas pré-purificadas por ultrafiltração apresentaram maior atividade e rendimento de imobilização sob os suportes hidrofóbicos octil- e fenil-agarose. Essas enzimas imobilizadas foram hiperativadas na presença de $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl e concentrações maiores desse sal causaram a diminuição da atividade enzimática. A atividade hidrolítica das lipases imobilizadas foi avaliada utilizando diferentes fontes de óleos vegetais, com maior atividade para enzima imobilizada do que a enzima solúvel em 40% dos óleos testados. No Capítulo 2 é apresentada a modificação química e caracterização da quitosana ativada com glicidol, epícloridrina e glutaraldeído para posterior aplicação como suporte para imobilização de lipases por ligação covalente, porém tal procedimento não foi possível devido à baixa área superficial do polímero (cerca de $4\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$) tanto para reagir com os agentes modificantes quanto para o carregamento proteico. A utilização da radiação do ultrassom na biotransesterificação do óleo de soja catalisada por lipases imobilizadas (TLL e L435) por interação hidrofóbica foi estudada no Capítulo 3, bem como o rendimento de produção total de ésteres dos óleos de soja, milho e girassol. Os óleos de soja e milho apresentaram maior rendimento de transesterificação e a produção de ésteres teve o máximo de rendimento de 4 vezes maior na presença de irradiação do ultrassom. O último capítulo do trabalho apresenta os resultados obtidos no Instituto de Catálises e Petroquímica de Madrid durante o estágio de pesquisa no exterior, que teve como foco o aprimoramento de métodos de imobilização de lipases e sua aplicação na hidrólise enantiosseletiva e na produção de ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3), sendo a lipase de *Candida antarctica* B estudada, apresentando excesso enantiomérico (*ee*) < 99,9 seletividade para o enantiômero *R* e produção de EPA e DHA de $0,69 \text{ nM}\cdot\text{min}^{-1}$.

Palavras chave: Lipases, enzimas imobilizadas, biodiesel, ácidos graxos, quitosana.

ABSTRACT

In the biocatalysis is necessary their immobilization on inert supports for further reuse, stabilization, purification and hyperactivation of the biocatalyst. This study aimed to immobilization of different lipases using different supports (ionic, hydrophobic and covalent) and to evaluate the activity, selectivity, stability and purification of these immobilized proteins. The chapter 1 of the work describes some techniques of immobilization and pre-purification of crude lipases from *Acremonium* sp by ultrafiltration showed higher activity and yield of immobilization on octyl- and phenyl-agarose. The activity of these immobilized enzymes was hyperactivated by incubation at $0.01 \text{ m}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl and higher concentrations of this salt was observed a decrease on the enzyme activity. The hydrolytic activity of the immobilized lipase was influenced by the vegetable oil source. In Chapter 2 we present the chemical modification and characterization of chitosan previously activated with glycidol, epichlorohydrin and glutaraldehyde for subsequent use as support for immobilization of lipases, but the low surface area of chitosan determined by BET ($4 \text{ cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$) negatively affected the immobilization process. The use of ultrasound radiation in biotransesterification of soybean oil catalyzed by immobilized lipases (TLL and L435) by hydrophobic interaction was studied in Chapter 3, and the yield of total production of esters by soybean, corn and sunflower oils. The soybean and corn oils showed highest transesterification and an increased ester production of 400 % obtained was when sonicated. The last chapter of this search presents the results obtained in the Instituto de Catálisis y Petroleoquímica de Madrid during the research stage, which focused on the improvement of the methods of immobilization of lipases and applications in the enantioselective hydrolysis and production of omega-3 from fish oil, with lipase B from *Candida antarctica* showing $ee < 99,9$ for the *R* enantiomer and $0.69 \text{ nM}\cdot\text{min}^{-1}$ in EPA and DHA production.

Key words: Lipases, immobilized enzymes, biodiesel, fatty acids, chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais ácidos graxos presentes nos óleos vegetais.	21
Figura 2 – Mecanismo de transesterificação alcalina homogênea de triglicerídeos.....	23
Figura 3 – Mecanismo da catálise ácida para a reação de transesterificação de monoglicerídeo.....	24
Figura 4 – Hidrólise de triglicerídeo catalisada por lipase.....	25
Figura 5 – Reações catalisadas por lipases.....	26
Figura 6 – Sítio ativo da lipase de <i>Candida antarctica</i> A, representando o resíduo de serina (S184), histidina (H366) e aspartato (D334) ilustrando a tríade catalítica ligada ao substrato sintético palmitato de <i>p</i> -nitrofenila.....	27
Figura 7 – Mecanismo de reação de transesterificação catalisada por lipases Cal A.	28
Figura 8 – Métodos de imobilização de enzimas.....	30
Figura 9 – Mecanismo geral de imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos.....	31
Figura 10 – Imobilização de lipases em suportes epóxidos por ligação covalente em diferentes condições.	33
Figura 11 – Estrutura da celulose, quitina e quitosana.	35
Figura 12 – Derivados da modificação química da quitosana.....	37
Figura 13 – Eletroforese SDS-PAGE da precipitação com diferentes razões de volume de extrato:etanol.....	46
Figura 14 – Atividade hidrolítica de <i>p</i> -NPB das lipases de <i>Acremonium</i> SP precipitadas em função da razão de enzima:etanol.	46
Figura 15 – Determinação do pH ótimo (a) e da temperatura ótima (b) da lipase de <i>Acremonium</i> sp no extrato bruto baseado na atividade hidrolítica do substrato <i>p</i> -NPB. Os resultados representam os valores médios dos dados replicados com desvio padrão menor que 5%.....	47
Figura 16 – Cinética de imobilização da lipase de <i>Acremonium</i> sp concentrada e precipitada sobre octil-agarose. Os resultados representam os valores médios dos dados replicados com desvio padrão menor que 5%.	48
Figura 17 – Cinética de imobilização da lipase de <i>Acremonium</i> sp concentrada em fenil-agarose e octil-agarose. Os resultados representam os valores médios dos dados replicados com desvio padrão menor que 10%.	49
Figura 18 – Efeito do NaCl na atividade das lipases de <i>Acremonium</i> SP imobilizadas em DEAE-agarose na hidrólise do substrato sintético <i>p</i> -NPB.....	50

Figura 19 – Rendimento de imobilização baseado na atividade lipolítica (branco) e proteína adsorvida (cinza) das lipases de <i>Acremonium</i> sp em octil- (O) e fenil-agarose (P) em diferentes condições de NaCl após 30 minutos de incubação.....	51
Figura 20 – Atividade relativa dos derivados das lipases de <i>Acremonium</i> sp imobilizadas em octil-agarose (O) e fenil-agarose (P) em diferentes concentrações de NaCl.	52
Figura 21 – Dessorção das lipases de <i>Acremonium</i> sp imobilizadas em fenil- e octil-agarose na ausência de NaCl.....	53
Figura 22 – Inativação térmica das lipases de <i>Acremonium</i> sp imobilizadas em octil- (a) e fenil-agarose (b) na presença e ausência de NaCl incubadas a 55 °C por 6 horas.....	54
Figura 23 – Inibição covalente das lipases de <i>Acremonium</i> sp imobilizadas em octil- e fenil-agarose na presença de 1µM de inibidor.	55
Figura 24 – Atividade hidrolítica das lipases solúveis e imobilizadas em octil-agarose e fenil-agarose sob diferentes óleos. A linha tracejada em vermelho representa a atividade da enzima solúvel, considerada como 100%. Os resultados representam os valores médios dos dados replicados com desvio padrão menor que 10%.	57
Figura 25 – Diferentes estratégias de modificação química da quitosana para posterior utilização como suporte na imobilização de lipases.	60
Figura 26 – Espectros de FTIR da quitosana bruta (a) e quimicamente modificada com epícloridrina (b), glicidol (c) e glutaraldeído (d).....	65
Figura 27 – Curvas da perda de massa em função da temperatura (TGA), derivada da perda de massa (DTG) e variação de energia em relação à temperatura (DSC) da quitosana bruta realizado em atmosfera de N ₂	66
Figura 28 – Termograma da quitosana bruta e suas modificações realizado em atmosfera de N ₂ , de 50 a 750 °C a 15 °C·min ⁻¹	67
Figura 29 – DTG das amostras de quitosana bruta (a), quitosana modificada com epícloridrina (b), quitosana modificada com glicidol (c) e quitosana modificada com glutaraldeído (d).	68
Figura 30 – DSC das amostras de quitosana bruta e quimicamente modificadas analisadas em atmosfera dinâmica de N ₂ de 50 – 450 °C e 15 °C·min ⁻¹	69
Figura 31 – Classificação das isotermas de adsorção com adsorbato gasoso.	70

Figura 32 – Isoterma de adsorção da quitosana bruta e quimicamente modificada.	71
Figura 33 – Mecanismo geral de imobilização covalente unipontual de lipases a partir do grupamento amino terminal presente na estrutura da enzima e o grupo amino adicionado à estrutura do suporte quimicamente modificado. Legenda: S: suporte; E: enzima.	72
Figura 34 – Cinética de produção de ésteres etílicos a partir da biotransesterificação dos óleos de girassol (preto), milho (vermelho) e soja (azul) catalisada por lipases imobilizadas: a) TLL, 3 b) Lipozym 435.	80
Figura 35 – Cromatograma gasoso da quantificação dos ésteres produzidos por biotransesterificação catalisada por TLL imobilizada em C18 após 24 horas de reação.	81
Figura 36 – Ciclos de reutilização das enzimas na produção de ésteres etílicos a partir do óleo de soja. A reação foi realizada por 24 horas à 45°C na presença de n-hexano como solvente.	83
Figura 37 – Cinética de imobilização da CaLB em suportes iônicos (a), hidrofóbicos (b) e covalentes (c).	90
Figura 38 – Atividade hidrolítica do substrato sintético <i>p</i> -PNB da CaLB imobilizada em diferentes suportes.	91
Figura 39 – Estabilidade da CaLB 50% em de etanol imobilizada em diferentes suportes.	92
Figura 40 – Estabilidade térmica da CaLB a 55 °C imobilizada em diferentes suportes.	93
Figura 41 – Efeito de solventes orgânicos na atividade da CaLB livre e imobilizada por adsorção e ligação covalente.	94
Figura 42 – Efeito de surfactantes na atividade da CaLB solúvel e imobilizada por adsorção e ligação covalente.	94
Figura 43 – Inativação térmica a 55°C dos derivados de CaLB imobilizada em octil-agarose na presença e ausência de surfactante.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações de diferentes lipases imobilizadas.	38
Tabela 2 – Atividade total e rendimento de purificação do extrato enzimático de <i>Acremonium</i> sp bruto, concentrado e precipitado com etanol em diferentes proporções.....	45
Tabela 3 – Composição média de ácidos graxos de óleos vegetais (KNOTHE, et al., 2006).....	56
Tabela 4 – Valores de área superficial total e da quantidade de gás adsorvida a partir da técnica BET da quitosana bruta e quimicamente modificada.	69
Tabela 5 – Rendimento de imobilização de lipases em C18 e carga dos derivados após 2 horas de incubação enzima-suporte.....	79
Tabela 7 – Rendimento de produção total dos ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de soja catalisada por lipases à 45°C após 24 horas de reação sem e com 10% irradiação de ultrassom.	83
Tabela 8 – Produção (%) dos ésteres etílicos a partir da transesterificação química e enzimática do óleo de soja na presença e ausência de ultrassom (US).	85
Tabela 9 – Hidrólise do óleo de peixe em pH 7 e 25 °C por 24 horas na presença e ausência do surfactante catalisada por CaLB imobilizada em octil-agarose. .	97
Tabela 10 – Hidrólise enantiosseletiva do (R,S)-ácido mandélico catalisada por CaLB imobilizada em octil-agarose.	97

LISTA DE EQUAÇÕES

- Equação 1 – Cálculo da atividade enzimática, no qual Abs = absorvância obtida a 410nm; Vt = volume total da reação; E = coeficiente de extinção molar; Ve = volume de enzima utilizada; T = tempo total da reação..... 42
- Equação 2 – Cálculo do rendimento de imobilização (%), no qual Ai: atividade total oferecida inicialmente; Af: atividade total do sobrenadante final após a imobilização..... 43
- Equação 3 – Cálculo da atividade hidrolítica a partir da hidrólise de triglicerídeo, no qual V(a): volume de base utilizado para titulação da amostra; V(c): volume de base utilizado para titulação do controle; M(b): molaridade da base utilizada; m: massa da amostra. 44
- Equação 4 – Equações utilizadas para o cálculo do rendimento dos ésteres produzidos a partir da reação de transesterificação: (a): determinação da massa teórica esperada (Me); Eq. (b): determinação da massa inicial de triglicerídeos (Mo); Eq. (c): determinação do rendimento da síntese (R); MMe: massa molar do éster; MMA: massa molar do ácido graxo; Ca: concentração de ácido graxo; Mi: massa inicial de óleo utilizado..... 78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Aspectos e produção de biodiesel.....	21
2.2. Produção de ácidos graxos e sua aplicação na indústria.	24
2.3. Lipases.....	25
2.4. Imobilização de enzimas.	29
2.5. Métodos de imobilização de enzimas.....	29
2.5.1. Retenção física.....	30
2.5.2. Ligação química.	30
2.5.2.1. Imobilização por adsorção.	31
2.5.2.2. Imobilização por ligação covalente.	32
2.6. Suportes para Imobilização.....	34
2.6.1. Quitosana.	34
2.6.2. Resinas hidrofóbicas.....	37
2.7. Aplicação de lipases imobilizadas.....	38
3. CAPÍTULO 1: Produção, pré-prurificação e imobilização de lipases de Acremonium sp e aplicação na hidrólise de ácidos graxos.	39
3.1. INTRODUÇÃO	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3.3. MATERIAIS DE MÉTODOS	40
3.3.1. Micro-organismo.....	40
3.3.2. Cultivo do fungo.....	41
3.3.2.1. Meios de cultura.....	41
3.3.2.2. Fermentação em estado sólido (FES).	41
3.3.3. Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de substrato cromogênico.	41
3.3.4. Proteína total.....	42
3.3.5. Pré-purificação do extrato enzimático.....	42
3.3.5.1. Concentração.....	42
3.3.5.2. Precipitação com etanol.....	42
3.3.5.3. Eletroforese.....	43
3.3.4. Caracterização bioquímica	43
3.3.4.1. Determinação do pH e temperatura ótima.....	43

3.3.5. Imobilização reversível e estabilidade dos derivados.....	43
3.3.5.1. Imobilização das lipases por interação hidrofóbica.....	43
3.3.5.2. Cálculo do rendimento de imobilização (%).....	43
3.3.5.3. Dessorção das enzimas imobilizadas.....	44
3.3.5.4. Inativação térmica e covalente dos derivados.....	44
3.3.6. Reação em meio aquoso – Hidrólise de óleos vegetais.....	44
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.4.1. Preparação do extrato enzimático	45
3.4.2. Caracterização bioquímica	47
3.4.3. Imobilização por adsorção hidrofóbica	47
3.4.4. Influência da força iônica na imobilização hidrofóbica	49
3.4.5. Estudo da força de interação enzima-suporte	52
3.4.6. Inativação térmica	53
3.4.7. Inativação covalente	55
3.4.8. Reações em meio aquoso.....	56
3.5. CONCLUSÕES	58
4. CAPÍTULO II: Modificação química e caracterização da quitosana para aplicação como suporte para imobilização de lipases	59
4.1. INTRODUÇÃO	60
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
4.3. PROCEDIMENTOS	61
4.3.1. Modificação química da quitosana para imobilização irreversível	61
4.3.1.1. Precipitação das esferas de quitosana	61
4.3.1.2. Modificação química da quitosana com glicidol e epícloridrina.	61
4.3.1.3. Modificação química da quitosana com glutaraldeído.....	61
4.3.1.4. Preparação de glioxil-suportes.....	62
4.3.2. Caracterização da quitosana quimicamente modificada.....	62
4.3.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR).....	62
4.3.2.2. Análise Termogravimétrica (TGA).....	62
4.3.2.3. Termogravimetria Derivada (DTG).....	63
4.3.2.4. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	63
4.3.2.5. Área superficial total (BET)	63
4.3.3. Imobilização irreversível	63
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64

4.4.1. Identificação dos grupos substituintes modificados por FTIR-ATR.....	64
4.4.2. Caracterização térmica da quitosana quimicamente modificada por TGA e DSC.....	65
Figura 30: DSC das amostras de quitosana bruta e quimicamente modificadas analisadas em atmosfera dinâmica de N ₂ de 50 – 450 °C e 15°C·min ⁻¹	69
4.4.3. Análise da área superficial total por BET.....	69
4.4.4. Imobilização de lipases em quitosana quimicamente modificada.....	71
4.5. CONCLUSÃO	73
5. CAPÍTULO III: Avaliação da irradiação de ultrassom na atividade transesterificante de lipases imobilizadas e comparação com os produtos obtidos pela catálise química	74
5.1. INTRODUÇÃO	75
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75
5.3. PROCEDIMENTOS	76
5.3.1. Imobilização por adsorção hidrofóbica.	76
5.3.2. Produção de ésteres etílicos (biodiesel).....	76
5.3.2.1. Reação de transesterificação via catálise enzimática.	76
5.3.2.2. Recuperação e reutilização do biocatalisador.	76
5.3.3. Reação de transesterificação via catálise química.....	76
5.3.4. Análise dos produtos obtidos	77
5.3.4.1. Cromatografia de camada delgada (TLC)	77
5.3.4.2. Quantificação dos ésteres formados cromatografia gasosa (GC-FID).....	77
5.3.4.3. Identificação dos produtos por espectrometria de massas (GC-MS)	78
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.4.1. Imobilização hidrofóbica de lipases	78
5.4.2. Transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel etílico.....	79
5.4.3. Reutilização do biocatalisador.	81
5.4.4. Avaliação do ultrassom na biotransesterificação.....	83
5.4.5. Comparação dos ésteres etílicos obtidos pela transesterificação do óleo de soja: rota química x rota enzimática.	84
5.5. CONCLUSÃO.	85
6. CAPÍTULO IV: Diferentes estratégias de imobilização e estabilização de lipases de Candida antarctica B e aplicação em reações enantiosseletivas e na produção de ômega-3	86

6.1. INTRODUÇÃO	87
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	87
6.3. PROCEDIMENTOS	87
6.3.1. <i>Quantificação da atividade enzimática por hidrólise de substrato cromogênico.</i>	87
6.3.2. <i>Proteína total.</i>	87
6.3.3. <i>Diferentes estratégias de imobilização.</i>	88
6.3.4. <i>Estabilidade dos derivados.</i>	88
6.3.5. <i>Efeito de solventes e surfactantes na atividade enzimática.</i>	88
6.3.6. <i>Inativação covalente e térmica dos derivados.</i>	88
6.3.7. <i>Hidrólise do óleo de peixe para a produção de ômega-3</i>	89
6.3.8. <i>Reação enantiosseletiva</i>	89
6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
6.4.1. <i>Imobilização da CaLB em diferentes suportes.</i>	89
6.4.2. <i>Atividade recuperada dos derivados</i>	91
6.4.3. <i>Termoestabilidade e estabilidade em etanol dos derivados</i>	91
6.4.4. <i>Efeito de solventes e surfactantes na atividade das enzimas imobilizadas</i> ...	93
6.4.5. <i>Inibição térmica e covalente.</i>	95
6.4.6. <i>Avaliação do efeito de surfactante na seletividade da CaLB na hidrólise de óleo de peixe</i>	96
6.4.5. <i>Hidrólise enantiosseletiva</i>	97
6.5. CONCLUSÃO	98
7. CONCLUSÃO GERAL	99
8. REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, uma das áreas de pesquisa com maior foco é a área biotecnológica, utilizando enzimas ou células como biocatalisadores substituintes aos catalisadores químicos convencionais. Muitas são as vantagens de um biocatalisador, porém o seu alto custo e a dificuldade de reutilização, quando não imobilizados, o torna inviável em muitos processos. Com base nessas dificuldades, a imobilização de enzimas ou células consiste na retenção do biocatalisador no interior ou na superfície de materiais inertes ao meio reacional, sendo possível a sua reutilização, desde que sua atividade catalítica seja monitorada.

Outra área que tem crescido e recebido muita atenção da comunidade científica é a produção de biocombustíveis, que são denominados os compostos obtidos a partir de fontes renováveis de energia, com características semelhantes aos combustíveis fósseis e com capacidade para substituí-los em motores movidos à ignição. O biodiesel é um substituto proposto ao diesel fóssil, obtido principalmente a partir da transesterificação alcalina de triacilgliceróis. Porém, tal processo apresenta algumas desvantagens, como o elevado consumo energético, não seletividade e baixa qualidade do subproduto glicerol.

As lipases são enzimas da classe serino esterases que catalisam a hidrólise e síntese de ésteres e estão em crescente aplicação como biocatalisadores na reação de transesterificação do biodiesel. A principal vantagem da utilização de lipases para tal processo é a alta seletividade da enzima e melhor qualidade do glicerol, além de poder ser reutilizada, quando imobilizada. Outra aplicação industrial das lipases é na hidrólise de óleos e gorduras para a produção de ácidos graxos livres de interesse comercial para aplicação em indústrias de surfactantes, cosméticos e fármacos.

O presente trabalho teve como objetivo principal de geral avaliar diferentes métodos de imobilização de lipases de diferentes origens para aplicações em reações de hidrólise e transesterificação. Devido aos diversos caminhos que tivemos a escolher durante a pesquisa, o trabalho se divide em quatro capítulos, com objetivos particulares, no qual cada um tem como foco lipases, suportes, método de imobilização e aplicações distintas.

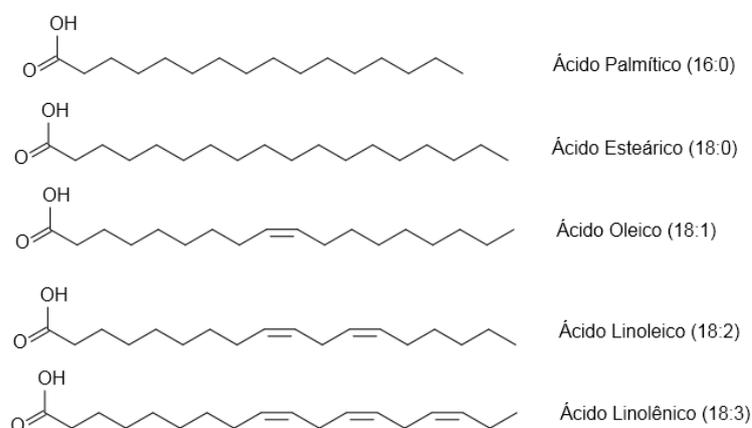
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos e produção de biodiesel

Os combustíveis fósseis têm sido o grande potencial da economia mundial, mas apresentam algumas desvantagens, sendo a principal o impacto ambiental, contribuindo para o aumento dos gases causadores do efeito estufa e compostos sulfurados que provocam a chuva ácida. O crescimento da demanda da energia industrial e os problemas ambientais causados pelo aumento exagerado do uso dos combustíveis fósseis tem aumentado cada vez mais a busca por novas fontes de energias (BANERJEE; CHAKRABORTY, 2009).

O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres mono alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa comumente derivados de fontes renováveis. Seu principal interesse é a possível substituição do combustível fóssil em motores por ignição por compressão (COSTA et al., 2000). Derivado de fontes naturais, como óleos vegetais e gorduras animais, o biodiesel tem como principais origens os óleos de soja, girassol, canola, palma, jatobá e de semente de algodão. Os ácidos graxos naturais, na sua grande maioria, não apresentam ramificações em sua estrutura e são compostos por um número par de átomos de carbono, devido à rota biossintética (RAMALHO; SUAREZ, 2013). A Figura 1 apresenta a estrutura dos principais ácidos graxos constituintes nos óleos vegetais.

Figura 1 – Principais ácidos graxos presentes nos óleos vegetais.



Fonte: elaborado pelo autor.

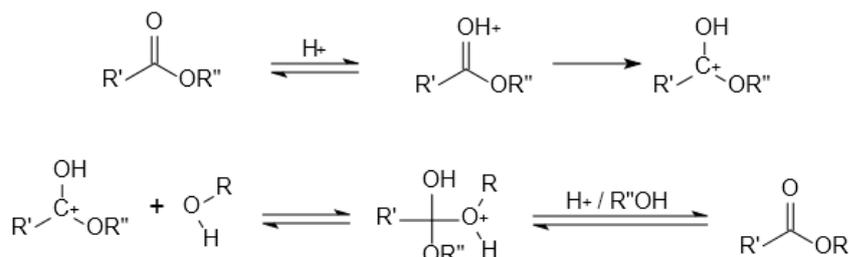
O método mais usual de transformação do óleo vegetal ou gordura animal em biodiesel é a transesterificação, que pode ser realizada usando diferentes sistemas catalíticos ou em condições supercríticas (MEHER et al., 2006). Na reação de transesterificação, um éster é transformado em outro pela troca do grupo alcoxila por meio da reação com um álcool. A estequiometria da reação é na proporção 1:3 de óleo:álcool, respectivamente (SCHUCHARDT et al., 1998). Para altas taxas de rendimento, o álcool é utilizado em excesso, devido à natureza reversível da reação (SINGH; SINGH, 2010).

