

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE POR DIFERENTES TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE CATALISADORES ESTÁVEIS

BRUNA LEAL DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

**BOTUCATU – SP
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE POR DIFERENTES TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE CATALISADORES ESTÁVEIS

BRUNA LEAL DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biomoléculas: estrutura e função.

Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

**BOTUCATU – SP
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Santos, Bruna Leal dos.

Imobilização de lipase por diferentes técnicas para obtenção de catalisadores estáveis / Bruna Leal dos Santos. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa

Capes: 20805004

1. Lipase. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Enzimas - Aplicações industriais. 4. Biodiesel. 5. Silica.

Palavras-chave: Aplicações; Biodiesel; Enzimas; Imobilização; Lipase.

“A única forma de chegar ao impossível,
é acreditar que é possível.”

Lewis Carroll – Alice no País das Maravilhas

À Isabella e Hélio,
meus amores, minhas inspirações.
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por colocar pessoas tão especiais no meu caminho, que sempre me apoiaram e me ajudaram a conquistar tudo que tenho, tudo que sou, e ainda, a acreditar que posso tornar meus sonhos realidade.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. Valber de Albuquerque Pedrosa pela oportunidade, amizade, confiança, apoio, ensinamentos, paciência e pela competência em orientar este trabalho.

Aos meus chefes, Prof^o. Dr^o. Cezinande de Meira, Prof^o. Dr^o. Antonio José de Araujo Aguiar e Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira pela amizade, incentivo, compreensão e oportunidade em continuar meus estudos, mesmo trabalhando.

À minha filha Isabella e ao meu marido Hélio pelo amor, pela inspiração, pela força, pelo companheirismo e pela motivação em querer ser uma pessoa melhor sempre.

À minha mãe Vânia, pelo amor dedicado a mim, pelo incentivo em sempre estudar, pelo apoio moral, financeiro, e pelo exemplo de força, honestidade e integridade.

À Prof^a. Maria José Queiroz de Freitas Alves, minha primeira orientadora, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e por abrir as portas para minha vida científica.

A todos os docentes do Instituto de Biociências da UNESP Botucatu pelo conhecimento, auxílio na minha formação acadêmica, pelo carinho e amizade nestes últimos 09 anos e, especialmente à Prof^a. Luciana Fleuri, que tanto me ajudou neste trabalho.

À minha irmã Gabriela e meus familiares, pelo carinho, pelas palavras de apoio e incentivo.

À minha segunda família, meus amigos Maria, Lucas, Paulo, Caio, Mayra, Danielle, Giane, Raquel, Mateus, João, Félix e Ariela, por me apoiarem e estarem ao meu lado sempre.

Aos amigos e colegas do Departamento de Química e Bioquímica do IBB - UNESP Botucatu, pelo apoio e auxílio, em especial à Gislaine e Giovanna.

À melhor turma da galáxia, Bio XLI, pelos 05 anos compartilhados na graduação, pelos aprendizados, apoio, companheirismo e pela amizade que continuamos cultivando.

Aos amigos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Botucatu pelo aprendizado, pela convivência, pela ajuda e força, principalmente nesses 02 anos de mestrado.

À banca examinadora pela contribuição dada para o aprimoramento deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho e realização deste sonho, meu muito obrigada.

RESUMO

As lipases, também chamadas de glicerol éster hidrolases, são enzimas que fazem parte do grupo das serina hidrolases, tendo como substrato, triglicerídeos. O modo de ação das lipases assemelha-se ao das esterases, realizando a hidrólise das ligações ésteres-carboxílicas de acilgliceróis, formando ácidos graxos e glicerol. Processos de bioconversão enzimática têm sido bastante utilizados na produção, transformação e valorização de matérias-primas. Avanços na tecnologia enzimática, como a imobilização de enzimas, possibilitaram a modificação das propriedades cinéticas e da estabilidade destas moléculas contribuindo com o aumento no potencial de aplicações das mesmas. O presente trabalho teve por objetivo estudar diferentes métodos de imobilização de lipases em suportes de sílica, bem como os efeitos deste procedimento, visando melhorar a funcionalidade das enzimas e o maior rendimento econômico nos processos industriais. Os métodos de imobilização escolhidos para os estudos foram: adsorção física, ligação covalente e encapsulação. O processo de imobilização de lipase em Celite (adsorção física) foi otimizado levando em conta o pH, porcentagem da concentração enzima:suporte e temperatura ótimos de atividade enzimática. Também se utilizou Celite como suporte para a imobilização de lipase por ligação covalente, onde se obteve os melhores resultados