Os alcoóis mais utilizados para a síntese de biodiesel são o metanol e o etanol, por serem mais baratos e mais fácil acesso (KADU; SARDA, 2011). Entretanto, a maior dificuldade da síntese do biodiesel utilizando etanol está no fato de que a presença de água no etanol hidratado favorece a via de saponificação durante a reação por catálise alcalina, o que leva à emulsificação do glicerol e a produção de sabão (ANTCZAK et al., 2009). O metanol é o álcool mais utilizado industrialmente por ser comercializado com alto teor de pureza e não ser higroscópico, entretanto é altamente tóxico e de origem petroquímica (SCHUCHARDT et al., 1998).

Atualmente, o método mais utilizado para a produção de biodiesel é a catálise alcalina, devido ao baixo custo do catalisador e o elevado rendimento de produção, cerca de 98% (ANTCZAK et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Esta rota sintética apresenta vários inconvenientes como o alto consumo energético, difícil recuperação do glicerol, perda do catalisador, além do alto consumo de água no processo de lavagem do biodiesel (CHEN et al., 2008). Os catalisadores químicos mais comuns são os hidróxidos de sódio e de potássio (VYAS et al., 2010). Além disso, a qualidade do glicerol obtido pela via alcalina não é boa, com aparência escura e de baixo valor comercial. A Figura 2 apresenta o mecanismo da transesterificação alcalina proposto em quatro etapas.

desprotonação e eliminação do álcool original, gerando o novo éster (PEREIRA et al., 2013).

Figura 3 – Mecanismo da catálise ácida para a reação de transesterificação de monoglicerídeo.



Fonte: (MEHER et al., 2006).

A catálise enzimática utilizando lipases como catalisadores também pode ser utilizada nas reações de transesterificação e apresenta algumas vantagens sobre a catálise química, tais como condições mais suaves de reação, o que implica em um menor consumo de energia; maior seletividade quanto aos substratos; quando a enzima é imobilizada, é facilmente separada do meio reacional e pode ser reutilizada; maior facilidade de separação e purificação do biodiesel e menor emissão de poluentes, tornando-a um processo ambientalmente favorável. Entre as principais desvantagens da catálise enzimática estão o alto custo das enzimas e tempo da reação, geralmente muito maior do que com catalisadores químicos (ZHANG et al., 2012).

2.2. Produção de ácidos graxos e sua aplicação na indústria

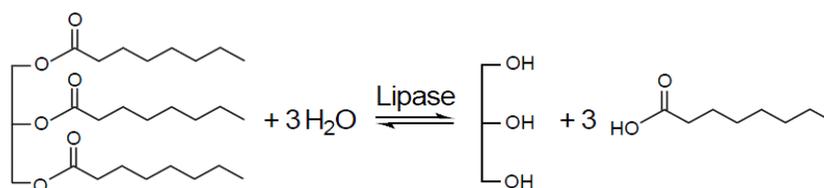
A produção de ácidos graxos a partir da hidrólise de óleos e gorduras é industrialmente relevante no processamento de gorduras animais e óleos vegetais. Dentre os processos que utilizam a matéria graxa em seu processamento, destacam-se a produção de adesivos, revestimentos, surfactantes e biocombustíveis. O processo tradicional de produção de ácidos graxos ocorre via catálise química em condições elevadas de temperatura e pressão (250 °C e 70 bar), no qual reações indesejáveis, como oxidação, desidratação ou interesterificação dos ácidos graxos podem ocorrer (AVELAR et al., 2013). A hidrólise enzimática é uma técnica de economia energética vantajosa sob a catálise convencional, além da alta especificidade das enzimas em

relação aos catalisadores químicos, superando os problemas das reações indesejáveis (GUPTA et al., 2011; GARCIA-GALAN et al., 2013).

2.3. Lipases

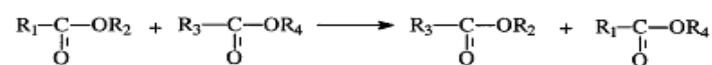
As enzimas são consideradas catalisadores naturais sendo que as principais usadas comercialmente são produzidas pela fermentação de materiais biodegradáveis (HASAN et al., 2006). As lipases (triacilglicerol lipases, EC 3.1.1.3) catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de ésteres formados a partir álcool e ácidos graxos de cadeia longa, atuando sobre ligações carbonílicas de éster de lipídeos e seus derivados (BORNSCHEUER, 2002), de acordo com a Figura 4.

Figura 4 – Hidrólise de triglicerídeo catalisada por lipase.



Fonte: (JAEGER; REETZ, 1998)

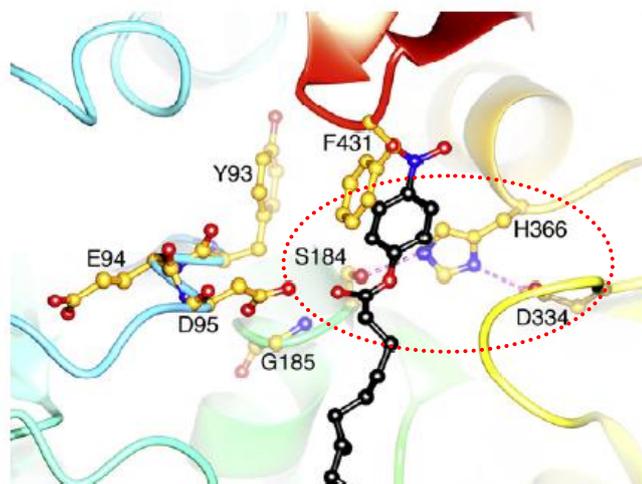
As lipases podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana, atuando como enzimas digestivas na grande parte deles (BANERJEE; CHAKRABORTY, 2009). As reações catalisadas por lipases geralmente apresentam regio – e enantiosseletividade, e apresentam amplo potencial biotecnológico, incluindo a estabilidade em solventes orgânicos, não requerem cofatores, especificidade quanto aos substratos e condições mais suaves de reação (JAEGER; REETZ, 1998). A Figura 5 apresenta as reações catalisadas por lipases. A reação de transesterificação pode ocorrer entre um éster e um ácido (acidólise), dois diferentes ésteres (interesterificação) ou entre um éster e um álcool (alcoólise) (VILLENEUVE et al., 2000).

Figura 5 – Reações catalisadas por lipases.**Hidrólise****Esterificação****Acidólise****Interesterificação****Alcoólise****Aminólise**

Fonte: (VILLENEUVE et al., 2000).

O sítio catalítico das lipases é formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos serina, histidina e aspartato. Para a ligação efetiva com o substrato, além da tríade catalítica responsável pela conversão de substratos, há uma estrutura móvel que cobre o sítio catalítico das lipases, chamado de tampa hidrofóbica ou “*lid*” (BORNSCHEUER, 2002). Esse “*lid*” está diretamente relacionado com a capacidade de modulação da enzima para se ligar ao substrato e com a seletividade das lipases (SECUNDO et al., 2006).

Figura 6 – Sítio ativo da lipase de *Candida antarctica* A, representando o resíduo de serina (S184), histidina (H366) e aspartato (D334) ilustrando a tríade catalítica ligada ao substrato sintético palmitato de *p*-nitrofenila.



Fonte: (ERICSSON et al., 2008).

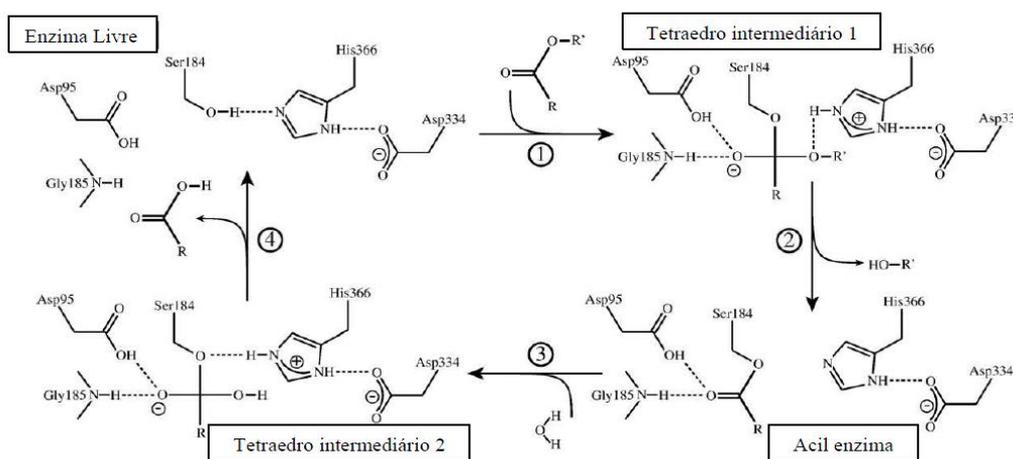
A atividade catalítica das lipases ocorre em uma interface polar-apolar. Devido a isso, o mecanismo de Michaelis-Menten não é aplicado para descrever a cinética das reações catalisadas por lipases, por ser utilizado somente quando se trata de uma reação catalisada por enzimas em meio homogêneo. Na ausência de meio apolar, o sítio catalítico da lipase não é exposto ao meio reacional pela sua tampa, o que confere a sua conformação fechada. Na presença de uma fase apolar, o sítio catalítico da enzima é exposto ao meio reacional através da abertura da tampa, apresentando a conformação aberta e a ativação da atividade catalítica da enzima (JAEGER; REETZ, 1998).

Em meios aquosos homogêneos as lipases apresentam um equilíbrio entre a conformação aberta e a conformação fechada de sua estrutura e a conformação inativa é favorecida (PALOMO et al., 2005). Em reações que ocorrem em meio orgânico, as lipases catalisam a transferências dos grupos acila entre compostos doadores e receptores desse grupo (CASTRO et al., 2004). A reação de transesterificação catalisada por lipases geralmente ocorre em branda temperatura, em torno de 20 – 60 °C, quando comparada com a transesterificação por catálise química. Após o processo da transesterificação enzimática, a fase inferior do sistema (glicerol) é facilmente separada da fase superior (ésteres) sem a necessidade de etapas de separação (SZCZĘSNA ANTCZAK et al., 2009). O mecanismo de atuação das lipases nas reações de síntese é

semelhante ao mecanismo das reações de hidrólise. A reação de transesterificação catalisadas por lipases ocorre em quatro etapas, como mostra a Figura 7.

Figura 7 – Mecanismo de reação de transesterificação catalisada pela lipase Cal

A.



Fonte: (ERICSSON et al., 2008).

Na primeira etapa da reação, o substrato entra no sítio catalítico da enzima sofrendo um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da ligação éster pelo oxigênio do resíduo de serina (Ser 184), que é desprotonada pelo par histidina/aspartato (His366/Asp334). Ocorre então a liberação do intermediário tetraédrico 1 de reação estabilizado pelos resíduos de histidina e aspartato, por ligações de hidrogênio pela glicina (Gly 185), e pela cadeia protonada de outro resíduo de aspartato (Asp 95). A liberação de uma molécula de álcool nesse processo ocorre por meio da doação de um próton da histidina para a região alcoólica do substrato, formando um complexo acil-enzima (etapa 2). A nucleoficidade da molécula de água ou álcool é aumentada pelo resíduo de histidina e essa molécula mais nucleofílica ataca o carbono da carbonila do resíduo ácido do substrato, formando um novo intermediário tetraédrico (etapa 3). Este por sua vez, libera ésteres a partir da doação de um próton da histidina para o oxigênio da serina, regenerando a estrutura terciária da enzima (etapa 4) (BORNSCHEUER, 2002; ERICSSON et al., 2008).

2.4. Imobilização de enzimas

A imobilização de biocatalisadores muitas vezes simula o que ocorre naturalmente quando as células se desenvolvem sobre determinada superfície ou retida no seu interior (GROBOILLOT et al., 1994).

As propriedades de uma enzima imobilizada dependem do tipo de imobilização empregado. A ligação entre os dois dão à enzima características químicas e propriedades cinéticas particulares (SHELDON, 2007). Portanto, para uma boa atividade na imobilização de enzimas, o suporte deve permitir o acesso do substrato à enzima, mantendo sua atividade catalítica, a recuperação do sistema no final do processo além da estabilidade da enzima durante uma determinada reação (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Do ponto de vista reacional, o uso de enzimas imobilizadas apresenta diversas vantagens sobre enzimas solúveis, tais como o reaproveitamento da atividade enzimática por um período de tempo maior, uma vez que a enzima não seja desnaturada durante a reação; operação de forma contínua, sendo possível um maior controle das variáveis do processo; maior facilidade no processo de separação da enzima, sendo o derivado insolúvel ao meio reacional; redução do volume da reação, pois a enzima imobilizada em suportes inertes ao meio apresenta menor volume do que enzimas solúveis. Além disso, as características bioquímicas das enzimas imobilizadas podem ser alteradas, de forma favorável, quando imobilizadas. A imobilização pode conferir a enzima uma maior estabilidade em relação ao pH e temperatura, reduzir a inibição pelo substrato quando atingido o equilíbrio da reação, devido vários fatores, como a imobilização em sua conformação aberta, a ausência de outras proteínas no meio reacional que podem interferir na atividade enzimática e a proteção da enzima quando imobilizada no interior de matrizes ou membranas (AGUIAR et al., 2010).

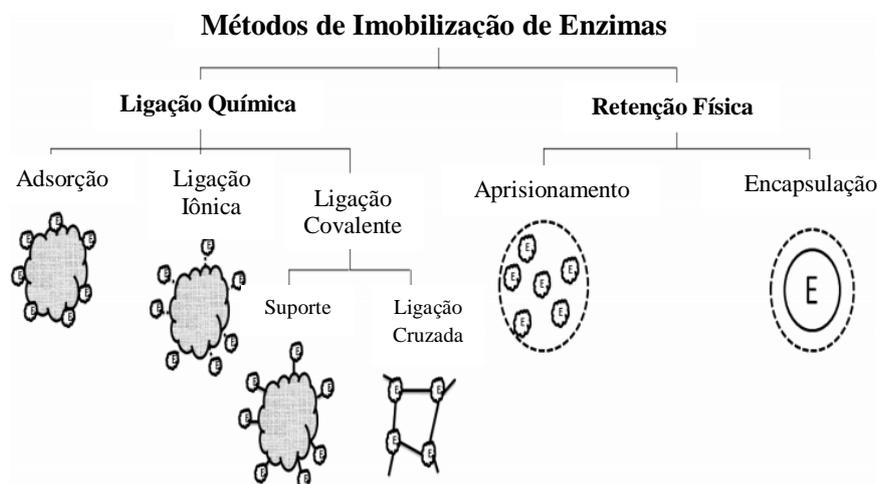
2.5. Métodos de imobilização de enzimas

Dentre os métodos existentes para imobilização de enzimas (Figura 8), eles podem ser classificados em métodos físicos, nos quais a enzima fica retida fisicamente no interior do suporte, sem nenhuma interação química, e métodos químicos, onde ocorre a ligação direta entre a enzima e o suporte por meio de ligações químicas.

Existem diversos métodos de imobilização de enzimas, mas não há um método ou um suporte universal utilizado para qualquer classe de enzimas e reações. Portanto, essas características só são determinadas a partir de testes empíricos, a fim de classificar

o suporte e método de imobilização mais viáveis em eficiência, custo e na simplicidade de execução (MENDES et al., 2011).

Figura 8 – Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: (JEGANNATHAN et al., 2008).

2.5.1. Retenção física

Também conhecido como aprisionamento ou encapsulação, o método de retenção física consiste na retenção do biocatalisador no interior de matrizes poliméricas ou microcápsulas semipermeáveis de modo que não haja nenhuma interação química entre o suporte e os grupos constituintes da enzima, o que garante a estrutura tridimensional e o sítio ativo sem alterações (SILVA et al., 2008). Assim, moléculas menores como substratos e produtos conseguem se difundir do seio da solução até o sítio ativo da enzima no interior da matriz, enquanto moléculas maiores, como as enzimas, ficam retidas no interior do suporte. As principais vantagens desse método é a grande área superficial disponível para o contato do substrato ao sítio ativo da enzima e a possibilidade de imobilizar diferentes espécies de enzimas ao mesmo tempo (MENDES et al., 2011).

2.5.2. Ligação química

O método de imobilização de enzimas por ligações químicas consiste na interação entre os grupos dos resíduos de aminoácidos constituintes da enzima e os grupos reativos presentes na superfície do suporte. Essas ligações podem ser do tipo adsorção

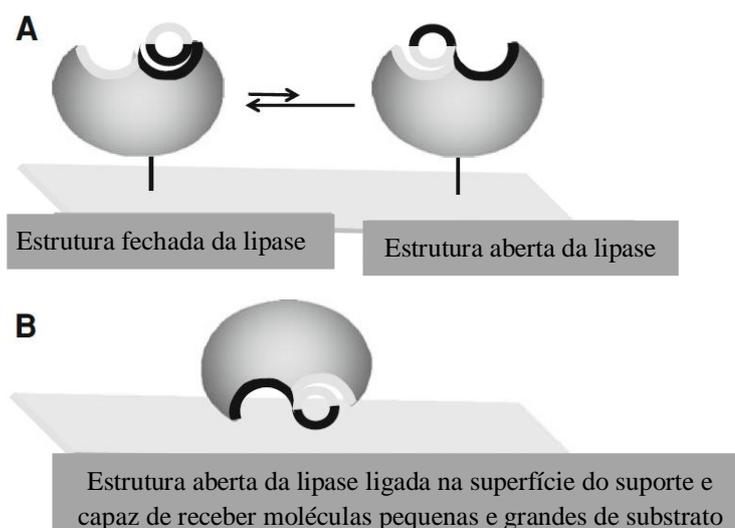
ou interações mais fracas ou por ligações covalentes. Diferente do método de retenção física, a imobilização por ligação química há uma ligação entre a enzima e o suporte, onde a mesma fica ligada a superfície do suporte e inerte ao meio.

2.5.2.1. Imobilização por adsorção

O método de imobilização por adsorção é o método mais simples e ocorre pelo simples contato entre a enzima e o suporte. Consiste em ligações fracas, como forças de Van der Waals, interações iônicas, adsorção física ou interações hidrofóbicas entre os grupos constituintes da enzima e a superfície do suporte (JEGANNATHAN et al., 2008). Apresenta como principais vantagens a facilidade de execução, eficiência e o baixo custo. Como desvantagem, está a dessorção da enzima devido à variações do meio reacional, como pH, temperatura e interação entre as ligações das moléculas adsorvidas e o suporte (MENDES et al., 2011).

A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos em baixa força iônica tem-se mostrado um método de simples execução e muito eficiente na purificação, imobilização e estabilização de lipases. Em condições adequadas, o método de adsorção de lipases em suportes hidrofóbicos é capaz de imobilizar lipases na sua conformação aberta. Nesse caso, a face interna do “*lid*” interage com o suporte, disponibilizando o sítio catalítico da enzima (PALOMO et al., 2005; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2007; PALLA et al., 2011).

Figura 9 – Mecanismo geral de imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos.



Fonte: (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2011).

No esquema A, a lipase foi imobilizada pelo lado oposto ao sítio catalítico, e ocorre um equilíbrio no meio reacional entre as conformações ativas e inativas da enzima. Já no esquema B, a lipase é imobilizada pelo lado hidrofóbico presente próximo ao sítio catalítico, o “*lid*”, permanecendo imobilizada na sua conformação aberta e ativa. Assim, suportes hidrofóbicos são específicos para enzimas que apresentam aminoácidos apolares em sua estrutura, como as lipases, que são imobilizadas pela sua parte hidrofóbica, o “*lid*”, mantendo sua conformação aberta com alta atividade catalítica. Quando são usados para purificação, após a imobilização em suportes hidrofóbicos, as enzimas são desorvidas por meio da ação de pequenas concentrações de detergentes, pois esses são capazes de estabilizar a conformação aberta das lipases em meio aquoso e também de cobrir a superfície do suporte, liberando as enzimas na forma livre (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2011).

BASTIDA et al., 1998 imobilizou a lipase de *Candida Antarctica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus niveus* e *Mucor javanicus* em octil-agarose por meio de adsorção hidrofóbica e obteve um alto grau de purificação das lipases além de uma maior estabilidade das lipases imobilizadas comparadas as lipases livres, devido ao suporte ser específico para proteínas com grande área apolar. FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2007 mostrou que a imobilização de lipases por adsorção em suportes hidrofóbicos é uma técnica importante para aumentar a especificidade das lipases por substratos hidrofóbicos.

Assim, a técnica de imobilização por adsorção é amplamente eficiente para imobilização, purificação e estabilização de lipases, sendo esses suportes muito específicos, uma vez que apresentam uma área altamente hidrofóbica.

2.5.2.2. Imobilização por ligação covalente

A imobilização de enzimas por ligações covalentes ocorre pela formação de ligações entre os resíduos de aminoácidos que constituem a enzima e que não são essenciais para sua atividade catalítica e os grupos reativos presentes na superfície do suporte (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

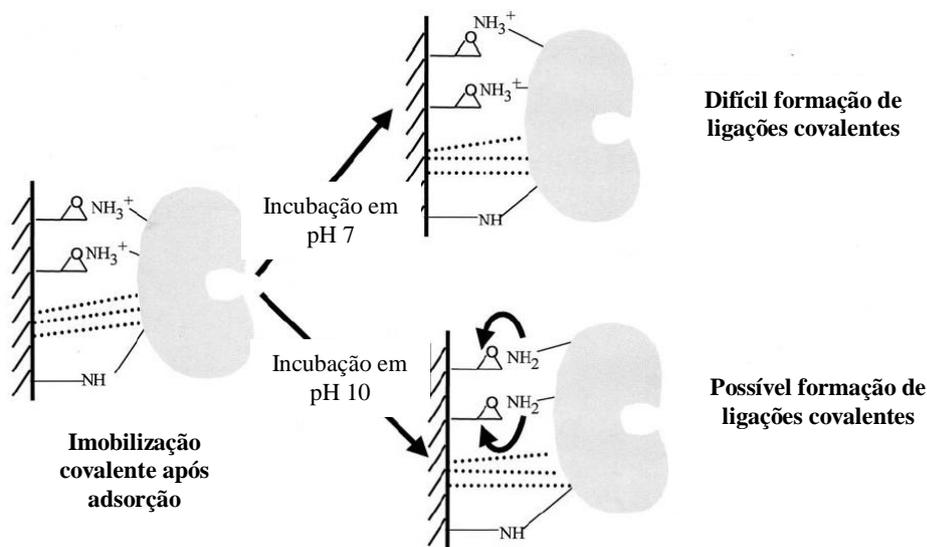
Esse processo apresenta como vantagens a maior estabilidade da enzima em relação aos efeitos do ambiente reacional, como variação de pH, temperatura, solventes e ação de inibidores, além de evitar a desorção da enzima do suporte. Mas, devido à interação mais forte entre a enzima e o suporte, esse método pode afetar a estrutura

tridimensional da enzima, modificando seu sítio ativo diminuindo efetivamente a sua atividade catalítica (ALFAYA; KUBOTA, 2002; MENDES et al., 2011).

Outro método de ligação de enzimas por ligações covalentes baseia-se na formação de ligações cruzadas entre os grupos amino presentes na enzima com os grupos amino presentes na superfície do suporte ou a formação de partículas insolúveis ao meio através de ligações cruzadas intermoleculares (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

A imobilização de enzimas por ligações covalentes pode necessitar de condições que favoreçam o processo de imobilização, dependendo da enzima, como variações de pH e força iônica a fim de melhor a reatividade dos resíduos de aminoácidos que constituem a enzima para se ligarem ao suporte (MATEO et al., 2000). A Figura 10 mostra um exemplo de imobilização de lipases por ligação covalente em diferentes condições de pH.

Figura 10 – Imobilização de lipases em suportes epóxidos por ligação covalente em diferentes condições.



Fonte: (MATEO et al., 2000).

A primeira etapa da imobilização covalente de lipases ocorre pela adsorção das enzimas na superfície do suporte, seguida pela formação de ligações covalentes entre os resíduos de lisina e os grupos reativos na superfície do suporte. Essa ligação ocorre dependendo do nível de reatividade do aminoácido Lisina em função do pH do meio. Essa reatividade pode ser muito baixa a pH neutro, devido os grupos de lisina possuírem

um pKa em torno de 10,5 e devido a isso, em pH neutro, esses grupos estão na forma de eletrófilos (protonados). Dessa forma, a ligação covalente pode ocorrer, porém levando um período de tempo maior e muitas vezes necessita-se o uso de temperaturas moderadamente elevadas, promovendo uma menor rigidez na molécula da enzima que favorece a reatividade para formação de ligações. Assim, variáveis como tempo, pH e temperatura são empregadas para aumentar a formação de ligações entre a enzima e o suporte no processo de imobilização por ligação covalente. Entretanto, em pH alcalino os resíduos de aminoácidos de lisina encontram-se na forma de nucleófilo e certamente há uma maior taxa de imobilização em menor tempo (MATEO et al., 2000).

2.6. Suportes para Imobilização

Para ser utilizado como suporte para imobilização de enzimas, o suporte deve ter apresentar alguns requisitos: alta afinidade por proteínas, grande disponibilidade de grupos reativos, alta capacidade de carregamento, estabilidade mecânica e rigidez, principalmente se o mesmo for muito denso para ser utilizado em um biorreator (PALLA et al., 2011).

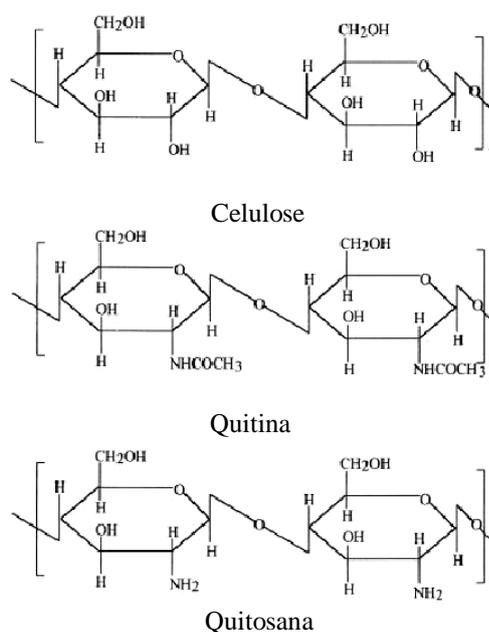
A imobilização de lipases em suportes sólidos pode evitar a inibição da enzima por fatores externos presentes no meio reacional, possibilitando a recuperação do biocatalizador e a utilização contínua. A fixação de lipases em uma matriz sólida pode aumentar seu tempo de vida e melhorar a estabilidade térmica da enzima, por conferir uma estrutura mais rígida à mesma. Porém, se o suporte sólido exerce interações desfavoráveis com a proteína, ou se a conformação da enzima é modificada durante a imobilização, a enzima pode sofrer efeitos negativos, como a redução da estabilidade e da atividade catalítica (FORESTI; FERREIRA, 2007).

2.6.1. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural presente em fungos, mas tem como principal fonte a desacetilação da quitina, que é encontrada no revestimento das cascas de crustáceos. É um polímero atóxico e biodegradável, formada por uma estrutura de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose (DUTTA et al., 2004; FERREIRA et al., 2009). O que diferencia os dois polímeros naturais, quitina e quitosana, é o nível de monômeros desacetilados na estrutura. O biopolímero é classificado como quitosana, quando apresenta nível de desacetilação superior a 50% (BARROS et al., 2006).

A quitosana apresenta uma estrutura química semelhante à estrutura da celulose e da quitina. Esses polímeros se diferenciam no grupo funcional presente em sua estrutura. A molécula de celulose apresenta hidroxilas, a quitina grupamentos acil e a quitosana possui grupos amina em sua estrutura (AZEVEDO et al., 2007). A Figura 11 apresenta as estruturas dos dois polímeros.

Figura 11 – Estrutura da celulose, quitina e quitosana.



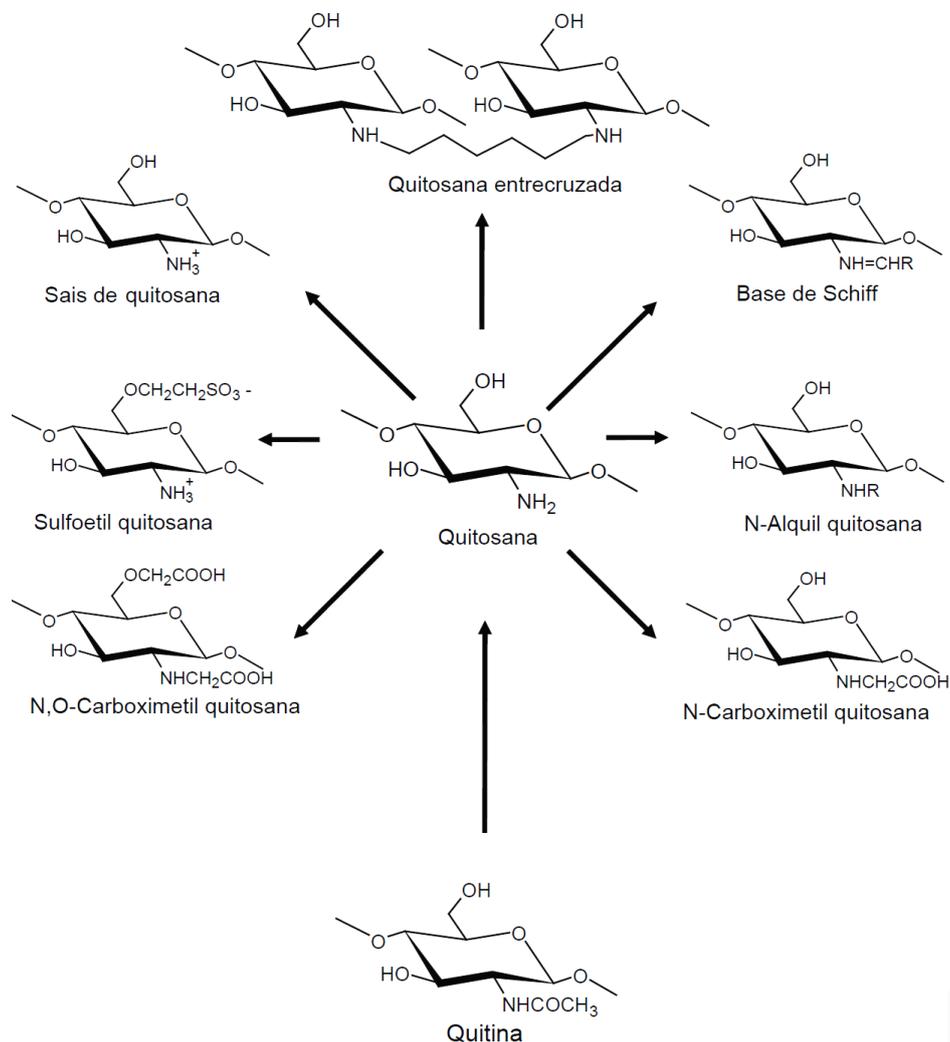
Fonte: (AZEVEDO et al., 2007).

A presença de grupos substituintes com diferente densidade eletrônica exerce a mudança na força das ligações de hidrogênio que o polímero é capaz de fazer, e por isso a quitosana e seus derivados intumescem em água, mesmo com a alta hidrofobicidade de suas cadeias (AZEVEDO et al., 2007). Assim, modificações químicas na estrutura do polímero podem estar diretamente relacionadas com seu grau de hidrofiliicidade.

Entre propriedades físico-químicas da quitosana, destaca-se a insolubilidade em água, mas solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, e ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico. A solubilidade da quitosana está relacionada diretamente com os grupos aminos livres presentes em sua cadeia polimérica. Devido à grande quantidade desses grupos, ocorre o aumento da repulsão eletrostática entre as cadeias, ocasionando também o aumento da solvatação em água (DOCKAL, 2003).

Devido aos grupos reativos presentes na estrutura do polímero, como hidroxilas e principalmente os grupos amino, a quitosana pode sofrer diversas substituições e modificações químicas, como carboxilação, acilação, sulfatação, substituição enzimática, quelação por metais, cianoetilação, nitração, fosforilação entre outras (Figura 12) (DOCKAL, 2003; DIAB et al., 2011). Assim, essas várias modificações que são possíveis serem feitas na estrutura da quitosana são importantes ferramentas para o melhoramento das propriedades físico-químicas do polímero, como a estabilidade química em solventes, alterações nas características hidrofóbicas/hidrofílicas, estabilidade térmica e resistência a degradação bioquímica e microbiológica (DIAB et al., 2011).

Figura 12 – Derivados da modificação química da quitosana.



Fonte: (SENAI; MANGE, 2007)

2.6.2. Resinas hidrofóbicas

As lipases interagem com superfícies hidrofóbicas, mudando a sua conformação com a abertura do “lid” e a exposição do sítio catalítico ao meio reacional. Assim, elas são fortemente adsorvidas no suporte e imobilizadas em sua estrutura aberta. As resinas de cromatografia fenil-agarose e octil-agarose são suportes porosos altamente carregados com grupos hidrofóbicos, sendo apropriados para esse tipo de imobilização (BASTIDA et al., 1998).

2.7. Aplicação de lipases imobilizadas

Na literatura há vários trabalhos que relatam o uso de lipases imobilizadas sendo amplamente utilizadas devido as suas propriedades e diversidade reacionais já citadas anteriormente. Alguns exemplos de aplicações são nas indústrias cosméticas, farmacêuticas e de processos em geral. A Tabela 1 apresenta algumas aplicações de lipases imobilizadas. Pode-se observar a variedade de aplicações das lipases, como em reações enantiosseletivas e de hidrólise, acidólise, etanólise. As lipases imobilizadas apresentam-se mais estáveis e ativas por se estabilizaram na conformação aberta em muitos processos de imobilização. Devido a esse motivo, as lipases são consideradas importantes proteínas com atividade catalítica, com suas aplicações cada vez mais exploradas.

Tabela 1 – Aplicações de diferentes lipases imobilizadas.

Origem da Lipase	Método de imobilização	Aplicação	Referência
<i>Grey mullet</i>	Adsorção	Hidrólise substrato sintético	(ARYEE; SIMPSON, 2012)
<i>Candida antarctica B</i>	Covalente	Polimerização de caprolactone	(CHEN et al., 2008)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Adsorção	Acidólise do óleo de girassol	(PALLA et al., 2011)
<i>Thermomices lanuginosos</i>	Covalente	Etanólise	(MENDES et al., 2011)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Adsorção e covalente	Hidrólise Enantiosseletiva	(HABIBI et al., 2013)

3. CAPÍTULO I

***Produção, pré-prurificação e
imobilização de lipase de *Acremonium* sp e aplicação na
hidrólise de triacilglicerídeos***

3.1. INTRODUÇÃO

As lipases podem ser obtidas de fontes vegetais, animais ou microbiana, sendo as últimas as mais utilizadas. Por serem extracelulares, as lipases fúngicas são as mais valorizadas e utilizadas, pois são facilmente extraídas do meio de cultivo (COLLA et al., 2007). Nesse capítulo abordaremos a pré-purificação de lipases a partir do fungo mesofílico *Acremonium* sp por ultrafiltração e precipitação em etanol, a imobilização hidrofóbica específica e a avaliação da capacidade hidrolítica dessas enzimas imobilizadas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e pré-purificar lipases de *Acremonium* sp e caracterizá-las quanto ao pH e temperatura ótima;
- Imobilizar e estabilizar as lipases por adsorção sobre as resinas hidrofóbicas fenil-agarose e octil-agarose;
- Avaliar o efeito da força iônica (presença de NaCl) na imobilização hidrofóbica e caracterizar os derivados hidrofóbicos quanto sua estabilidade;
- Avaliar a força de interação entre a enzima e o suporte e a inibição covalente dos derivados imobilizados na presença e ausência de NaCl;
- Utilizar as enzimas imobilizadas por adsorção em reações de hidrólise de triacilglicerídeos.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Micro-organismo

As lipases foram produzidas a partir do fungo mesofílico *Acremonium* sp, micro-organismo que, por apresentar atividade de transesterificação na presença de álcool e óleo, foi selecionado em projetos anteriores desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. As enzimas foram obtidas por fermentação em estado sólido e os testes de imobilização covalente foram realizados com as enzimas comerciais *Rizhomucor miehei* e *Thermomices lanuginosus* (Sigma-Algrich).

3.3.2. Cultivo do fungo

3.3.2.1. Meios de cultura

Para a seleção e crescimento das cepas fúngicas foi utilizado um meio nutriente modificado de Castro-Ochoa, et al. (2005) (%): 0,1 peptona; 1,0 (NH₄)₂SO₄; 1,0 KH₂PO₄; 0,05 MgSO₄·7H₂O; 0,1 CaCl₂; 6,0 óleo de soja; 1,0 de emulsificante (goma arábica, Triton X-100 ou Tween 80); 0,5 de solução de elementos traços (2,2 de ZnSO₄·7H₂O; 1,1 de H₃BO₃; 0,5 de MnCl₂·4H₂O; 0,5 de FeSO₄·7H₂O; 0,16 de CoCl₂·5H₂O; 0,16 de CuSO₄·5H₂O; 0,11 de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O; 5,0 de EDTA); 2,0 de ágar em pH 6,0.

3.3.2.2. Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada em sacos de polipropileno (27 cm x 15 cm) contendo bagaço de cana de açúcar, sendo o pré-inóculo preparado a partir do cultivo do fungo *Acremonium* sp em erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio de cultura citado no item 3.3.2.1. Para obtenção do inóculo, 100 mL de água destilada será adicionado aos frascos contendo o cultivo do fungo *Acremonium* sp para obtenção de solução de esporos. A inoculação foi realizada com média de 5×10^5 esporos em 20 mL de solução nutriente (2% peptona, 0,2% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄ e 2% óleo de oliva (m/m)) em cada saco de fermentação (umidade média de 70% (m/m)). A FES foi incubada a 28 °C durante 72 horas e as amostras extraídas com 50 mL tampão fosfato 5 mM pH7, seguido de centrifugação a 10.000 rpm à 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi armazenado a 4 °C, sendo esse considerado como extrato bruto.

3.3.3. Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de substrato cromogênico

O substrato sintético butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) é hidrolisado pela enzima em meio aquoso e a detecção da atividade enzimática é relacionada pelo método colorimétrico. Para o preparo do substrato sintético, 25 µL de uma solução de 10 mg de *p*NPB em 1 mL de acetonitrila é adicionado a 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7. A reação ocorreu em uma cubeta de plástico alojada em um espectrofotômetro Perkin Elmer® acoplado a um sistema de aquecimento e agitação Peltier mantido a 25 °C por 2 minutos, e a absorvância foi lida em $\lambda = 358$ nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1

μmol de *p*NP (*p*-nitrofenilato) por minuto nas condições da reação. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a

Equação 1:

$$\textit{Atividade Enzimática} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{Abs} \times V_t}{E \times V_e \times T}$$

Equação 1 – Cálculo da atividade enzimática, no qual Abs = absorvância obtida a 410nm; V_t = volume total da reação; E = coeficiente de extinção molar; V_e = volume de enzima utilizada; T = tempo total da reação.

3.3.4. Proteína total

O método de Bradford (1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteína total da solução enzimática bruta e dos seus respectivos fracionamentos, usando soroalbumina bovina como referência.

3.3.5. Pré-purificação do extrato enzimático

3.3.5.1. Concentração

A fim de se obter um extrato mais puro e sem possíveis interferentes e inibidores da atividade enzimática ou que possam atrapalhar o processo de imobilização, o extrato bruto foi concentrado utilizando o sistema QuixStandTM Benchtop da Amersham Bioscience com membrana miliporosa de 10 kDa, utilizando uma unidade de ultrafiltração com uma pressão de 15 psi. O extrato foi concentrado cerca de 10 vezes (v:v), seguido de medida de atividade enzimática.

3.3.5.2. Precipitação com etanol

Para precipitação do extrato com etanol, foram realizados testes com diferentes proporções de volume de extrato:etanol (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, respectivamente) para determinar a concentração de etanol para um melhor rendimento na purificação. A mistura foi matida em repouso por 4 horas à 0 °C seguida de centrifugação a 10.000 rpm à 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso no menor volume possível de tampão fosfato de sódio 5 mM pH7. A atividade do precipitado foi medida de acordo com a metodologia em 3.3.3.

3.3.5.3. Eletroforese

A eletroforese SDS-PAGE foi realizado utilizando um gel de poliacrilamida a 15% (m/m) com 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio). Um kit (SIGMA) padrão de baixa massa molar de proteínas foi utilizado: Fosforilase β (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina (20 kDa), α -lactoalbumina (14.4 kDa). Para a detecção de outras proteínas, foi utilizada solução corante de prata.

3.3.4. Caracterização bioquímica

3.3.4.1. Determinação do pH e temperatura ótima

Este procedimento foi realizado para o extrato bruto do fungo *Acremonium* sp. Foram avaliados a temperatura e pH ótimo das lipases produzidas, variando-se a temperatura de 20 a 55 °C, e o pH de 3 a 9. A metodologia utilizada foi a descrita em 3.3.3.

3.3.5. Imobilização reversível e estabilidade dos derivados

3.3.5.1. Imobilização das lipases por interação hidrofóbica

Para a imobilização, 10 mL de extrato enzimático foi adicionado a 1,0 g de cada suporte, fenil-agarose e octil-agarose por tempo máximo de 180 minutos. Concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0 mol·L⁻¹ de sal foram testadas, adicionando à solução enzimática a quantidade necessária de NaCl a partir da solução estoque de 2 mol·L⁻¹ para obter a concentração final desejada. A atividade hidrolítica da suspensão e do sobrenadante foram medidas periodicamente (item 3.3.3) e após a imobilização o derivado foi lavado com tampão fosfato 5 mM pH 7 e filtrado a vácuo.

3.3.5.2. Cálculo do rendimento de imobilização (%)

O rendimento de imobilização foi calculado a partir da razão entre a atividade no tempo inicial e a atividade após o tempo de incubação, de acordo com a Equação 2:

$$\text{Rendimento de Imobilização (\%)} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

Equação 2 – Cálculo do rendimento de imobilização (%), no qual A_i : atividade total oferecida inicialmente; A_f : atividade total do sobrenadante final após a imobilização.

3.3.5.3. Dessorção das enzimas imobilizadas

O estudo da força de adsorção das lipases sobre os suportes foi realizado a partir da dessorção das enzimas imobilizadas na ausência nos derivados fenil-agarose e octil-agarose. Concentrações crescentes de surfactante TRITON X-100 foram adicionadas e a atividade hidrolítica do sobrenadante foi medida a cada 30 minutos.

3.3.5.4. Inativação térmica e covalente dos derivados

Os derivados imobilizados em diferentes concentrações de NaCl que apresentaram maior índice de hiperativação foram submetidos a inativação térmica e covalente. Os derivados foram incubados em tampão fosfato 10 mM pH 7 (razão 1:10 derivado:tampão) a 55 °C para a inativação térmica e a 25 °C na presença de 1 µM do agente inibidor D-*p*NP (dietil 4 *p*-nitrofenil fosfato) para a inativação covalente, com monitoramento da atividade enzimática.

3.3.6. Reação em meio aquoso – Hidrólise de óleos vegetais

A reação de hidrólise dos ácidos graxos foi realizada a partir da hidrólise dos óleos de canola, soja, girassol, milho, coco, algodão, linhaça, gergelim, dendê e oliva na presença de 1,1% de goma arábica, 37,1% de água, 49,4% tampão fosfato 50 mM pH 7 e 12,4% de óleo. A reação foi mantida a 45 °C por 35 minutos e em seguida foi parada com 10 mL de solução acetona:etanol (1:1 v:v). Para o controle, foi utilizado o mesmo sistema reacional, porém sem o biocatalisador. O rendimento da reação foi calculado de acordo com a Equação 1, a partir da titulação de neutralização dos ácidos graxos produzidos com solução KOH 50 mM até pH 8, utilizando um pHmêtro Stat 902 Titrand – Metrohm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 µmol de produto por minutos, nas condições reacionais.

$$\textit{Atividade} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{V_{(a)} - V_{(c)} \times M_{(b)} \times 1000}{m \times t}$$

Equação 3 – Cálculo da atividade hidrolítica a partir da hidrólise de triglicerídeo, no qual V(a): volume de base utilizado para titulação da amostra (mL); V(c): volume de base utilizado para titulação do controle (mL); M(b): molaridade da base utilizada (mol·L⁻¹); m: massa da amostra (g).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Preparação do extrato enzimático

O extrato enzimático produzido a partir do fungo mesofílico *Acremonium* sp, após extração e centrifugação, foi concentrado 100 vezes em ultrafiltração o que levou a um aumento na atividade enzimática de cerca de 13 vezes. Outra forma de concentração do extrato enzimático testada foi a precipitação das enzimas com etanol. Para isso, várias razões de volume extrato enzimático:etanol (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:4) foram testadas a fim de determinar qual a melhor condição precipitação. O extrato precipitado apresentou menor atividade enzimática do que o extrato bruto após a concentração, como mostrado na Tabela 2.

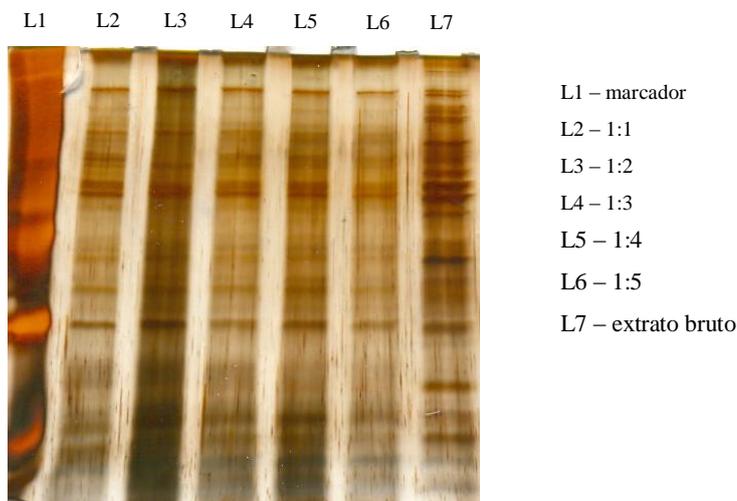
Tabela 2 – Atividade lipásica específica e rendimento de purificação do extrato enzimático de *Acremonium* sp bruto, concentrado e precipitado com etanol em diferentes proporções.

Extrato	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Extrato bruto	$1,6 \cdot 10^5$	100	1
Extrato concentrado	$9,9 \cdot 10^7$	30,0	2,53
1:1*	$3,3 \cdot 10^5$	24,7	2,09
1:2*	$2,2 \cdot 10^5$	25,1	1,38
1:3*	$2,0 \cdot 10^5$	16,3	1,29
1:4*	$1,2 \cdot 10^5$	15,4	0,73
1:5*	$9,9 \cdot 10^4$	5,98	0,62

*extrato precipitado em diferentes razões de volume extrato:etanol.

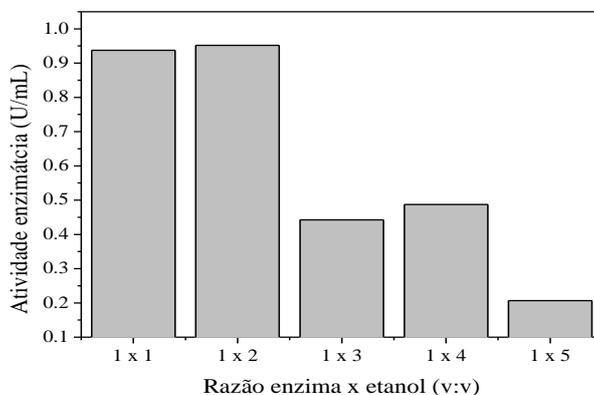
Na eletroforese SDS-PAGE apresentada na Figura 13, é possível observar uma diminuição do número de frações proteicas das amostras precipitadas (L2 a L6) se comparada com a amostra de extrato bruto (L7). O perfil proteico dos precipitados não apresentou diferenças significativas entre si, indicando que a quantidade de etanol não influenciou na precipitação.

Figura 13 – Eletroforese SDS-PAGE da precipitação com diferentes razões de volume de extrato:etanol.



Os resultados mostram que a melhor razão de volume extrato enzimático:etanol foi 1:1, pois apesar do rendimento entre as razões 1:1 e 1:2 serem semelhantes, o fator de purificação se apresentou 50% maior em 1:1 e atividade enzimática apresentou-se dependente do volume de etanol utilizado, como mostrado na Figura 14. A atividade enzimática apresentou uma correlação negativa ao aumento do volume de etanol utilizado durante a precipitação mostrando uma intolerância enzimática ao etanol. Tal fato também pode ser responsável pela menor atividade do extrato precipitado quando comparado ao concentrado.

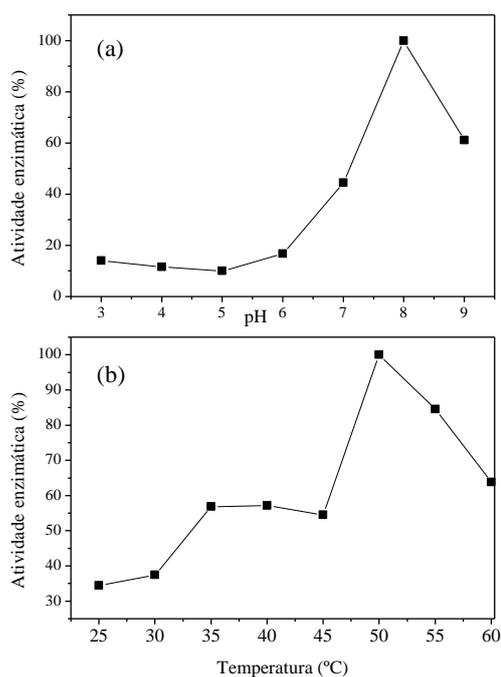
Figura 14 – Atividade hidrolítica de *p*-NPB das lipases de *Acremonium* SP precipitadas em função da razão de enzima:etanol.



3.4.2. Caracterização bioquímica

Após os testes de concentração de precipitação, as enzimas foram avaliadas quanto ao seu pH e temperatura ótimas, como apresentado na Figura 15. As lipases presentes no extrato bruto apresentaram melhor atividade em pH 8 e, apesar do extrato enzimático ser produzido por um fungo mesofílico, este apresentou maior atividade em 50 °C. Porém, pode-se perceber a característica termotolerante da enzima, apresentando valores atividades maiores na faixa de 50 a 60°C quando comparados a 30 °C, temperatura do processo fermentativo.

Figura 15 – Determinação do pH ótimo (a) e da temperatura ótima (b) da lipase de *Acremonium* sp no extrato bruto baseado na atividade hidrolítica do substrato *p*-NPB. Os resultados representam os valores médios dos dados replicados com desvio padrão menor que 5%.

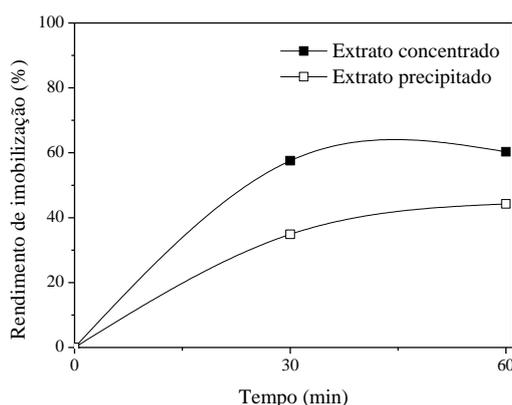


3.4.3. Imobilização por adsorção hidrofóbica

Após a realização dos testes de concentração e precipitação das enzimas solúveis, as mesmas foram submetidas à imobilização em suportes hidrofóbicos, utilizando-se 1,0 g de cada suporte submerso em 10 mL de extrato enzimático. A fim de verificar qual o

tipo de extrato (concentrado ou precipitado) que melhor se liga ao suporte, foi realizada a imobilização com a resina cromatográfica octil-agarose, pois é uma resina de interação hidrofóbica específica para enzimas com grande área apolar. A Figura 16 apresenta a imobilização das lipases concentradas e precipitadas em octil-agarose após a incubação da enzima com o suporte por 60 minutos. Os resultados mostraram que a imobilização em octil-agarose com extrato concentrado apresentou maior rendimento em relação ao extrato precipitado, o que provavelmente está relacionado com a baixa atividade das enzimas precipitadas devido ao fator de purificação ser maior para o processo de ultrafiltração, sendo as enzimas em maior concentração.

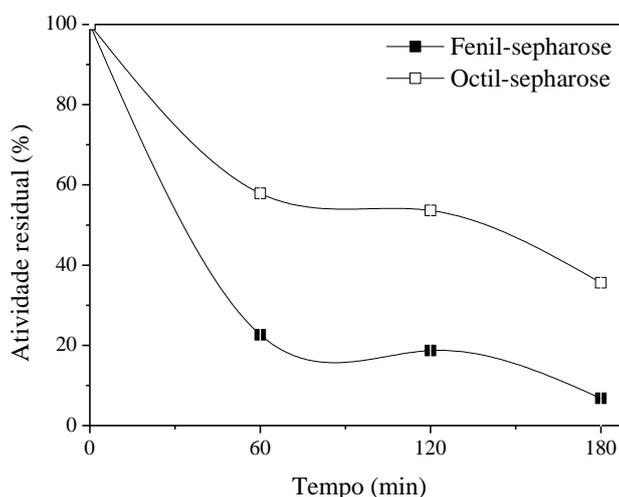
Figura 16 – Cinética de imobilização da lipase de *Acremonium* sp concentrada e precipitada sobre octil-agarose. Os resultados representam os valores médios dos dados replicados com desvio padrão menor que 5%.



Após a determinação do extrato mais eficiente para a imobilização, foram testados os suportes hidrofóbicos fenil-agarose e octil-agarose, de acordo com a Figura 17, a fim de determinar o melhor suporte na imobilização de lipases. Após 180 minutos de incubação da enzima e suporte, a imobilização em fenil-agarose apresentou um rendimento de aproximadamente 35% maior do que o apresentado em octil-agarose. Ambas as resinas apresentam porosidade iguais (entre 45 – 165 μ m), portanto, a capacidade de carregamento de enzima é uma característica semelhante entre os dois suportes utilizados. A característica hidrofóbica das resinas testadas é uma informação carente de determinação experimental, porém a resina octil-agarose pode ser caracterizada como sendo mais hidrofóbica do que a fenil-agarose devido ao octanol, álcool precursor do radical octil apresentar solubilidade em água de aproximadamente

$6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto o precursor do radical fenil, o fenol, possui solubilidade em torno de $84\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. O rendimento de imobilização encontrado nos leva a hipótese de que pelo radical octil ser uma molécula alifática, pode apresentar uma interação maior, tanto com as lipases quanto com outras proteínas ou outros interferentes que possam existir no extrato enzimático bruto, obtendo um rendimento menor do que o fenil, que por se tratar de uma cadeia cíclica aromática, sua superfície de contato torna-se menor, acabando por apresentar-se mais seletivo.

Figura 17 – Cinética de imobilização da lipase de *Acremonium* sp concentrada em fenil-agarose e octil-agarose. Os resultados representam os valores médios dos dados replicados com desvio padrão menor que 10%.

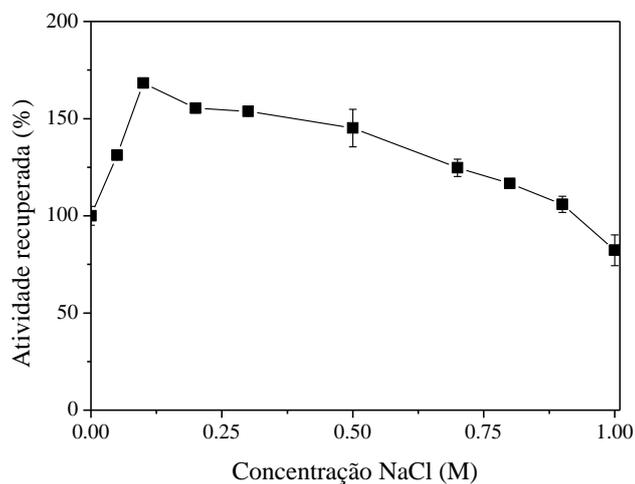


3.4.4. Influência da força iônica na imobilização hidrofóbica

A lipase de *Acremonium* sp foi imobilizada em DEAE-agarose (suporte iônico) para avaliação do efeito do NaCl na atividade enzimática, como apresentado na Figura 18. Observou-se que o NaCl causou uma hiperativação na atividade enzimática até um limite de 0,9 M deste sal, e o aumento da concentração de sal teve um efeito negativo sobre a atividade enzimática. A maior concentração de NaCl pode provocar a dessorção de enzimas, devido estarem associadas por interação iônica ao suporte. A hiperativação máxima foi de 75% em 0,01 M NaCl, mas as concentrações próximas a este valor também apresentaram valores significativos de hiperativação. Este comportamento não é característico de lipases, mas mostrou que em concentrações de até 0,7 M de NaCl interferiu na atividade enzimática de maneira positiva, sendo possível utilizar este sal

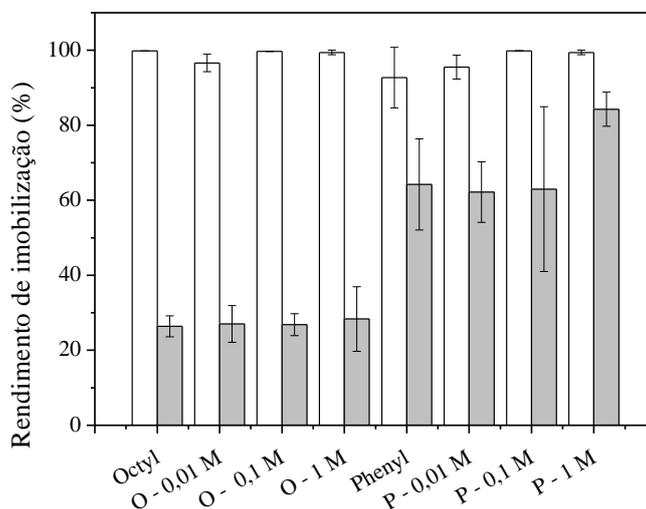
como co-fator para aumentar a atividade catalítica das lipases extracelulares de *Acremonium* sp.

Figura 18 – Efeito do NaCl na atividade das lipases de *Acremonium* sp immobilizadas em DEAE-agarose na hidrólise do substrato sintético *p*-NPB.



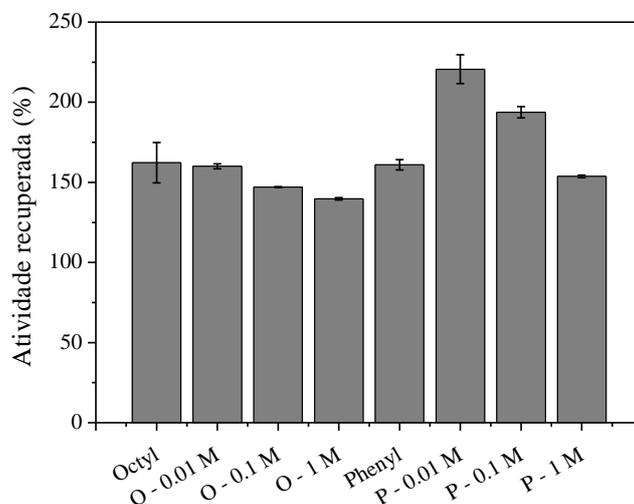
Devido a hiperativação das enzimas solúveis na presença de NaCl quando immobilizadas em um suporte iônico, este sal foi utilizado na imobilização hidrofóbica de lipases a fim de causar maior hiperativação das lipases immobilizadas. A Figura 19 mostra o rendimento de imobilização e a quantidade de proteína adsorvida em octil- e fenil-agarose. O aumento da força iônica aumentou a adsorção de proteínas, mas não afetou a imobilização da lipase. Na ausência do sal de NaCl, as lipases de *Acremonium* sp foram imobilizadas em ambos os suportes e a quantidade de proteínas adsorvidas foi menor do que a da imobilização com NaCl. A carga proteica de octil-agarose foi similar em todos os ensaios de imobilização, no entanto, só com fenil-agarose o aumento da força iônica (NaCl a 1,0 M) ocasionou na maior adsorção de proteínas, cerca de 80%, enquanto que 60% foram adsorvidas quando a imobilização foi realizada na ausência de NaCl. Deste modo, a adsorção em suportes hidrófobos na ausência NaCl pode ser considerada mais seletiva para as lipases de *Acremonium* sp, sem afetar o rendimento de imobilização.

Figura 19 – Rendimento de imobilização baseado na atividade lipolítica (branco) e proteína adsorvida (cinza) das lipases de *Acremonium* sp em octil- (O) e fenil-agarose (P) em diferentes condições de NaCl após 30 minutos de incubação.



A Figura 20 mostra que a hiperativação das lipases imobilizadas foi observada em ambos os derivados (120 % para o fenil-agarose em 0,01 M de NaCl e 62 % para a octil-agarose em NaCl 0,01 M). A hiperativação de lipases em suportes hidrófobos é observada quando a imobilização ocorre através do “*lid*” da enzima, preservando a conformação ativa da enzima. Este fenômeno já foi observado para as lipases de *Candida rugosa* (110%), *Candida antarctica* (200%), *Humicola lanoso* (2000%), *M. javanicus* (300%), *Rhizomucor miehei* (700%), *P. flourescens* (150%), *R. niveus* (600%) e do pâncreas do porco (300%), quando imobilizado em octil-agarose, apresentando derivados com alta hiperativação na hidrólise de *p*-NPP (BASTIDA et al., 1998). Adsorção de lipases em fenil-agarose ainda é pouco estudada; no entanto, os resultados mostraram que a sua utilização para a imobilização hidrofóbica contribuiu para a atividade hidrolítica de lipases de *Acremonium* sp. Deste modo, a adsorção dessas lipases em suportes hidrofóbicos na presença de força iônica causou a hiperativação das enzimas imobilizadas para todos os derivados de fenil-agarose, quando comparados com o mesmo derivado, na ausência de sal.

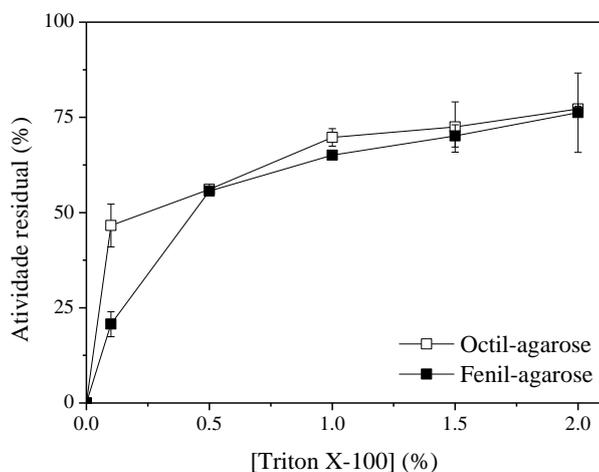
Figura 20 – Atividade relativa dos derivados das lipases de *Acremonium* sp immobilizadas em octil-agarose (O) e fenil-agarose (P) em diferentes concentrações de NaCl.



3.4.5. Estudo da força de interação enzima-suporte

O estudo da força de interação entre as enzimas e o suporte foi realizado a partir da dessorção das enzimas immobilizadas na presença de diferentes concentrações de surfactante Triton X-100. Na Figura 21 a atividade residual foi maior com o aumento da concentração de surfactante utilizado para a dessorção das proteínas immobilizadas. A Figura 21 mostra que, para a concentração de surfactante mais baixa (0,1%), a força de interação lipases immobilizadas em fenil-agarose é mais elevada do que as lipases immobilizadas em octil-agarose. A resina fenil-agarose promove a immobilização da lipase e apresenta melhor estabilidade da interação entre a enzima immobilizada e o suporte. O uso de surfactante em maior concentração, o comportamento de interação enzima-suporte de ambos os suportes é muito semelhante, com 75% de enzimas dessorvidas a 2% de surfactante. A elevada concentração de surfactante levou a inativação das lipases.

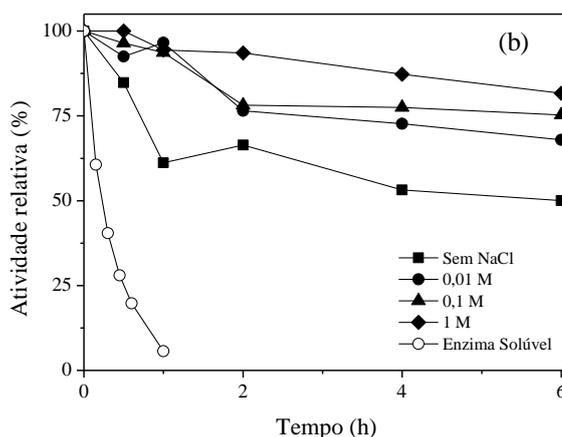
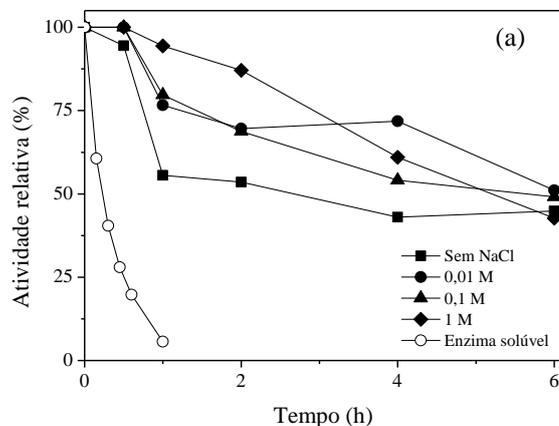
Figura 21 – Dessorção das lipases de *Acremonium* sp immobilizadas em fenil- e octil-agarose na ausência de NaCl.



3.4.6. Inativação térmica

Inativação térmica foi realizada a 55 °C durante um período máximo de seis horas. A enzima solúvel mostrou tempo de meia-vida de 20 minutos com perda total de atividade após 60 minutos. Todos os derivados foram mais estáveis do que a enzima solúvel, com meia-vida de no mínimo três horas. Os derivados de fenil-agarose apresentaram tempo de meia-vida maior do que os de octil-agarose. Após o tempo de incubação, o melhor derivado foi o qual a imobilização ocorreu a 1M NaCl, mantendo 80% da atividade enzimática, como mostra a Figura 22.

Figura 22 – Inativação térmica das lipases de *Acremonium* sp immobilizadas em octil- (a) e fenil-agarose (b) na presença e ausência de NaCl incubadas a 55 °C por 6 horas.

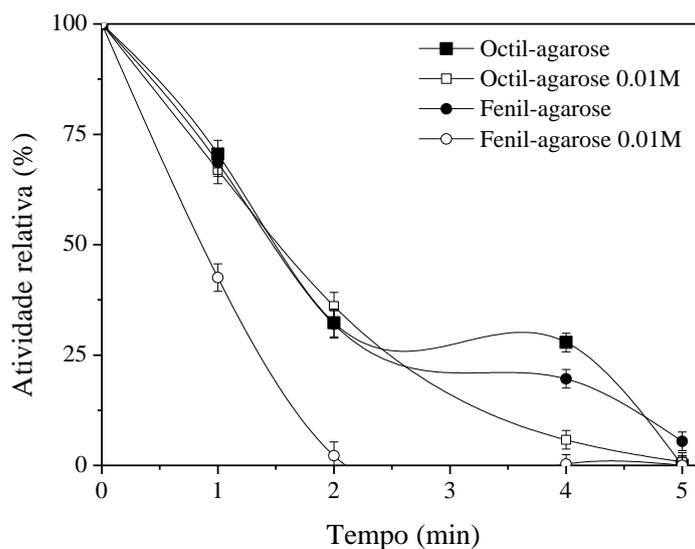


A atividade recuperada dos derivados de octil-agarose após o tempo de incubação foi muito semelhante, dentro do erro padrão. Depois de duas horas, o derivado de 1 M de NaCl manteve atividade recuperada mais elevada do que todos os outros derivados, embora a sua atividade decresceu fortemente durante do período de incubação. Este comportamento sugere que a imobilização de elevada força iônica pode contribuir para a estabilidade térmica das lipases *Acremonium* sp. Uma comparação entre os derivados de fenil-agarose mostrou claramente que a imobilização ocorrida a elevada força iônica contribuiu para a estabilidade térmica das enzimas imobilizadas. Após seis horas de incubação, 80% da atividade recuperada foi mantida para o derivado de 1,0 M de NaCl, seguido dos derivados 0,1 M e 0,01 M de NaCl. Em todos os casos, os derivados sem NaCl foram menos termoestáveis de os derivados imobilizados na presença do sal.

3.4.7. Inativação covalente

A D-*p*NP utilizado como um inibidor atua sobre os resíduos de serina presentes no sítio ativo de lipases, resultando na inativação enzimática. A imobilização hidrofóbica pode promover a estabilização da enzima na sua conformação ativa, de modo que a inibição é mais fácil e mais rápida do que quando a lipase apresenta as duas conformações. Esse estudo foi realizado com a enzima imobilizada na ausência e na condição de NaCl que promoveu maior hiperativação. A inibição dos derivados de octil-agarose imobilizados na ausência de NaCl e a 0,01 M foram semelhantes, como mostrado na Figura 23. No entanto, a inativação enzimática é mais rápida para os derivados de fenil-agarose imobilizados em NaCl 0,01 M, devido a enzima estar na sua forma aberta e o sítio ativo mais presente ao meio reacional, o que sugere que essa concentração de sal utilizada é capaz de imobilizar maior quantidade de enzimas na forma ativa do que as outras condições de imobilização. Assim, a baixa concentração de NaCl adicionado para o meio de imobilização foi um fator significativo na hiperativação das lipases de *Acremonium* sp imobilizadas em fenil-agarose. Isso é comprovado devido o inibidor covalente ser mais reativo com o sítio ativo e provocar a inativação enzimática mais rápida do que as outras condições de imobilização e outros derivados.

Figura 23 – Inibição covalente das lipases de *Acremonium* sp imobilizadas em octil- e fenil-agarose na presença de 1 μ M de inibidor.



3.4.8. Reações em meio aquoso

Os derivados hidrofóbicos foram aplicados nas reações de hidrólise de vários óleos vegetais. A Tabela 3 relaciona a composição dos óleos utilizados nas reações de hidrólise.

Tabela 3 – Composição média de ácidos graxos de óleos vegetais (KNOTHE, et al., 2006).

Óleo vegetal	Composição de ácido graxo (% m/m)					
	12:0	14:0	16:0	18:1	18:2	18:3
Algodão		0,6-1,5	21-26	15-21	47-58	
Canola			1,5-6	52-67	16-31	6-14
Coco	44-51	13-20	7-10	5-8	1-3	0-0,2
Dendê			40-44	10-14	34-40	
Gergelim			7-9	35-46	35-48	
Girassol			3-8	14-43	44-74	
Linhaça			6-7	13-37	5-23	26-60
Milho		0-0,3	7-16	20-43	39-62	0,5-1,5
Oliva		0-1,3	7-20	55-84	3-21	
Soja			2-13	18-31	49-57	2-10

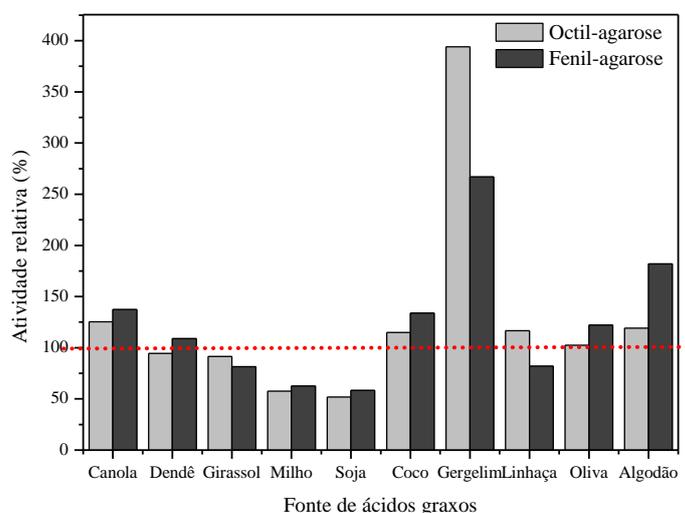
Derivados mostraram atividade hidrolítica superior à enzima solúvel para quatro tipos de óleos. As lipases sofrem modificações durante a reação e podem apresentar diferente régio- e enantiosseletividade, dependendo do método de imobilização utilizado. A imobilização hidrofóbica de lipases de *Acremonium* sp em resinas cromatográficas apresentou resultados significativos na hidrólise de alguns óleos vegetais. A atividade de hidrólise de óleo de gergelim foi de cerca de 4,0 e 2,5 vezes superior à enzima solúvel quando imobilizada em octil- e fenil-agarose, respectivamente (Figura 24).

Todos os óleos testados possuem uma elevada quantidade de ácidos graxos insaturados como oleico, linoleico e linolênico (18:01; 18:02; 18:03, respectivamente), com exceção do óleo de coco, que contém quase a metade de sua composição de ácido láurico (12:0). Na hidrólise dos óleos de canola, coco, gergelim e algodão foi observado maior atividade enzimática, especialmente o óleo de gergelim composto por quantidades significativas de ácido oleico e linoleico. No entanto, os óleos de milho e soja apresentaram o menor resultado na atividade hidrolítica usando a lipase de *Acremonium* sp imobilizada. Ambos estes óleos são compostos de ácido linoleico em maiores quantidades, mas, como um diferencial, o óleo de gergelim tem quantidades

significativas de antioxidantes naturais, tais como o sesamol, sesamolina e gama-tocoferol, que possuem características apolares, podendo providenciar maior interface polar-apolar para atuação das enzimas. Resultados de hidrólise mostraram que o comportamento enzimático foi alterada pela imobilização hidrofóbica utilizando substratos naturais.

A imobilização hidrofóbica de lipases de *Acremonium* sp foi uma técnica favorável para aumentar a atividade hidrolítica destas enzimas. Deverá ser dada especial atenção ao octil- agarose, devido ao aumento da atividade e a modificação preferência da atividade enzimática após a imobilização, tornando-se um material interessante para ser usado como um portador para imobilização enzimática.

Figura 24 – Atividade hidrolítica das lipases solúveis e imobilizadas em octil-agarose e fenil-agarose sob diferentes óleos. A linha tracejada em vermelho representa a atividade da enzima solúvel, considerada como 100%. Os resultados representam os valores médios dos dados replicados com desvio padrão menor que 10%.



Mesmo os suportes utilizados na imobilização reversível por interação hidrofóbica sendo específicos para enzimas com grande área hidrofóbica e as lipases terem preferência por moléculas grandes de substratos, a quantidade relativa de ácidos graxos com mais de 16 carbonos em suas estruturas não apresentam correlação direta com a atividade hidrolítica das lipases testadas. Essa não correlação pode ser causada por diversos fatores, tais como um maior impedimento estérico em moléculas maiores,

necessitando de mais tempo de reação para que a enzima atue sob essas ligações; como os valores de ácidos graxos presentes nos óleos testados são estimáveis, os mesmos podem estar em uma quantidade mínima, sendo menor o rendimento de hidrólise. Porém, em alguns casos foi observado que a imobilização hidrofóbica na atividade hidrolítica enzimática.

3.5. CONCLUSÕES

As lipases extracelulares de *Acremonium* sp apresentaram-se ativas e com alta atividade hidrolítica. Essas enzimas apresentaram intolerância à etanol, sendo inibidas rapidamente com o aumento do álcool utilizado durante o processo de precipitação. Assim, o processo de ultrafiltração apresentou-se mais eficiente, com um nível considerável de purificação das enzimas brutas.

A imobilização reversível dessas lipases em suportes hidrofóbicos apresentaram resultados significativos, no qual a imobilização proporcionou maior atividade hidrolítica e estabilidade para as lipases, quando comparada com a lipase solúvel. A concentração de NaCl não afetou diretamente o processo de imobilização de lipases, mas levou a uma hiperativação das lipases imobilizadas, podendo ser futuramente investigado para aplicação em diferentes reações.

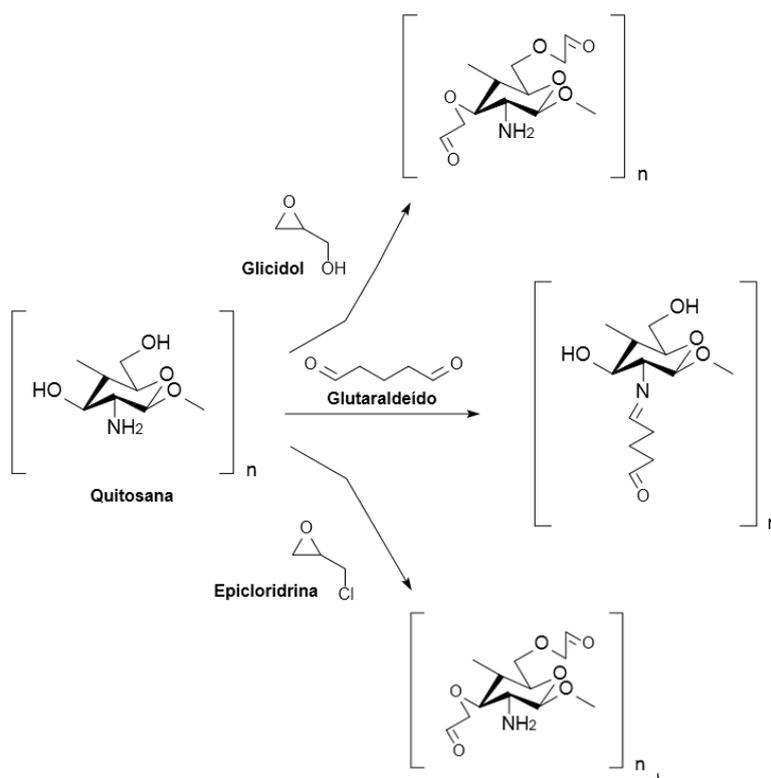
4. CAPÍTULO II

*Modificação química e caracterização da
quitosana para aplicação como suporte para imobilização
de lipases*

4.1. INTRODUÇÃO

Esse capítulo trata da modificação química da quitosana para formação de grupos aldeídos em sua estrutura que reagem com os grupamentos amino da estrutura das proteínas, efetivando a imobilização das lipases por ligação covalente. A Figura 25 ilustra o processo geral proposto de modificação química da quitosana.

Figura 25 – Esquema das diferentes estratégias de modificação química da quitosana para posterior utilização como suporte na imobilização de lipases.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar quimicamente a quitosana com epicloridrina, glicidol e glutaraldeído com a finalidade de imobilizar lipases;
- Caracterizar os suportes quimicamente modificados em termos de área superficial por BET, estabilidade térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) e o nível dos grupos substituintes por espectrofotometria de infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR).

- Imobilizar e estabilizar as lipases de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML) por ligação covalente sobre quitosana quimicamente modificada e selecionar o melhor suporte para imobilização;
- Utilizar as enzimas imobilizadas covalentemente em reações de transesterificação para obtenção de biodiesel etílico a partir do óleo de soja.

4.3. PROCEDIMENTOS

4.3.1. Modificação química da quitosana para imobilização irreversível

4.3.1.1. Precipitação das esferas de quitosana

A precipitação da quitosana foi realizada a partir do método modificado(CHIOU; WU, 2004). 0,18g de quitosana desacetilada (85%) foi dissolvida em 6 mL de ácido acético a 1% (v:v) e em seguida precipitada por gotejamento em solução alcalina de NaOH $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e mantida sob agitação suave por 24 horas, seguido de lavagem das esferas gelificadas com água destilada e secas a 40 °C. Após a secagem, as esferas de quitosana foram maceradas em cadinho e armazenadas.

3.3.1.2. Modificação química da quitosana com glicidol e epícloridrina

As esferas de quitosana secas foram imersas sob agitação em uma solução aquosa (8,0 mL) contendo 1,7 M de NaOH e 0,75 M de NaBH_4 ou 2,0 M de NaOH e 0,12 M de NaBH_4 em banho de gelo para glicidol e epícloridrina, respectivamente. Posteriormente, foram adicionados 0,48 mL de glicidol ou 1,0 mL de epícloridrina por grama de quitosana e mantido por agitação mecânica durante 18h. Após esse período, as esferas foram lavadas até que se chegue à neutralidade e secas à 40 °C (RODRIGUES et al., 2008).

4.3.1.3. Modificação química da quitosana com glutaraldeído

As esferas de quitosana secas a vácuo foram imersas sob agitação em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 com 5% de glutaraldeído sob agitação por 1 hora a 25 °C (razão quitosana:solução 1:10) e em seguida as esferas foram lavadas e secas o à 40 °C (RODRIGUES et al., 2008).

4.3.1.4. Preparação de gliceril-suportes

A preparação ocorreu a partir das quitosanas ativadas obtidas da ativação com glicidol e epícloridrina, suspendendo 10 g de cada material em 100 mL de água destilada e adicionado 300 μmol de periodato de sódio por grama de suporte. Cada μmol de NaIO_4 oxida um μmol de hidroxila do suporte, logo a quantidade de periodato de sódio será embasada no grau de ativação desejado. A oxidação foi mantida em breve agitação mecânica por 2 h e o suporte oxidado lavado repetidas vezes com água destilada, até que haja total eliminação do formaldeído produzido e posteriormente armazenado a 4 °C.

4.3.2. Caracterização da quitosana quimicamente modificada

Para confirmar as modificações na quitosana quimicamente modificada e determinar as características físico-químicas do suporte modificado, o mesmo foi avaliado quanto à sua termoestabilidade (TGA, DTG e DSC), nível de substituições dos grupos substituintes (FRIR-ATR) e área superficial (BET).

4.3.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR)

A fim de terminar as modificações químicas realizadas na estrutura da quitosana, utilizou-se um espectrofotômetro modelo Spectrum Two – Perkin Elmer®, que consiste em um sistema ATR (Reflectância Atenuada Total) que opera medindo as mudanças que ocorrem em um feixe de radiação infravermelha totalmente refletida em uma amostra sobre a superfície de um cristal opticamente denso com um elevado índice de refração, geralmente um diamante.

4.3.2.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das esferas de quitosana e de suas ativações foi realizada por TGA (Análise Termogravimétrica), a fim de verificar decomposição do polímero em relação à temperatura. Foi utilizada uma balança termogravimétrica, modelo TG 4.000 – Perkin Elmer®. Amostras de aproximadamente 10 mg foram utilizadas para análise, em panela de cerâmica, com uma taxa de aquecimento de 15 °C·min⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL·min⁻¹) em uma faixa de temperatura de 50 – 750 °C.

4.3.2.3. Termogravimetria Derivada (DTG)

Para determinação e diferenciação da perda de massa entre os polímeros analisados, foi realizada a primeira derivada a partir do termograma da análise termogravimétrica. Os resultados foram comparados quanto aos eventos térmicos de decomposição de cada um dos polímeros.

4.3.2.4. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A variação de entalpia das esferas de quitosana e de suas ativações foi realizada por DSC (Calorimetria Diferencial Exploratória), a fim de verificar eventos térmicos de entalpia na estrutura do polímero com o aumento da temperatura. Para a análise, foi utilizado um DSC, modelo DSC 8.000 – Perkin Elmer®. Amostras de aproximadamente 3,0 mg foram utilizadas para análise, em panela de alumínio, com uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e uma faixa de temperatura de $50 - 400\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.2.5. Área superficial total (BET)

A medida da área superficial das esferas de quitosana e quitosana modificada foi determinada a partir da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K (imerso em nitrogênio líquido) por um analisador de área superficial modelo Gemini VII 2390p – Micrometrics®, que consiste na medida da área superficial pela dosagem de diferentes pressões de gás sob a amostra, no qual o gás adsorve sobre a superfície da amostra, causando uma diminuição na pressão total, no qual o método BET (Brunauer-Emmet-Teller) é utilizado para determinar a área superficial total. Amostras de aproximadamente 100 mg foram aquecidas a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora antes da análise para retirar qualquer vestígio de umidade que possa interferir nos resultados.

4.3.3. Imobilização irreversível

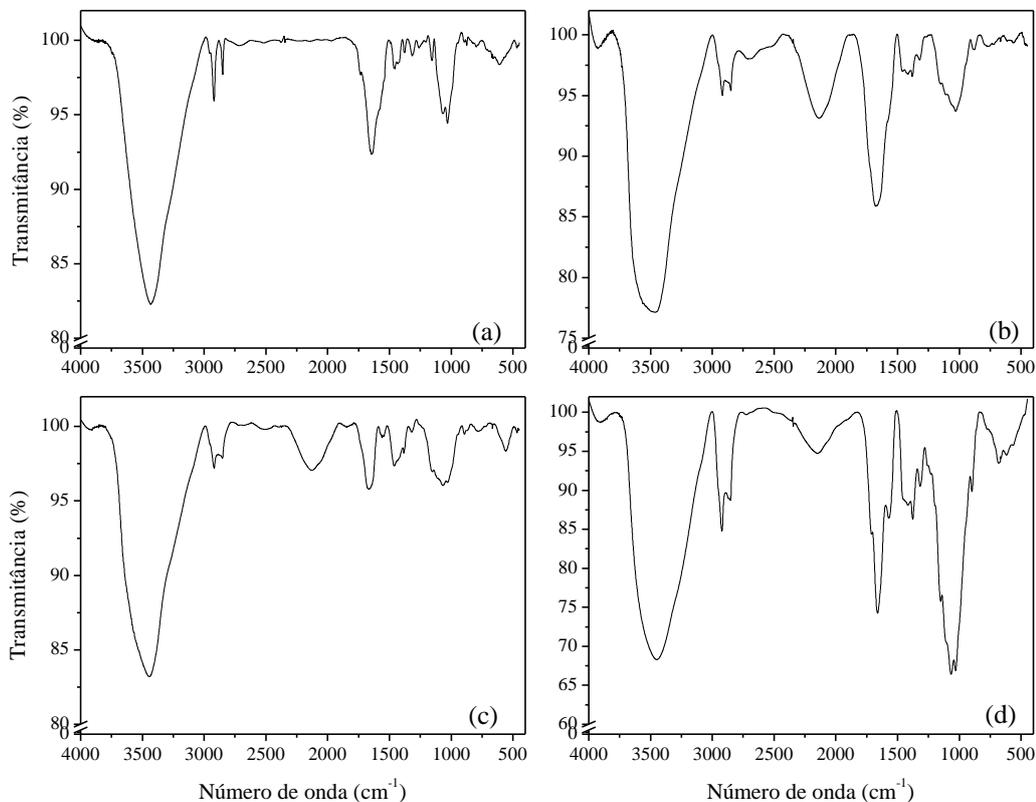
A imobilização por ligação covalente foi realizada em tampão fosfato 25mM pH 10. A solução enzimática das lipases comerciais de *Thermomices lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* (Sigma-Algrich) foi adicionada ao suporte com uma razão de 10:1 e a suspensão mantida sob leve agitação durante o período de 4-72 h a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em seguida lavou-se exaustivamente com água destilada e estocado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O rendimento de imobilização foi determinado de acordo com a Equação 2.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Identificação dos grupos substituintes modificados por FTIR-ATR

Após a reação de modificação química da quitosana, os grupos substituintes foram avaliados por infravermelho a fim de identificar os grupos modificados pela reação. O espectro da quitosana bruta e após a modificação epicloridrina, glicidol e glutaraldeído são apresentados na **Figura 26** a, b, c e d, respectivamente. O espectro de quitosana apresentou bandas semelhantes aos trabalhos já relatados na literatura (SHIGEMASA et al., 1996; YE et al., 2005; KLEIN et al., 2012). Uma banda característica presente no espectro da quitosana bruta está em 1640 cm^{-1} , que está relacionada com vibrações dos grupos N-H e O-H nos polímeros. As três estratégias de modificação apresentaram bandas diferentes da quitosana bruta, indicando que houve reação química. O espectro da modificação com epicloridrina apresentou aumento na banda em torno de 1640 cm^{-1} , correlacionado com a formação de grupos aldeídos na estrutura do suporte após a modificação química. Outra característica da formação de grupos aldeídos é a banda presente no espectro da quitosana modificada com glutaraldeído, em torno de 1.060 cm^{-1} . Entre $2000 - 2400\text{ cm}^{-1}$ houve o aparecimento de uma banda no espectro de FTIR no material em todas as estratégias de modificação. Essa banda é identificada como característica de uma ligação tripla presente em alcinos. Visto que as reações estudadas no presente trabalho não levam à formação de tal ligação, não foi possível identificar esta banda, sendo característica da quitosana após a modificação.

Figura 26 – Espectros de infravermelho da quitosana bruta (a) e quimicamente modificada com epiclórídina (b), glicidol (c) e glutaraldeído (d).

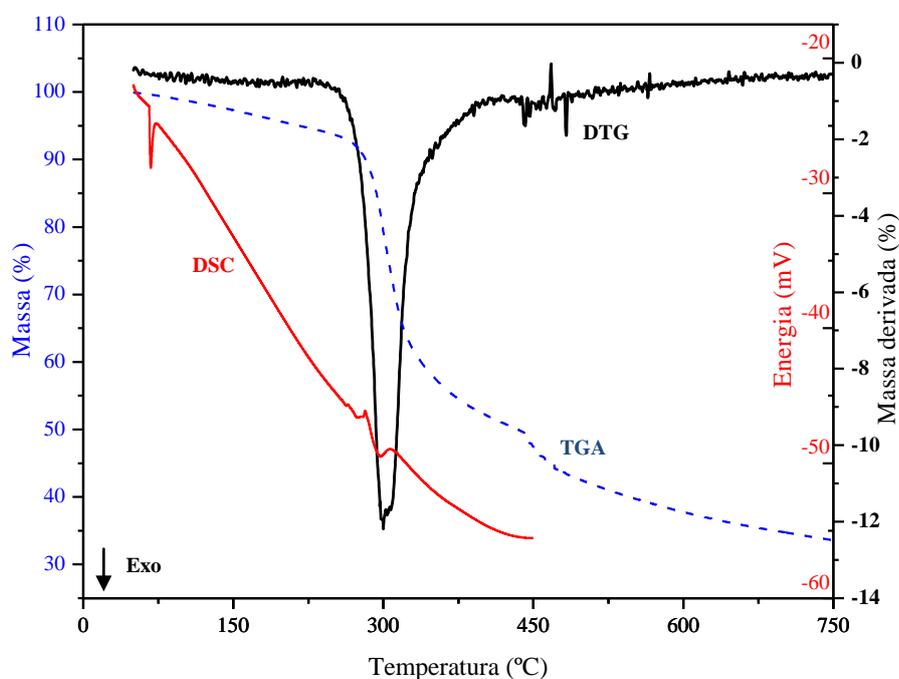


4.4.2. Caracterização térmica da quitosana quimicamente modificada por TGA e DSC

A quitosana apresentou três estágios de degradação, de acordo com o termograma da Figura 27. No primeiro estágio de aquecimento na faixa de 50 a 260 °C ocorre uma perda de aproximadamente 20% da massa inicial. Um decréscimo de 40% ocorreu no segundo estágio, entre 250 e 300 °C e no terceiro e último estágio, de 300 a 750 °C houve uma diminuição de aproximadamente 70% de massa em relação à massa inicial. A perda de massa no primeiro estágio de aquecimento está relacionada com a desidratação do polímero, devido moléculas de água estariam associadas por meio de ligações de hidrogênio das hidroxilas presentes na molécula de quitosana (MUKOMA et al., 2004). Dessa forma, os grupos adicionados à estrutura do polímero podem transformá-lo em uma estrutura mais hidrofóbica, que fará com que a perda de massa no primeiro estágio seja menor ou mesmo nula. A curva de DSC da amostra de quitosana

bruta indica três eventos térmicos, sendo o primeiro e terceiro eventos exotérmicos, e o segundo evento endotérmico. Esses eventos podem ser relacionados com os três estágios de perda de massa presentes na curva de TGA, indicando que o primeiro estágio pode estar relacionado às moléculas de água associadas à estrutura do polímero, apresentando maior variação de energia. Os demais estágios estão relacionados com a decomposição do polímero em função da temperatura, ocasionados por eventos como distorção estrutural da cadeia polimérica e rompimento de ligações intramoleculares.

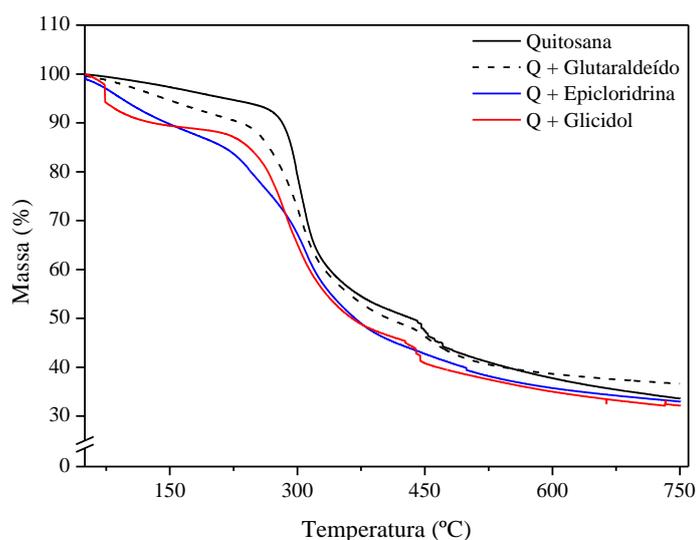
Figura 27 – Curvas da perda de massa em função da temperatura (TGA), derivada da perda de massa (DTG) e variação de energia em relação à temperatura (DSC) da quitosana bruta realizado em atmosfera de N₂.



Comparando as curvas de TGA da quitosana bruta e de seus derivados, nota-se que os derivados quitosana são menos hidrofóbicos do que a quitosana sem modificação. A perda de massa no primeiro estágio foi maior para as modificações com epiclorigrina, cerca de 30%, como mostrado na Figura 28. A modificação com glicidol apresentou comportamento térmico bastante particular comparado às outras amostras, indicando que tal modificação afeta a característica térmica do polímero, tornando-o menos hidrofóbico, apresentando forte tendência de perda de massa no primeiro estágio, que possivelmente está relacionado com a perda de moléculas de água associadas ao

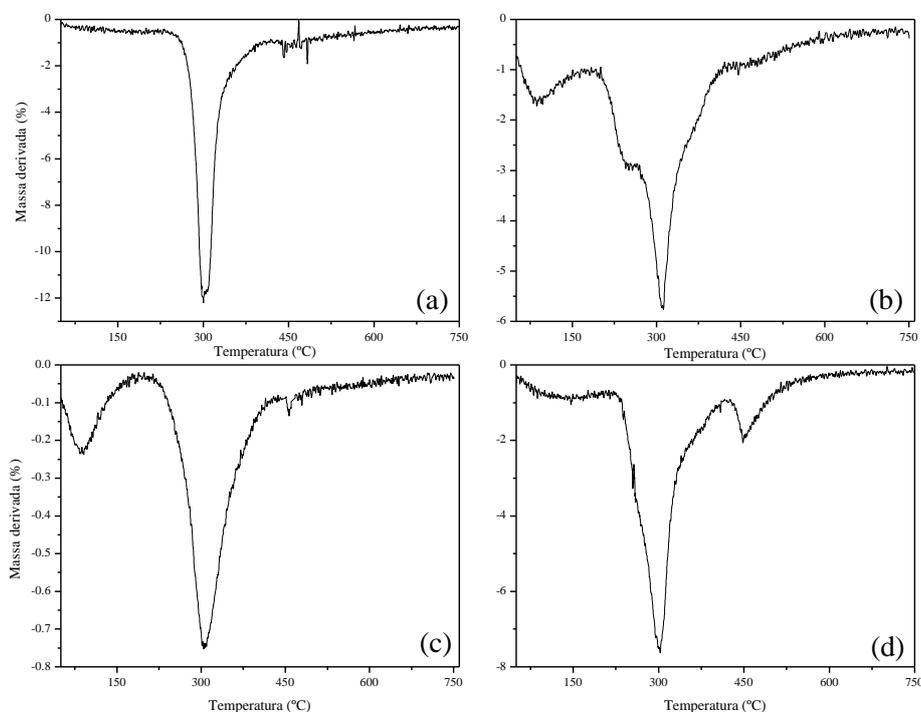
polímero. É possível observar a alta estabilidade térmica da quitosana bruta e de seus derivados em temperaturas inferiores a 100°C, podendo ser amplamente utilizada como suporte pra imobilização de enzimas, que atuam geralmente abaixo dessa temperatura (KLEIN et al., 2012).

Figura 28 – Termograma da quitosana bruta e suas modificações realizado em atmosfera de N₂, de 50 a 750 °C a 15 °C·min⁻¹.



A diferença no comportamento térmico da quitosana após as diferentes modificações foi mais bem diferenciada a partir da primeira derivada da curva termogravimétrica (DTG). A Figura 29 mostra a primeira derivada da perda de massa das amostras de quitosana bruta e quimicamente modificada.

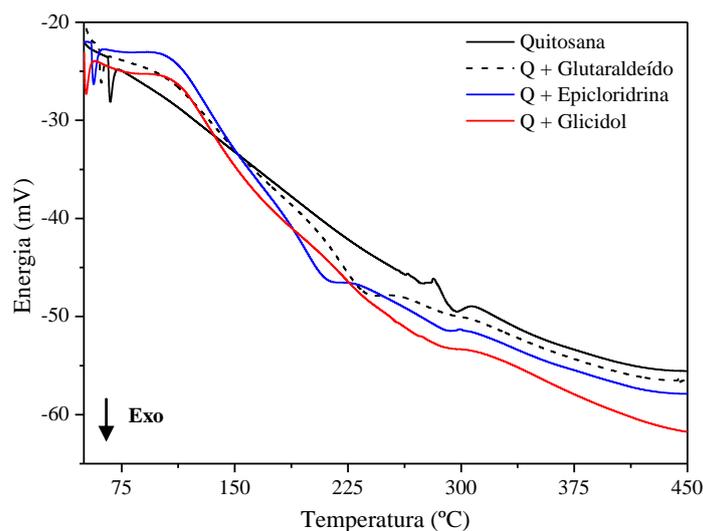
Figura 29 – DTG das amostras de quitosana bruta (a), quitosana modificada com epícloridrina (b), quitosana modificada com glicidol (c) e quitosana modificada com glutaraldeído (d).



A partir desses dados é possível observar que as modificações químicas realizadas na estrutura do polímero levaram a um comportamento térmico bem distinto. A reação com glicidol e epícloridrina causou uma perda de massa muito diferente, na qual a DTG dessas amostras apresentaram dois picos referentes à diminuição de massa em relação à temperatura. A reação com esses agentes levaram a um comportamento distinto de perda de massa em relação ao primeiro estágio, no qual houve perda de massa significativa. Isso pode indicar uma maior afinidade por moléculas de água, devido esses picos estarem próximos a 100 °C, indicando que o polímero se tornou menos hidrofóbico do que a quitosana bruta. A modificação química com glutaraldeído apresentou pico de variação de massa a 450 °C, sendo este uma característica particular desse tipo de estratégia de modificação. A partir dos dados DSC, também podemos verificar as mesmas características térmicas observadas pelo DTG, inclusive o evento exotérmico se iniciando a 450 °C na amostra de quitosana quimicamente modificada com glutaraldeído. O glutaraldeído pode agir como agente reticulante entre as cadeias poliméricas da quitosana, inter cruzando-as e aproximando as moléculas. Devido a esse

efeito, maior temperatura pode ser requerida distorcer essa reticulação, o que justifica o pico em 450°C no DTG e o pico exotérmico na mesma temperatura nos resultados de DCS Figura 30.

Figura 30 – DSC das amostras de quitosana bruta e quimicamente modificadas analisadas em atmosfera dinâmica de N₂ de 50 – 450 °C e 15 °C·min⁻¹.



4.4.3. Análise da área superficial total por BET

A área superficial da quitosana bruta e quimicamente modificada foi avaliada, a fim de determinar qual o melhor suporte com maior área de carregamento proteico. O método de BET (Brunauer-Emmet-Teller) foi empregado em atmosfera de nitrogênio a 77 K. A Tabela 4 apresenta os valores obtidos da área superficial total das amostras.

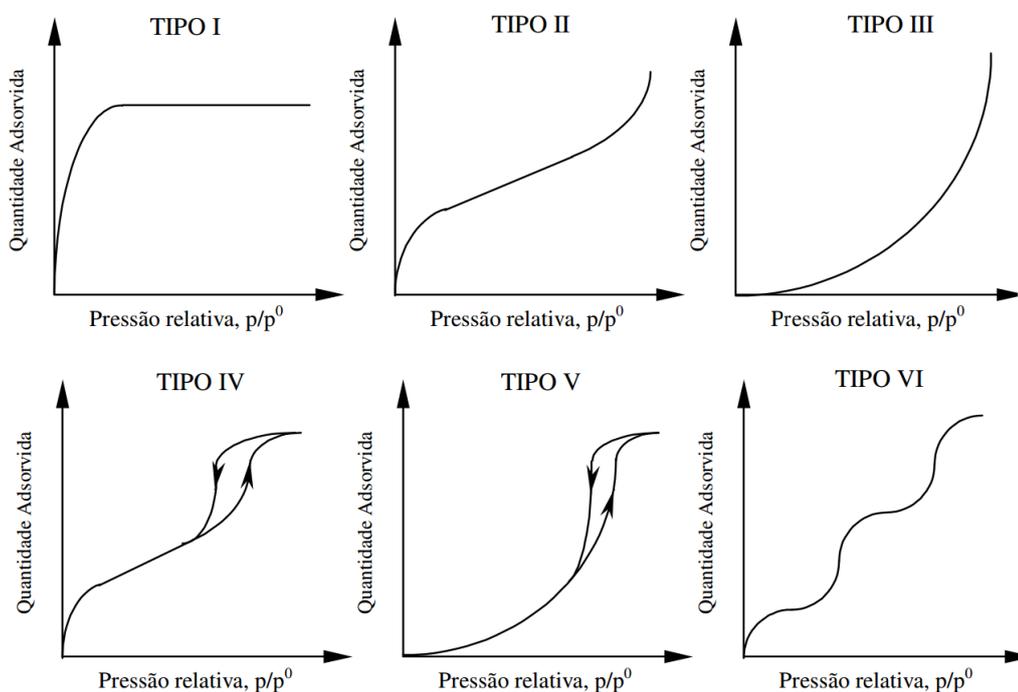
Tabela 4 – Valores de área superficial total e da quantidade de gás adsorvida a partir da técnica BET da quitosana bruta e quimicamente modificada.

Amostra	Área superficial total (m ² ·g ⁻¹)	Quantidade de gás adsorvida (cm ³ ·g ⁻¹)
Quitosana bruta	0,040	0,644
Quitosana + Epicloridrina	0,004	0,124
Quitosana + Glicidol	0,018	0,234
Quitosana + Glutaraldeído	0,039	0,639

A partir desses dados é possível observar que a modificação química realizada na estrutura da quitosana modificou a área superficial do polímero, principalmente quando modificada com epiclorigrina e glicidol. Essa modificação causou diminuição na área superficial total e, conseqüentemente, menor adsorção na quantidade de gás adsorvida. A modificação com glutaraldeído não apresentou alteração significativa na área superficial do polímero, sendo muito semelhante à quitosana sem modificação.

A adsorção de gás aumenta com o aumento da área superficial do material e partir das isotermas de adsorção podemos pré-determinar o tipo de poros presentes na amostra de acordo com as normas da I.U.P.A.C. (International Union of Pure and Applied Chemistry), como apresentado na Figura 31. A isoterma do tipo I está relacionada à adsorção em materiais que apresentam microporos. O tipo II é a isoterma característica de sistemas não porosos. A isoterma tipo III e a histerese tipo V estão presentes em sistemas mesoporosos e macroporosos que apresentam interações muito fracas com o adsorbato. Na histerese tipo IV a dessorção não apresenta o mesmo perfil da adsorção, característica observada devido a presença de finos capilares (JORGE, 2006).

Figura 31 – Classificação das isotermas de adsorção com adsorbato gasoso.

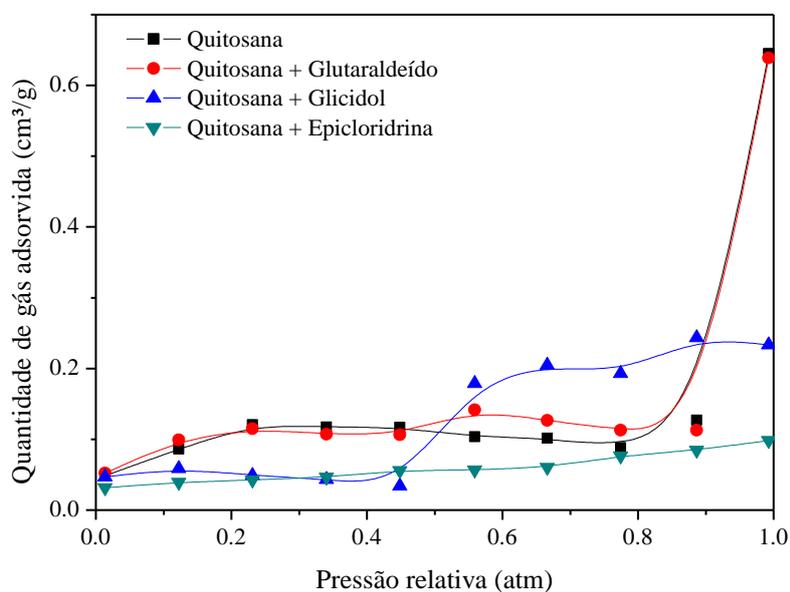


Fonte: (JORGE, 2006).

Com base na classificação da I.U.P.A.C. citada acima, podemos pré-classificar o tipo de superfície da quitosana bruta e quimicamente modificada. As isotermas de

adsorção são apresentadas na Figura 32. A quitosana bruta e quimicamente modificada com glutaraldeído apresentaram isoterma de adsorção semelhantes, já que a área superficial total não foi significativamente alterada. A característica desse tipo de adsorção está relacionada a presença de poros maiores (mesoporos e macroporos) de acordo com a isoterma III. A modificação da quitosana com glicidol apresentou alteração no tipo de poro do polímero, passando de um sistema mesoporoso a um não poroso. Essa característica está relacionada com a área superficial total, que foi diminuída após tal modificação. Mesmo todas as rotas de modificações ocorrerem com excesso de reagentes, o glicidol pode atuar como um agente reticulante, inter e entrecruzando as cadeias de quitosana a partir da reação nas hidroxilas do polímero e aproximando-as, o que provoca a diminuição na área superficial e no tamanho dos poros, mas também pode promover a formação de grupos aldeídos para a imobilização de enzimas. O mesmo foi observado para a modificação com epicloridrina, que quase não apresentou adsorção de adsorbato devido atuar com agente reticulante também, indicando menor área superficial e com poros de tamanhos não significativos.

Figura 32 – Isotherma de adsorção da quitosana bruta e quimicamente modificada.

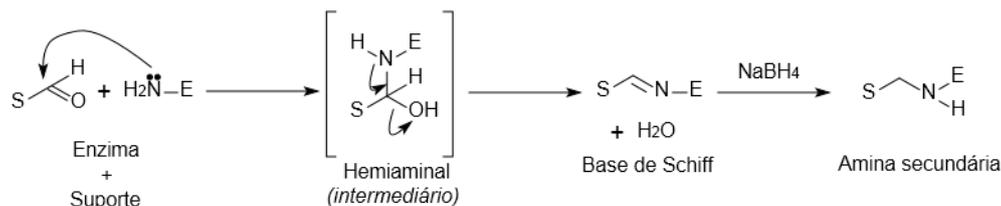


4.4.4. Imobilização de lipases em quitosana quimicamente modificada

A quitosana quimicamente modificada a partir das diferentes estratégias foi avaliada como suporte para imobilização irreversível de lipases. O método de

imobilização empregado foi a partir da ligação covalente entre os grupamentos amino presentes na estrutura dos aminoácidos constituintes da enzima e os grupos aldeídos adicionados ao suporte. A Figura 33 apresenta a formação da ligação unipontual ocorrida entre as lipases e os suportes de quitosana modificada. A reação se inicia a partir de uma adição nucleofílica da amina sob o carbono da carbonila presente na estrutura do suporte, levando a formação de um intermediário hemiaminal. A partir de um rearranjo intramolecular, ocorre a liberação de uma molécula de água e uma ligação de base de Schiff é formada. Pela adição de agente redutor (NaBH_4) é formada uma amina secundária, estabilizando a ligação da imobilização.

Figura 33 – Mecanismo geral de imobilização covalente unipontual de lipases a partir do grupamento amino terminal presente na estrutura da enzima e o grupo amino adicionado à estrutura do suporte quimicamente modificado. Legenda: S: suporte; E: enzima.



Fonte: elaborada pelo autor.

O teste de imobilização foi realizado pela incubação da enzima solúvel com o suporte, contendo uma carga máxima de 20mg de proteína por grama de suporte durante o tempo máximo de 72 horas. Após o término do tempo de incubação, foi realizada a dosagem de proteína total presente no sobrenadante (enzimas solúveis) e foi constatado rendimento inferior a 2% para todos os suportes testados. Considerando todas as caracterizações realizadas com o suporte quimicamente modificado a partir da quitosana, o principal fator responsável pelo baixo rendimento de imobilização pode ser devido à baixa área superficial total do polímero bruto. Tal característica é fundamental para a imobilização de enzimas, já que um suporte com alta área superficial disponível é capaz de obter alto carregamento enzimático. Contudo, os suportes testados foram classificados como insuficiente em termos de área superficial, para imobilização de lipases, já que a quitosana 85% desacetilada utilizada possui área superficial total de $0,04 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Essa área superficial pode ter levado ao baixo rendimento de ativação do

suporte, devido conter baixa concentração de grupos disponíveis em sua estrutura para reagirem, e também ao baixo índice de imobilização, tornando inviável sua aplicação para determinado fim.

4.5. CONCLUSÃO

A modificação química da quitosana foi comprovada, porém, o polímero bruto apresentava área superficial pequena que pode ter sido insuficiente para ativação e imobilização, não apresentando resultados significativos nesses aspectos. A modificação com epícloridrina e glicidol apresentou características térmicas semelhantes de acordo com o TGA, que aumentou a hidrofobicidade do polímero, perdendo mais massa no primeiro estágio, característica da desidratação. A mesma semelhança foi observada na área superficial total, que após a modificação com esses dois agentes, mostrou uma diminuição na área superficial e no tipo dos poros, tornando o polímero, ao que tudo indica, não poroso. Já a modificação com glutaraldeído apresentou semelhanças à quitosana bruta, com características térmicas pouco alteradas e área superficial sem modificação significativa. Dessa maneira, as modificações químicas na estrutura da quitosana apresentaram alterações na área superficial e características térmicas, porém os suportes produzidos a partir da modificação não apresentaram bons resultados para imobilização de lipases, devido a sua pequena capacidade de carregamento proteico provavelmente em função da baixa área superficial obtida.

5. CAPÍTULO III

***Avaliação da irradiação de ultrassom
na atividade transesterificante de lipases imobilizadas e
comparação com os produtos obtidos pela catálise química.***

5.1. INTRODUÇÃO

A transesterificação é uma reação de troca dos grupos ésteres presente nas moléculas de triglicerídeos com o radical do álcool utilizado no processo. Contudo, no processo reacional há uma rota indesejável, a reação de saponificação, que ocorre quando há traços de água. Assim, para bons rendimentos de transesterificação, reagentes com alto teor de pureza são utilizados para minimizar as chances de reação de saponificação. Pensando no contexto de biotransesterificação, a imobilização de lipases é uma necessidade reacional, pois as mesmas se apresentam em solução aquosa quando estão solúveis. Porém, um fator que pode afetar o processo de transesterificação enzimática é a utilização de suportes com características polares, que podem reter água durante o processo de imobilização e quando aplicados na biotransesterificação, levam a formação indesejada de sabão. Devido a isso, é interessante a utilização de suportes altamente apolares para aplicação na produção de biodiesel, minimizando as possibilidades da indesejável reação de saponificação.

Com base nesse contexto, o presente capítulo teve como objetivo principal o estudo do efeito do ultrassom na atividade de transesterificação de diferentes lipases imobilizadas em um suporte hidrofóbico, visando avaliar os diferentes rendimentos a partir dos óleos mais comuns na produção de biodiesel (soja, girassol e milho), comparar e identificar os produtos obtidos com os produtos da mesma reação na presença de um catalisador químico.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilizar lipases comerciais de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* por adsorção hidrofóbica;
- Avaliar a atividade das lipases imobilizadas na transesterificação dos óleos vegetais de milho, soja e girassol para obtenção de biodiesel etílico;
- Comparar a atividade enzimática das lipases imobilizadas com a Lipozym 435 adotada como referência;
- Avaliar a utilização da irradiação de ultrassom na síntese de biodiesel por biotransesterificação do óleo de soja;
- Caracterizar os produtos obtidos pela catálise enzimática por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e compará-los com os produtos obtidos via catálise química.

5.3. PROCEDIMENTOS

5.3.1. Imobilização por adsorção hidrofóbica

Para a imobilização hidrofóbica na resina C18 (Sepabeads C18), 10 mL de extrato enzimático foi adicionado a 1,0 g de suporte em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0, com carga máxima de 25 mg/g, por tempo máximo de 60 minutos. O rendimento de imobilização foi baseado na quantidade de proteína (mg) adsorvida sob o suporte, a partir do método de Bradford (item 3.4). Após a imobilização o derivado foi lavado com acetona para retirar todo vestígio de água, filtrado a vácuo e armazenado a -4 °C.

5.3.2. Produção de ésteres etílicos (biodiesel)

5.3.2.1. Reação de transesterificação via catálise enzimática

Para o ensaio padrão de transesterificação foi utilizado óleo de soja e álcool etílico anidro, com razão molar 1:6 (óleo:álcool) e 10% de catalisador (lipase imobilizada) em relação ao meio reacional, sob agitação de 150 rpm. A temperatura da reação foi de 45 °C e utilizou-se *n*-hexano como solvente na reação a uma razão 1:1,5 (óleo:solvente). O tempo de incubação da reação variou-se de 24 a 168 horas, no qual alíquotas de 500 µL foram retiradas a cada 24 h para análises por cromatografia em fase gasosa, a fim de determinar o tempo mínimo necessário para maior rendimento da reação.

5.3.2.2. Recuperação e reutilização do biocatalisador

A recuperação dos derivados do meio reacional foi realizada por filtração a vácuo. Após a filtração, o derivado foi lavado com *n*-hexano, a fim de retirar o excesso do subproduto glicerol, e seco à 30°C. A atividade do derivado reutilizado na reação de transesterificação foi determinada reutilizando o mesmo e quantificando seus produtos.

5.3.3. Reação de transesterificação via catálise química

A transesterificação ocorreu em um balão de fundo redondo de 250 mL, contendo 0,11 mols de cada óleo (girassol, milho e soja) e 0,66 mols de etanol anidro 99,8% na presença de 1% de (NaOH). A mistura foi aquecida a 60 °C em uma manta de aquecimento sob agitação durante duas horas. Após a reação, a mistura foi rotoevaporada para extrair o excesso de etanol utilizado e deixada em repouso por 24h em um funil de decantação. Após a separação total das fases (fase inferior: subprodutos polares; fase superior: produtos apolares – ésteres) a fase apolar foi lavada separadamente com água e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos à 25 °C para

retirada de todo catalisador. A fase superior após a centrifugação foi separada e armazenada para análise quantitativa.

5.3.4. Análise dos produtos obtidos

5.3.4.1. Cromatografia de camada delgada

A análise qualitativa dos ésteres etílicos produzidos a partir da reação de transesterificação do óleo de soja com as enzimas imobilizadas em quitosana quimicamente modificada foi realizada em placa de sílica (Sigma-Aldrich®) de tamanho 6 x 2,8 cm. 25µL das amostras retiradas do meio reacional após 168 horas de reação foram misturadas com 100 µL de hexano e centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos. Como padrão foi utilizado a mesma quantidade de óleo de soja misturado ao hexano, e como fase móvel foi utilizado uma mistura de acetato de etila, ácido acético e hexano à 10, 1 e 90%, respectivamente. Em um béquer contendo um papel filtro no fundo do mesmo diâmetro do recipiente, aproximadamente 10 mL da solução fase móvel foi adicionada e a placa de sílica foi colocada no béquer, contendo 0,8µL de amostra. Após a eluição da fase móvel por toda a placa, a sílica foi rapidamente aquecida para evaporação do solvente e em seguida colocada em um recipiente contendo iodo. A sílica foi deixada na presença de iodo até que atingisse a revelação das bandas dos produtos.

5.2.4.2. Quantificação dos ésteres formados cromatografia gasosa (GC-FID)

Para quantificação dos ésteres por GC-FID (Perkin-Elmer, Clarus 680), 1 µL de cada amostra foi diluído apropriadamente e injetado em cromatógrafo utilizando coluna capilar FFAP (Ácido nitrotereftálico modificado com polietileno glicol) para separação e quantificação dos ésteres produzidos. A temperatura do forno foi de 160 a 180 °C com taxa de aquecimento 4 °C·min⁻¹ e com posterior aumento para 230 °C com taxa de aquecimento de 6 °C·min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C, com gás de arraste Nitrogênio (1,0 mL·min⁻¹) (TORRES et al., 2008). A quantificação dos ésteres foi baseada em curvas de calibração utilizando ésteres com pureza acima de 98%, como o linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila e estearato de etila. Como padrão interno, foi utilizado o éster heptadecanoato de metila (HDM) O rendimento (R) das reações de síntese foi definido como a massa total de ésteres obtidos (Mt) em relação à massa teórica esperada (Me) na qual foi determinado a partir da

Equação 4, (URIOSTE et al., 2008).

$$Me = (Mo \cdot MMe) / MMA \text{ (a)}$$

$$Mo = Ca \cdot Mi \text{ (b)}$$

$$R = (Mt/Me) \cdot 100 \text{ (c)}$$

Equação 4 – Equações utilizadas para o cálculo do rendimento dos ésteres produzidos a partir da reação de transesterificação: (a): determinação da massa teórica esperada (Me); Eq. (b): determinação da massa inicial de triglicerídeos (Mo); Eq. (c): determinação do rendimento da síntese (R); MMe: massa molar do éster; MMA: massa molar do ácido graxo; Ca: concentração de ácido graxo; Mi: massa inicial de óleo utilizado.

5.3.4.3. Identificação dos produtos por espectrometria de massas (GC-MS)

A análise para identificação dos compostos foi realizada pela diluição apropriadamente das amostras em n-heptano e, 0,1 µL da diluição foi injetada diretamente em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (Perkin Elmer® Clarus™ 600). Para a injeção, o detector foi aquecido à 220 °C e utilizou-se uma coluna Elite-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com uma rampa de aquecimento iniciando a 35 °C mantida por 10 minutos seguido de aquecimento até 200 °C com taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹. A injeção foi feita manualmente e após a corrida foi realizado uma busca na biblioteca do software com a finalidade de identificar os diferentes ésteres éticos e demais produtos produzidos a partir da catálise química e enzimática.

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. Imobilização hidrofóbica de lipases

As lipases de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* foram imobilizadas por adsorção em resina hidrofóbica (C18 Sepabeads) a partir da incubação do suporte no extrato enzimático por um período máximo de 2 horas. Após o período de incubação, foi realizada a dosagem de proteína total no sobrenadante e calculada a quantidade de

proteína adsorvida (carga do suporte) como apresenta a Tabela 5. Após a imobilização, as enzimas imobilizadas foram filtradas, lavadas com acetona e armazenadas a 4 °C para posterior aplicação na transesterificação dos óleos vegetais.

Tabela 5 – Rendimento de imobilização de lipases em C18 e carga dos derivados após 2 horas de incubação enzima-suporte.

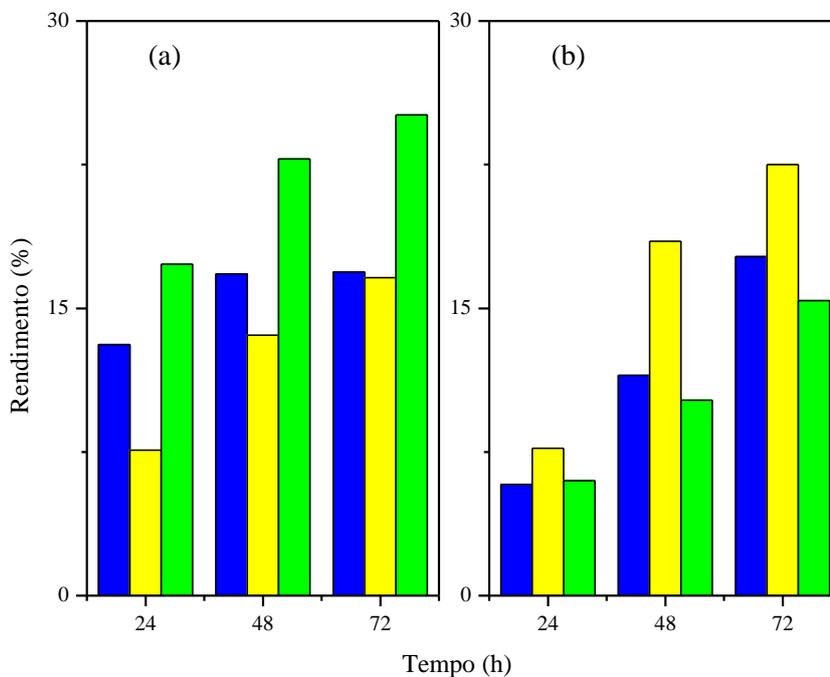
<i>Origem da lipase</i>	<i>Rendimento de imobilização (%)</i>	<i>Carga do suporte (mg·g⁻¹)*</i>
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	98,4	19,1
<i>Rhizomucor miehei</i>	87,5	17,5

*mg de proteína por g de suporte

5.4.2. Transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel etílico

As lipases imobilizadas em suporte hidrofóbico foram avaliadas quanto a sua atividade transesterificante na produção de ésteres etílicos derivados de diferentes fontes vegetais de triglicerídeos e avaliadas com a atividade da enzima imobilizada comercialmente Lipozym 435. A mesma reação foi realizada na presença de catalisador químico e tal rendimento foi quantificado com rendimento máximo de produção, já que a catálise química apresenta altos índices de produção. A biotransesterificação catalisada pelas lipases imobilizadas ocorreu por um período máximo de 72 horas utilizando os óleos de soja, girassol e milho e os rendimentos são apresentados na Figura 34.

Figura 34 – Cinética de produção de ésteres etílicos a partir da biotransesterificação dos óleos de girassol (azul), milho (amarelo) e soja (verde) catalisada por lipases imobilizadas: a) TLL, 3 b) Lipozym 435.

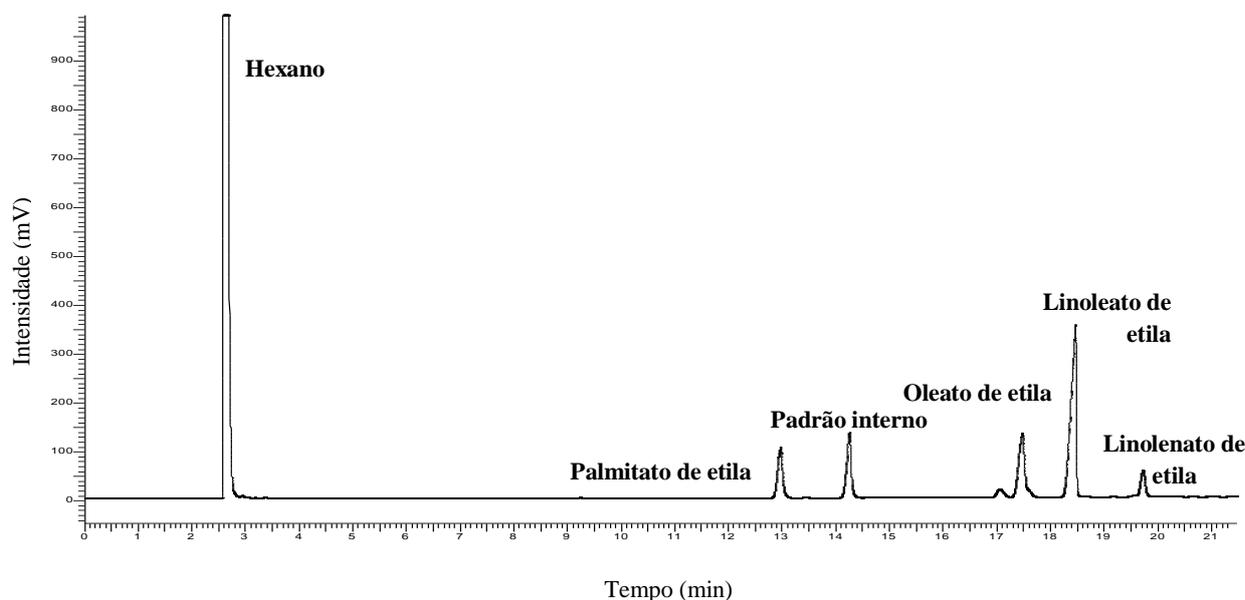


A lipase de *Rhizomucor miehei* apresentou atividade transesterificante muito baixa, com resultados irrelevantes de rendimento de 2,0; 1,9 e 2,2% para os óleos de girassol, milho e soja, respectivamente. As duas lipases (TLL e 435) testadas apresentam atividades semelhantes, porém para fontes de triglicerídeos diferentes. A enzima TLL apresentou rendimento de reação de 25% para o óleo de soja após 72 horas de reação, enquanto da Lipozym 435 teve rendimento semelhante (23%), porém para a reação com o óleo de milho. A composição dos óleos utilizados está apresentada na Tabela 3. Todos os óleos que as enzimas apresentaram maior rendimento de transesterificação possuem, predominantemente, ácidos graxos insaturados na sua composição. A composição do óleo de girassol não se difere muito da dos demais, porém o mesmo contém em sua composição quantidade relativamente significativa de ácido linolênico em relação aos outros óleos testados. É notável também que a composição do óleo de girassol possui, de um modo geral, altas quantidades dos ácidos graxos citados na Tabela 3, porém, foi a fonte de triglicerídeos com menor rendimento na catálise enzimática.

A partir do cromatograma apresentado na Figura 35 podemos observar que o óleo de soja utilizado apresenta quantidade significativa de ácido linoleico e a enzima produziu o produziu em menor quantidade comparada aos demais, já que o óleo de soja é composto por baixa concentração de ácido linoleico.

Avaliando de um modo geral a biotransesterificação catalisada por TLL e comparando as fontes de triglicerídeos mais utilizadas na produção industrial de biodiesel, é possível observar que o óleo de soja apresentou maior potencial de produção de ésteres etílicos e, devido a isso, foi o óleo selecionado para os demais experimentos.

Figura 35 – Cromatograma dos ésteres produzidos por biotransesterificação catalisada por TLL imobilizada em C18 após 24 horas de reação.



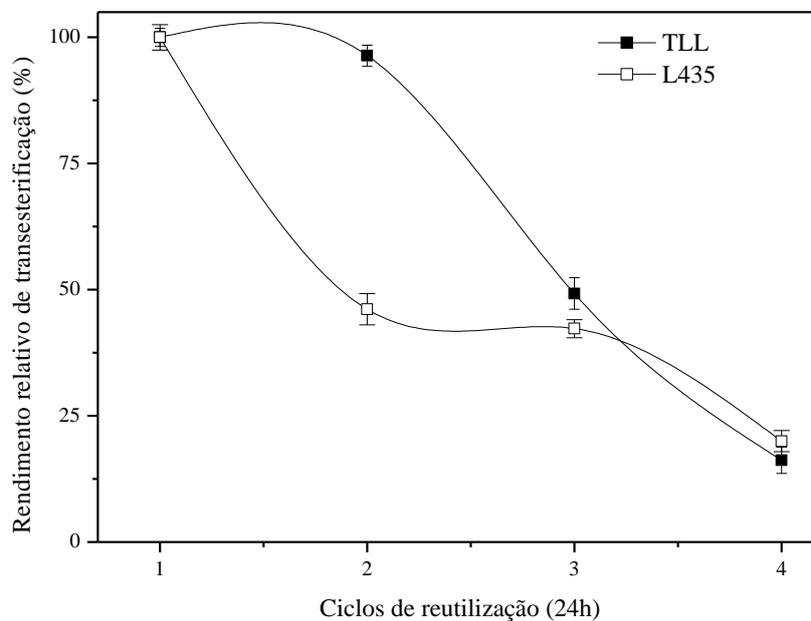
5.4.3. Reutilização do biocatalisador

A lipase TLL imobilizada no suporte hidrofóbico foi submetida à avaliação da atividade de transesterificação na reação com o óleo de soja a fim de investigar um dos princípios principais da imobilização de enzimas que é a reutilização do biocatalisador. Após cada ciclo reacional de 24 horas, o derivado foi filtrado do meio e lavado com acetona e hexano para retirar qualquer vestígio de reagentes ou produtos que possam interagir com o suporte. A Figura 36 apresenta os ciclos reacionais de 24 horas da TLL e da L435. A TLL apresentou maior resistência aos ciclos reacionais comparado com a L435, e após quatro ciclos ambas as enzimas apresentaram cerca de 20% de rendimento na produção dos ésteres. Uma característica importante observada

para a TLL imobilizada foi que o processo de imobilização, além de proporcionar a reutilização da enzima, auxiliou na estabilidade da mesma, que ao final do segundo ciclo ainda apresentava 96% da sua atividade. O tempo de meia-vida para TLL foi superior ao da L435, que no segundo ciclo já apresentava rendimento inferior a 50% comparado com o inicial.

A imobilização por adsorção hidrofóbica consiste num processo reversível de imobilização, na qual a enzima pode ser dessorvida totalmente por agentes que causam a dessorção, como surfactantes, ou devido outros fatores no meio reacional, como agitação, filtração e lavagem. Levando em conta que a interação hidrofóbica entre a lipase e o suporte é uma interação intermolecular relativamente fraca, o processo de filtração e lavagem após cada ciclo pode ter proporcionado a dessorção da enzima, diminuindo produção dos ésteres no ciclo seguinte após a lavagem. Pensando nesse aspecto, a imobilização covalente se apresenta como uma vantagem operacional em relação à imobilização por adsorção devido ser um processo de imobilização irreversível no qual a enzima não é dessorvida. Contudo, a imobilização por adsorção é um processo que tem como vantagem a simplicidade e rapidez de imobilização, muito utilizado para as lipases sendo capaz de imobilizar e estabilizar a enzima na sua conformação ativa e aberta, além de purificá-las da presença de outras proteínas que não apresentam sítios hidrofóbicos em sua estrutura, aumentando assim sua atividade específica.

Figura 36 – Ciclos de reutilização das enzimas na produção de ésteres etílicos a partir do óleo de soja. A reação foi realizada por 24 horas à 45°C na presença de n-hexano como solvente.



5.4.4. Avaliação da aplicação de ultrassom na biotransesterificação

A aplicação de ultrassom é uma opção para aumentar o índice de produção devido promover maior homogeneização do meio e, conseqüentemente, maior colisão entre as moléculas dos reagentes, acelerando a reação. A fim de avaliar o efeito da cavitação na atividade das lipases, ciclos de 24 horas foram realizados utilizando 10% da potência total do sonicador com pulsos de 15 segundos a cada 15 minutos. A Tabela 6 apresenta os resultados da reação de transesterificação do óleo de soja catalisada pelas lipases na presença do ultrassom.

Tabela 6 – Rendimento de produção total dos ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de soja catalisada por lipases à 45°C após 24 horas de reação sem e com 10% irradiação de ultrassom.

Origem da lipase	Rendimento de conversão (%)*	
	Reação sem US	Reação com US
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	17,2	24,1
<i>Lipozym 435</i>	5,9	25,7

*rendimento baseado na produção total de estes etílicos.

O uso da irradiação de ultrassom no processo de transesterificação causou um aumento na produção total de ésteres etílicos para a reação catalisada com ambas as lipases testadas, porém com rendimentos diferentes. Aumento significativo de 400% foi observado no rendimento de transesterificação da L435 quando sonicado. O mesmo efeito também foi observado para a TLL, porém com menor eficiência. O ultrassom durante a catálise utilizando o derivado de TLL imobilizada em C18 causou um ruptura do suporte, que pode ter levado à dessorção das enzimas imobilizadas na forma ativa, inativando-as e, conseqüentemente, a baixa eficiência da irradiação de ultrassom.

5.4.5. Avaliação da seletividade enzimática na transesterificação em função de ultrassom.

As enzimas podem sofrer alterações na preferência e seletividade devido fatores como imobilização e condições reacionais. A Tabela 7 apresenta a relação dos principais ésteres produzidos a partir do óleo de soja e característicos do biodiesel. O éster produzido em maior quantidade para todas as reações realizadas foi o linoleato de etila (18:2), já que este está presente em maior concentração no substrato. Efeito semelhante do ultrassom foi observado na atividade das duas lipases, aumentando a produção de um único éster específico. Para a TLL, a irradiação de ultrassom apresentou maior rendimento na produção de todos os ésteres, com exceção do éster linoleico (18:2). O mesmo efeito foi observado para a L435, porém com o principal aumento na produção do éster linolênico em relação aos outros ésteres. O uso de ultrassom pode modular a atividade enzimática, aumentando a produção de compostos que possuem sua matéria prima em menor quantidade, como o éster palmitato de etila derivado do ácido palmítico, substrato em menor quantidade no óleo de soja. A produção do éster linonenato de etila também foi beneficiada quando a reação enzimática ocorreu na presença de ultrassom, dobrando a sua produção quando a reação foi catalisada pela TLL.

A catálise enzimática foi superior em relação à produção de éster palmitato de etila e linolenato de etila do que a catálise química, apresentando maiores rendimentos na produção desses principais ésteres que constituem o biodiesel. As lipases em geral são atuam em substratos de cadeia longa saturada (16 carbonos) e, a presença insaturações em moléculas maiores pode dificultar o ataque do sítio ativo da enzima ao substrato, justificando o rendimento menor.

Tabela 7 – Produção (%) dos ésteres etílicos a partir da transesterificação química e enzimática do óleo de soja na presença e ausência de ultrassom (US).

Éster etílico	Ácido precursor	Composição no óleo de soja (%)	Catálise alcalina	Catálise enzimática			
				TLL-C18	TLL-C18 US	L435	L435 US
Palmitato (16:0)	Ácido palmítico	10,5	1,0	16,2	17,5	23,4	11,7
Oleato (18:1)	Ácido oléico	24,5	29,4	24,4	26,1	19,5	19,9
Linoneato (18:2)	Ácido linoléico	53,0	62,4	55,0	47,8	47,5	59,2
Linolenato (18:3)	Ácido linolênico	2,0	7,2	4,4	8,6	9,6	9,2

*rendimentos em % em relação à massa total de ésteres produzidos.

5.5. CONCLUSÃO

As lipases de *Thermomices lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* foram imobilizadas na resina hidrofóbica C18 com alto rendimento de imobilização em tempo relativamente curto, devido a sua alta hidrofobicidade torná-lo específico para enzimas com cadeias de aminoácidos apolares em sua estrutura, como no caso das lipases em geral. A RML não obteve bom índice de atividade transesterificante, ao contrário da TLL, que apresentou 25% de rendimento de transesterificação do óleo de soja após 72 horas de reação. A imobilização da TLL permitiu a reutilização da enzima por dois ciclos reacionais de 24 horas, com atividade enzimática praticamente inalterada, e queda para 20% após o quarto ciclo reacional. A TLL imobilizada em C18 mostrou-se mais estável em relação à atividade de transesterificação da L435. A atividade da TLL teve 40% de aumento na quando a reação ocorreu com ultrassom. A L435 também teve sua atividade aumentada, quase 400% de rendimento com ultrassom. Assim, a junção do processo de imobilização de TLL e a aplicação de ultrassom no meio reacional foi uma aplicação viável para a produção de biodiesel, sem encarecer ou dificultar o processo de produção de ésteres etílicos.

6. CAPÍTULO 4

Diferentes estratégias de imobilização e estabilização de lipases de Candida antarctica B e aplicação em reações enantiosseletivas e na produção de ômega-3

6.1. INTRODUÇÃO

As lipases de *Candida antarctica* B (CaLB) é um biocatalisador amplamente utilizado em diversos tipos de biotransformações devido a sua alta seletividade e atividade (IDRIS; BUKHARI, 2012). Muitos trabalhos na literatura apresentam várias aplicações de CaLB, como a imobilização e melhoria dos testes de estabilização (TRODLER; PLEISS, 2008; CRUZ et al., 2009; BARBOSA et al., 2012), a transesterificação para a produção de ésteres (FORESTI; FERREIRA, 2007; SÉVERAC et al., 2011), reações enantiosseletivas e de seletividade (MATEO; FERNÁNDEZ-LORENTE; et al., 2000; WIECZOREK et al., 2011) e síntese de poliéster (CHEN et al., 2008; IDRIS; BUKHARI, 2012).

Os procedimentos descritos nesse capítulo foram realizados durante o estágio de pesquisa no exterior no Instituto de Catálises e Petroquímica do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC) da Universidade Autônoma de Madrid (UAM) – Espanha, de setembro de 2013 a fevereiro de 2014, sob a supervisão do Prof. Dr. José Manuel Guisán. O estágio de pesquisa no exterior teve com objetivo principal o aperfeiçoamento e aprendizagem de diferentes técnicas de imobilização de lipases e aplicação desses derivados em processos biotecnológicos.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a imobilização de lipases de *Candida antarctica* em suportes hidrofóbicos, iônicos e covalentes;
- Avaliar a estabilidade térmica e em etanol dos derivados ativos;
- Estudar o efeito de solventes orgânicos e surfactantes na atividade e seletividade das lipases imobilizadas na hidrólise do óleo de peixe;
- Avaliar a enantiosseletividade das lipases imobilizadas na hidrólise tendo como substrato um composto quiral.

6.3. PROCEDIMENTOS

6.3.1. Quantificação da atividade enzimática por hidrólise de substrato cromogênico

Os ensaios de atividade das lipases foram realizados como descrito no item 3.3.3.

6.3.2. Proteína total

A quantificação da proteína total foi realizada conforme descrito no item 3.3.4.

6.3.3. Diferentes estratégias de imobilização

Para a imobilização de lipases foram testados os métodos reversíveis (adsorção hidrofóbica e iônica) e irreversíveis (ligação covalente) de imobilização. Para ambos os métodos de imobilização a proporção 1:10 enzima:suporte foram utilizados em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 para a imobilização reversível e em tampão bicarbonato de sódio 100 mM pH 10 para a imobilização covalente. O rendimento de imobilização foi determinado pela medida da concentração de proteínas e da atividade residual após o final do final da imobilização, de acordo com a Equação 2.

6.3.4. Estabilidade dos derivados

A termoestabilidade das lipases imobilizadas foi incubando os derivados em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 na proporção 1:10, derivado:tampão, realizada à 55 °C por um período máximo de 6 horas, comparado com a enzima solúvel incubada nas mesmas condições. Os derivados também foram avaliados quanto a sua estabilidade na presença de 50% de etanol à 25 °C, nas mesmas condições utilizadas para a termoestabilidade.

6.3.5. Efeito de solventes e surfactantes na atividade enzimática

Os melhores derivados foram submetidos a testes para avaliação da atividade na presença de surfactantes e solventes orgânicos, afim de avaliar o efeito desses agentes sob a atividade enzimática. Para isso, os derivados foram incubados separadamente em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 (razão 1:10 derivado:tampão) contendo diferentes concentrações de surfactantes (CTAB – Hexadecílico catiônico brometo de trimetil amônio), SDS – dodecil sulfato de sódio, Triton X-100) e solventes orgânicos (etanol, dioxano, DMSO – dimetilsulfóxido). A atividade inicial na ausência desses agentes foi considerada como 100% de atividade enzimática, e as demais atividades foram relativas à atividade inicial.

6.3.6. Inativação covalente e térmica dos derivados

Para avaliar a hiperativação das enzimas imobilizadas na presença do melhor agente testado, os derivados foram submetidos à inativação covalente, utilizando como agente inibidor D-*p*NP (dietil *p*-nitrofenil fosfato), e à inativação térmica à 55 °C. Ambos os ensaios foram realizados pela incubação dos derivados na ausência e presença do agente utilizado em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 (razão 1:10

derivado:tampão) à 55 °C para a inativação térmica e na presença de 1,0 µM do agente inibidor. A atividade do derivado foi monitorada até a determinação do tempo de meia vida da atividade da enzima imobilizada.

6.3.7. Hidrólise do óleo de peixe para a produção de ômega-3

A reação foi realizada em um sistema bifásico contendo 4,5 mL de ciclohexano, 5,0 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e 0,5 mL de óleo de peixe. O sistema foi incubado à 25 °C sob agitação suave, contendo 0,3 g de derivado com carga máxima de 20 mg de proteína por grama de suporte. A quantificação dos ácidos graxos produzidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando uma coluna hidrofóbica (C8 25 cm x 0,4 cm) tendo como fase móvel 80% acetonitrila, 19% água e 1% ácido acético em um fluxo de 1,0 mL·min⁻¹. Os produtos foram monitorados pela medida de absorvância a 215 nm.

6.3.8. Reação enantiosseletiva

A reação ocorreu em um contendo 5 mM do substrato quiral ((R,S)-metil éster mandélico) dissolvido em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 com 50 mg de derivado, com carregamento proteico máximo de 20 mg por grama de derivado. O rendimento total reacional foi quantificado por CLAE utilizando uma coluna hidrofóbica (C8 25 cm x 0,4 cm) e fase móvel contendo uma mistura de acetonitrila (35%) e tampão fosfato de amônio 10 mM (65%) com pH final de 2,3 e fluxo de 1,5 mL·min⁻¹. A eluição dos produtos foi monitorada de acordo com a absorvância a 225 nm. O excesso enantiomérico foi analisado pela eluição da amostra por uma coluna quiral OD-R. A fase móvel utilizada foi constituída por acetonitrila (5%) e tampão fosfato de amônio 10 mM (95%), pH 2,3 e fluxo de 0,5 mL·min⁻¹, com leitura da absorvância a 210 nm.

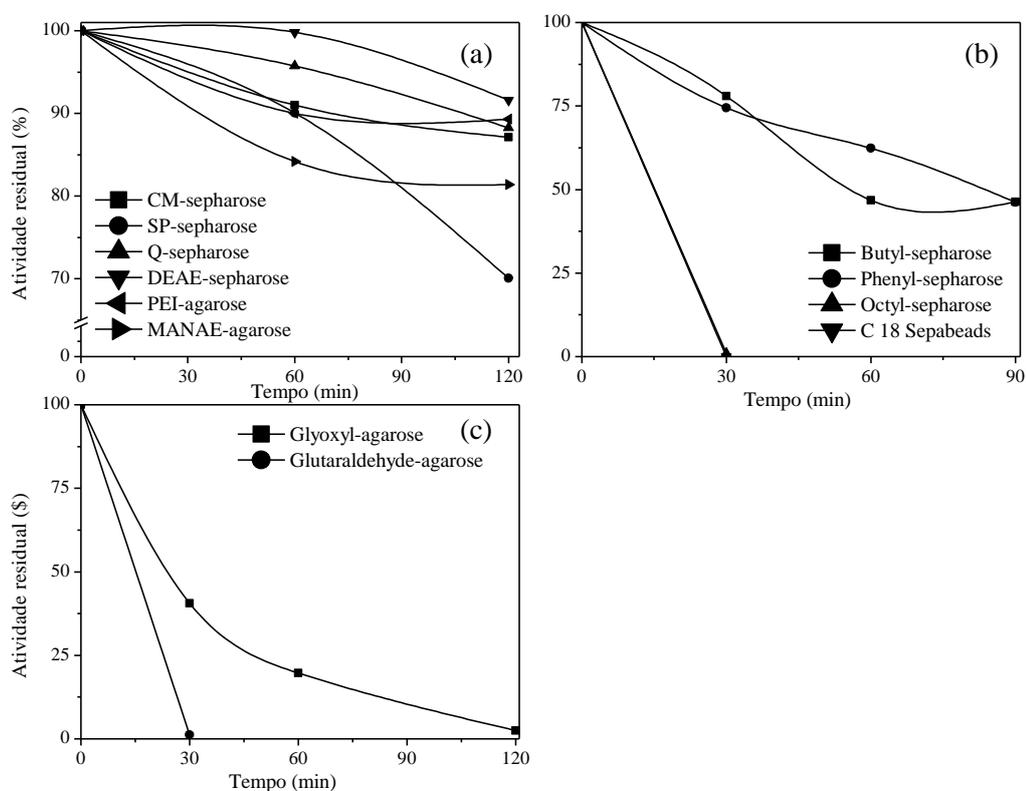
6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1. Imobilização da CaLB em diferentes suportes.

A cinética de imobilização da lipase de *Candida antarctica* B sobre os diferentes suportes iônicos, hidrofóbicos e covalentes são mostrados na Figura 37. Usando suportes iônicos foi observado baixo rendimento de imobilização depois de 2 horas de incubação. Utilizando suportes mais hidrofóbicos (C18 e octil-agarose), a imobilização foi extremamente rápida, sem atividade de lipase solúvel detectável após 30 minutos de

incubação. Outros suportes, como butil- e fenil-agarose apresentaram cinética de imobilização mais lenta com rendimento inferior a imobilização de 50 % depois de duas horas de incubação. Imobilização hidrofóbica de lipases é um procedimento comum e rápido devido lipases mostrarem uma longa cadeia de aminoácidos apolares, facilitando a imobilização. Este fator pode ser muito útil para a estabilidade, aumentando a atividade da enzima por promover a imobilização de enzimas em sua conformação aberta. Imobilização covalente de CaLB foi realizada em agarose quimicamente modificada com grupamentos aldeídos (glioxil-agarose e glutaraldeído-agarose). Após 30 minutos de incubação foi possível 100% de rendimento de imobilização para o suporte glutaraldeído-agarose. Resultado diferente foi observado com o glioxil-agarose, necessitando de um tempo maior para obter o mesmo rendimento de imobilização do suporte glutaraldeído-agarose.

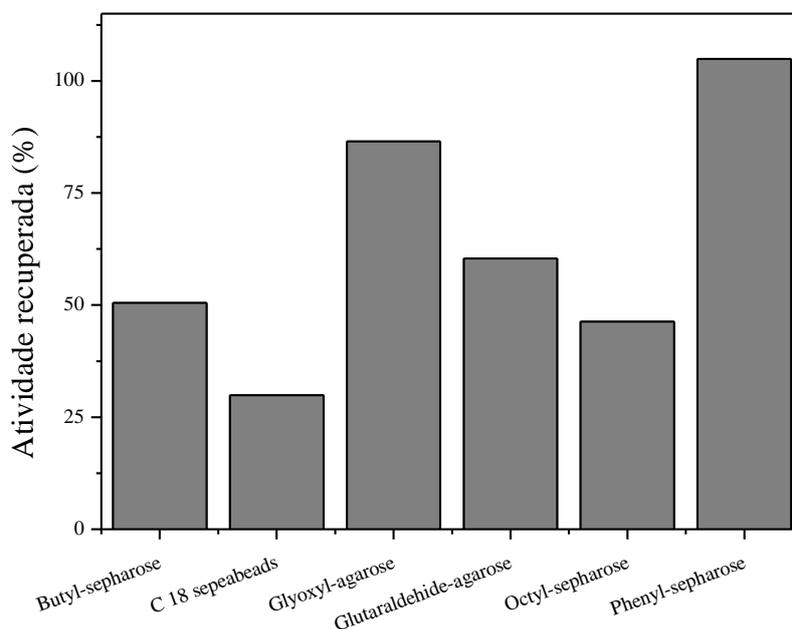
Figura 37 – Cinética de imobilização da CaLB em suportes iônicos (a), hidrofóbicos (b) e covalentes (c).



6.4.2. Atividade recuperada dos derivados

A atividade recuperada das enzimas imobilizadas com base na hidrólise do substrato sintético (*p*-NPB) foi diferente para os suportes utilizados, de acordo com a Figura 38. O suporte fenil-agarose foi o melhor suporte hidrofóbico, com atividade recuperada superior a enzima solúvel considerada como 100%. O suporte C18 sepeabeads, por ser altamente rígido e hidrofóbico, levou a distorção da enzima e a diminuição na atividade enzimática. O suporte glioxil-agarose apresentou 80% da atividade recuperada e 20% maior do que o glutaraldeído-agarose, outro suporte covalente. Os outros derivados mostraram atividade recuperada menor do que 50% em relação à enzima solúvel. Depois de analisar a atividade recuperada, estes derivados foram avaliados frente a sua estabilidade em etanol e temperatura, para a escolha do melhor derivado para aplicação em reações com interesse industrial.

Figura 38 – Atividade hidrolítica do substrato sintético *p*-PNB da CaLB imobilizada em diferentes suportes.

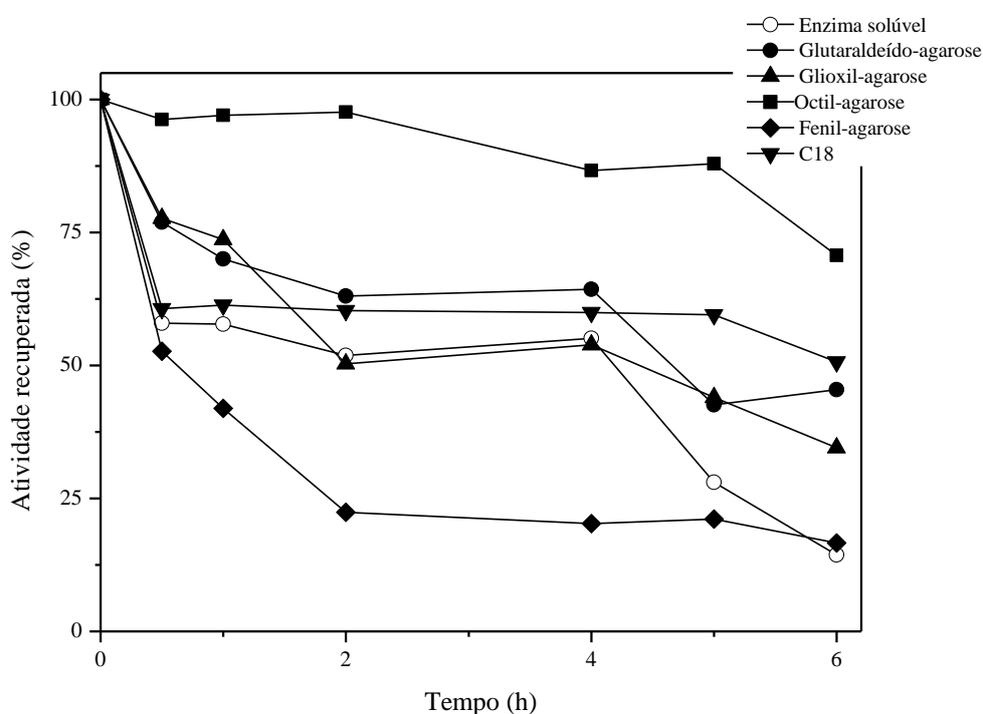


6.4.3. Termoestabilidade e estabilidade em etanol dos derivados

Para a estabilidade em etanol a 50% (Figura 39), o derivado de octil-agarose apresentou maior atividade durante todo o tempo analisado, com 75% de atividade recuperada após 6 horas, enquanto que a enzima solúvel apresentou atividade

recuperada menor do que 20%. A atividade de glioxil- glutaraldeído-agarose (suportes covalentes) foi muito semelhante depois de o tempo total de incubação, cerca de 60%. Os derivados de fenil-agarose e C18 foram menos estáveis, com atividade recuperada menor do que 50%. Para a estabilidade de etanol, a imobilização foi um processo importante para auxiliar a atividade enzimática da lipase, principalmente quando a enzima foi imobilizada em octil-agarose, mostrando-se três vezes mais estável do que a enzima solúvel.

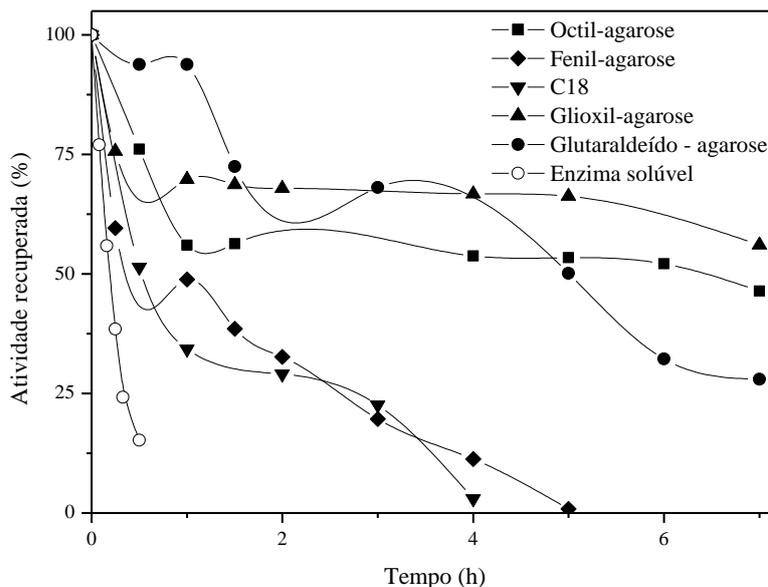
Figura 39 – Estabilidade da CaLB 50% em de etanol imobilizada em diferentes suportes.



A estabilidade térmica foi realizada a 55 °C, em um tempo máximo de incubação de 7 horas (Figura 40). Os derivados de glioxil-agarose e octil-agarose foram o mais estáveis, com atividade recuperada de 65 e 55%, respectivamente, após de todo o tempo de incubação. A enzima solúvel apresentou tempo de meia vida de 30 minutos, com 10% de atividade após 45 minutos de incubação. O derivado de glutaraldeído-agarose teve tempo de meia vida de 5 horas, dez vezes mais estável do que o da enzima solúvel. Os derivados de C18 e fenil-agarose foram muito instáveis em relação aos outros derivados, com tempo de vida de 30 e 60 minutos, respectivamente. Assim, a imobilização covalente foi mais eficiente para a estabilidade térmica das lipases

imobilizadas de *Candida antactida* B, devido os derivados covalentes apresentaram maior metade do tempo da vida do que os derivados hidrofóbicos, com exceção do derivado octil-agarose, que se mostrou muito estável na temperatura estudada.

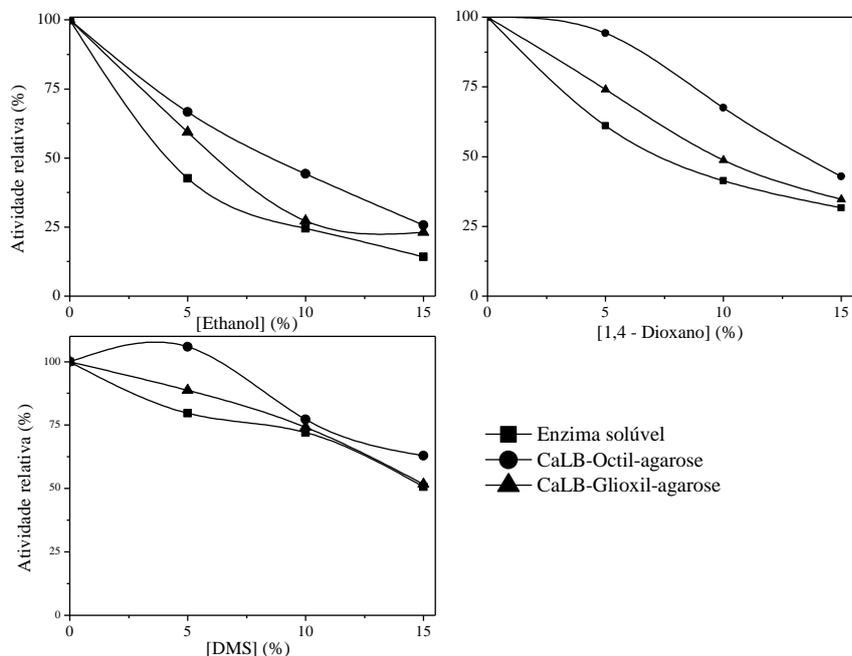
Figura 40 – Estabilidade térmica da CaLB a 55 °C imobilizada em diferentes suportes.



6.4.4. Efeito de solventes e surfactantes na atividade das enzimas imobilizadas

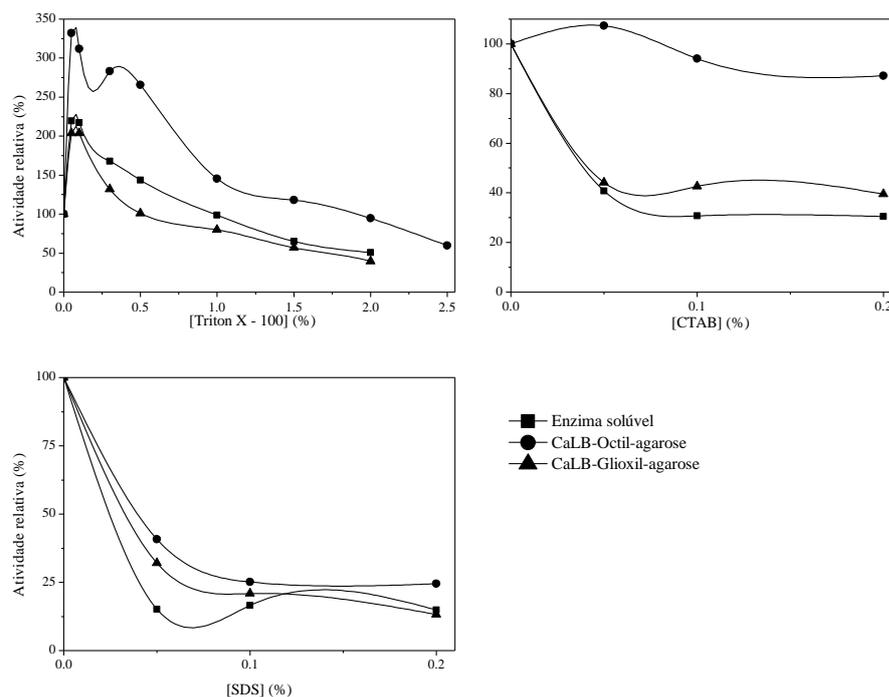
Este estudo foi realizado com os derivados mais estáveis, octil-agarose e glioxil-agarose. A atividade dos derivados foi avaliada na hidrólise do substrato *p*-NPB na presença de diferentes concentrações dos surfactantes e solventes orgânicos para avaliar o efeito desses agentes sobre a atividade enzimática das lipases imobilizadas e solúveis. A Figura 41 mostra que o etanol e 1,4-dioxano afetam diretamente a atividade da enzima, com rápida perda da atividade enzimática. Para todos os solventes orgânicos utilizados o octil-agarose foi o mais estável, com meia vida na presença de 10% de etanol e 1,4-dioxano e maior do que 15% para DMSO, com uma pequena hiperativação a 5% de DMSO. Assim, é possível observar que os solventes orgânicos testados afetam negativamente a atividade enzimática, por removerem a camada de hidratação da enzima, tornando sua estrutura rígida, causando inativação de derivados e de enzima solúvel.

Figura 41 – Efeito de solventes orgânicos na atividade da CaLB livre e imobilizada por adsorção e ligação covalente.



A Figura 42 mostra que a enzima solúvel apresentou um comportamento semelhante com o derivado de glioxil-agarose, sofrendo hiperativação de duas vezes em concentrações baixas de triton X-100. Para todos os surfactantes testados o derivado octil-agarose foi o mais estável, apresentando maior hiperativação da atividade enzimática na presença de 0,05% de Triton X-100, aproximadamente 3,5 vezes.

Figura 42 – Efeito de surfactantes na atividade da CaLB solúvel e imobilizada por adsorção e ligação covalente.



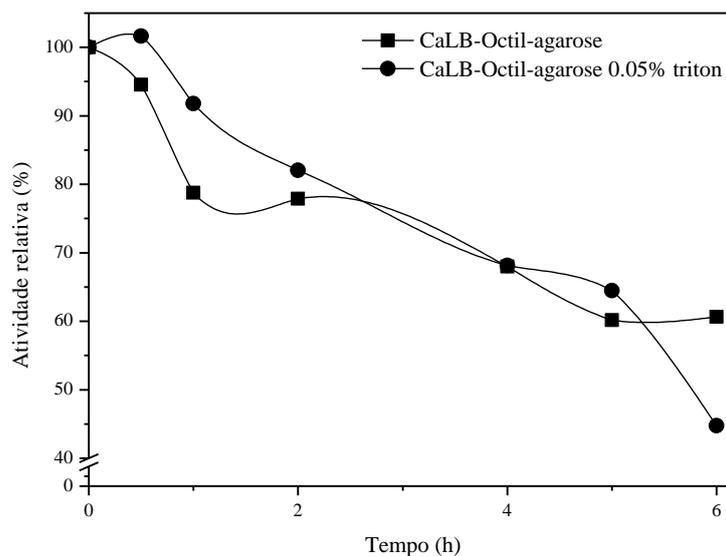
6.4.5. Inibição térmica e covalente

O presente estudo foi realizado com as lipases imobilizadas em octil-agarose incubadas a 0,05% de triton X-100 na presença do inibidor covalente ou na temperatura de inativação. Quando a enzima é imobilizada pode se estabilizar na sua forma ativa, apresentando maior atividade, porém, também pode sofrer efeitos do meio reacional mais rapidamente, como a inativação na presença de inibidores. Todos os derivados foram totalmente inativados na presença do inibidor covalente D-*p*NP após 1 minuto de incubação.

Avaliando os resultados obtidos pela inativação térmica do derivado octil-agarose na ausência e presença de 0,05% de triton X-100, comportamentos distintos foram obtidos. Quando a enzima imobilizada está exposta ao meio contendo surfactante, sua atividade é menor e mais facilmente inibida do que quando o mesmo derivado está nas mesmas condições, porém na ausência do surfactante. Esse é um fator que explica a hiperativação das lipases na presença de surfactantes, que estabilizam a estrutura da enzima na sua conformação aberta, causando a hiperativação da atividade enzimática e, conseqüentemente, a inativação na presença de inibidores. Dessa maneira, o surfactante

triton X-100 apresentou-se como um agente eficiente para hiperativar lipases de *Candida antarctica* B immobilizadas em octil-agarose.

Figura 43 – Inativação térmica a 55°C dos derivados de CaLB immobilizada em octil-agarose na presença e ausência de surfactante.



6.4.6. Avaliação do efeito de surfactante na seletividade da CaLB na hidrólise de óleo de peixe

A seletividade das lipases immobilizadas em octil-agarose foi testada na presença de surfactante durante a reação de hidrólise para produção dos ácidos graxos essenciais DHA (ômega-6) e EPA (ômega-3). Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos após 24 horas de reação, no qual foi possível observar uma mudança na atividade e seletividade ocasionada pela presença do surfactante. A reação ocorrida na ausência do triton apresentou maior atividade e seletividade do que quando o mesmo derivado foi utilizado, porém na presença de surfactante. Assim, a partir desses resultados é possível observar que o triton causou efeito positivo na hidrólise de substrato sintético, porém quando utilizado na catálise de substratos naturais efeito contrário foi obtido diminuindo a atividade hidrolítica e afetando negativamente a seletividade entre os dois ácidos graxos essenciais.

Tabela 8 – Hidrólise do óleo de peixe em pH 7 e 25 °C por 24 horas na presença e ausência do surfactante catalisada por CaLB imobilizada em octil-agarose.

Biocatalisador	Meio reacional	Atividade ^a	Seletividade ^b
CaLB-Octil-	---	126.8	3.42
agarose	0.05% Triton X-100	35.1	2.64

^a Atividade (mU) foi calculado quando o rendimento reacional era de aproximadamente 5%, expressada como a quantidade total em mols (EPA + DHA) por grama de derivado.

^b Seletividade foi expressa como a razão entre EPA e DHA.

6.4.5. Hidrólise enantiosseletiva

A Tabela 9 apresenta o rendimento reacional e o excesso enantiomérico da CaLB imobilizada em octil-agarose na hidrólise do *R,S*-metil éster mandélico. A reação pode ocorrer levando a produção de apenas um dos enantiômeros ou uma mistura dos dois produtos possíveis. Após duas horas de reação, a CaLB mostrou elevada seletividade para o enantiômero *S* atingindo seu máximo de conversão (aproximadamente 50%). Na literatura (PALOMO et al., 2005) há relato de que a CaLB imobilizada em octil-agarose apresentou a mesma preferência enantiosseletiva ao enantiômero *S*, porém com menor enantiosseletividade ($E=1,6$) comparado com o estudo realizado com a CaLB ($E>200$). Portanto, considerando que a enzima e o método de imobilização e suporte empregados foram os mesmos adotados na literatura, a enzima nesse trabalho resultou resultado mais seletivo para o enantiômero *S*, com atividade elevada de produção e um excesso enantiomérico $>99,0$, indicando que foi obtido praticamente o produto puro.

Tabela 9 – Hidrólise enantiosseletiva do (*R,S*)-ácido mandélico catalisada por CaLB imobilizada em octil-agarose.

Biocatalisador	T(h) ^a	Rendimento (%)	Vh (UI/mg) ^b	ee (%) ^c	E ^d	Enantiômero
Octyl-CaLB	2	48,6	82,7	$> 99,0$	> 200	<i>S</i>

^a Tempo de conversão máxima.

^b Velocidade de hidrólise foi calculada com a conversão entre 10 – 15%.

^c Excesso enantiomérico.

^d Razão enantiomérica.

6.5. CONCLUSÃO

A lipase de *Candida antarctica* B é uma enzima eficiente e ativa com alta enantioseletividade. Imobilização iônica não é um método indicado para imobilizar CALB, com baixo rendimento de imobilização, já que a enzima apresenta poucos aminoácidos carregados. Todos os derivados foram mais termoestáveis que a enzima solúvel e a imobilização hidrofóbica foi muito eficaz para promover a estabilidade e hiperactivação CALB em 0,05% de Triton X-100. A enantiosseletividade enzimática foi para o enantiômero *S* com excesso enantiomérico maior que 99,0% e elevada atividade específica, o que a torna uma importante enzima para aplicações em biocatálise.

7. CONCLUSÃO GERAL

As lipases são enzimas que, apesar de apresentarem o mesmo mecanismo catalítico, de forma geral, apresentaram resultados particulares para cada espécie de lipase. Não podemos comparar todas as lipases estudadas, pois para cada uma delas foram empregados diferentes aplicações e foco de estudos, porém podemos afirmar que as essas são enzimas com ampla aplicação tecnológica, muito ativas e estáveis.

A imobilização por interação hidrofóbica é uma técnica muito útil para a purificação parcial de lipases, com alta seletividade e especificidade para enzimas com cadeia de aminoácidos hidrofóbicos. Em geral, a imobilização por adsorção é um técnica que demanda tempo de execução menor, sendo um método simples de execução. Porém geralmente as resinas utilizadas para esse fim possuem alto valor comercial, tornando a aplicação inviável em alguns casos.

A imobilização covalente é um método irreversível mais efetivo de imobilização e que pode promover maior estabilidade e durabilidade do tempo de vida útil para as enzimas. Sua execução pode levar maior tempo em relação à imobilização reversível por adsorção, porém seus resultados de estabilização e reutilização muitas vezes são superiores as técnicas mais simples de imobilização.

A biotransesterificação pode ser um processo alternativo e futurista para a produção de biodiesel, sendo uma alternativa a catálise química homogênea, por apresentar como vantagens a reutilização do biocatalisador, alta seletividade e melhor qualidade do glicerol. Porém, industrialmente esse método ainda não é empregado devido ao alto custo das enzimas, baixa taxa de rendimento e maior tempo reacional superior ao da catálise química. Assim, muito ainda tem que ser melhorado sobre a aplicação de lipases como biocatalisadores na produção de biodiesel, para que esse processo se torne experimentalmente e economicamente mais viável para sua implementação na indústria.

8. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. O. DE; MONDARDO, R. M.; AGNES, E. J.; CASTRO, H. F. DE; PEREIRA, E. B. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p. 15–19, 2010.
- ALFAYA, A.; KUBOTA, L. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835–841, 2002.
- ARYEE, A. N. A.; SIMPSON, B. K. Immobilization of lipase from *grey mullet*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 8, p. 2105–22, 2012.
- AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO, D. M. J.; SANTOS, K. C.; et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452–458, 2013. Elsevier B.V.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana : aplicações como biomateriais. **Revisita Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, p. 27–34, 2007.
- BANERJEE, A.; CHAKRABORTY, R. Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production—A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 53, n. 9, p. 490–497, 2009.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220–1227, 2012.
- BARROS, F. C. F.; CAVALCANTE, R. M.; CARVALHO, T. V.; et al. Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente. , v. 7, n. 4, p. 232–246, 2006.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–93, 1998.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification , properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73–81, 2002.
- CASTRO, B. Otimização das Condições da Reação de Transesterificação e Caracterização dos Rejeitos dos Óleos de Fritura e de Peixe para Obtenção de Biodiesel, 2009. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- CASTRO, H. F. DE; MENDES, A. A.; SANTOS, C.; et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.
- CHEN, B.; HU, J.; MILLER, E. M.; et al. *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 463–71, 2008.
- CHIOU, S.; WU, W. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, p. 197–204, 2004.
- COLLA, L.; REINEHR, C.; COSTA, J. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC - UPF**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2007.

COSTA, P.; ROSSI, L.; ZAGONEL, G.; RAMOS, L. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação do óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000.

CRUZ, J. C.; PFROMM, P. H.; REZAC, M. E. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 62–69, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 31, n. 5-6, p. 466–487, 2005.

DIAB, M. A.; EL-SONBATI, A. Z.; BADER, D. M. D.; ZOROMBA, M. S. Thermal stability and degradation of chitosan modified by acetophenone. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 20, n. 1, p. 29–36, 2011.

DOCKAL, E. R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, p. 242–249, 2003.

DUTTA, P. K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, n. January, p. 20–31, 2004.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; et al. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of molecular biology**, p. 109–119, 2008.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A. V.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Modulation of the selectivity of immobilized lipases by chemical and physical modifications: release of omega-3 fatty acids from fish oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 1, p. 97–102, 2011.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 565–569, 2007.

FERREIRA, L.; FIOROTTI, J.; HALASZ, M. Quitosana: produção e estudo de parâmetros relevantes através de métodos viáveis. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química e Iniciação Científica**, v. 1, p. 1–5, 2009.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 769–777, 2007.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; et al. Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 34–43, 2013.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical reviews in biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 75–107, 1994.

GUPTA, S.; INGOLE, P.; SINGH, K.; BHATTACHARYA, A. Comparative study of the hydrolysis of different oils by lipase-immobilized membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 17–26, 2011.

HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M.; YOUSEFI, M. Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 669–676, 2013.

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

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 550–63, 2012.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase—a critical review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253–64, 2008.

JORGE, F. Estudo da adsorção do gossipol existente em óleo de semente de algodão, 2006. Universidade Federal do Ceará.

KADU, S. P.; SARDA, R. H. Use of vegetable oils by transesterification method as C.I. engines fuels: A technical review. **Journal of Engineering Research and Studies**, v. 2, p. 19–26, 2011.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; et al. Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2456–64, 2012.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 7, p. 509–515, 2000.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SÁN, J. M. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739–45, 2000.

MEHER, L.; VIDYASAGAR, D.; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. DE; RODRIGUES, D. D. S.; et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055–66, 2011.

MENDES, A.; OLIVEIRA, P.; CASTRO, H.; GIORDANO, R. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831–840, 2011.

MUKOMA, P.; JOOSTE, B. R.; VOSLOO, H. C. M. Synthesis and characterization of cross-linked chitosan membranes for application as alternative proton exchange membrane materials in fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 136, n. 1, p. 16–23, 2004.

PALLA, C. A.; PACHECO, C.; CARRÍN, M. E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 199–207, 2011.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, 2005.

PEREIRA, A.; ARAUJO, D.; COELHO, G.; BRANCO, K.; KLIER, A. Avaliação química preliminar da reação de transesterificação aplicada ao óleo de macaúba. **Pós em revista do Centro Universitario Newton**, v. 7, p. 129–135, 2013.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 2–15, 2013.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3-4, p. 100–109, 2008.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; MATHEUS, R. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199–210, 1998.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 166–170, 2006.

SENAI, T.; MANGE, R. Propriedades e Aplicações da Quitosana. **Processos Químicos**, v. 1, 2007.

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; et al. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 1, p. 61–70, 2011.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289–1307, 2007.

SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International journal of biological macromolecules**, v. 18, n. 3, p. 237–42, 1996.

SILVA, R.; SOUZA, R.; SANTANA, J.; TAMBOURGI, E. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 642–648, 2008.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 200–216, 2010.

SZCZEŚNA ANTCZAK, M.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185–1194, 2009.

TORRES, C. F.; FORNARI, T.; TENLLADO, D.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. A predictive kinetic study of lipase-catalyzed ethanolysis reactions for the optimal reutilization of the biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 2, p. 105–110, 2008.

TRODLER, P.; PLEISS, J. Modeling structure and flexibility of Candida antarctica lipase B in organic solvents. **BMC structural biology**, v. 8, p. 9, 2008.

URIOSTE, D.; CASTRO, M.; BIAGGIO, F.; CASTRO, H. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, p. 407–412, 2008.

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, n. 4-6, p. 113–148, 2000.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L.; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. **Fuel**, v. 89, n. 1, p. 1–9, 2010.

WIECZOREK, B.; TRÄFF, A.; KRUMLINDE, P.; et al. Covalent anchoring of a racemization catalyst to CALB-beads: towards dual immobilization of DKR catalysts. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 14, p. 1601–1604, 2011.

YE, P.; XU, Z.-K.; CHE, A.-F.; WU, J.; SETA, P. Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. **Biomaterials**, v. 26, n. 32, p. 6394–403, 2005.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 61–70, 2012.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 10 de julho de 2014.

José Carlos Quilles Junior

(autor)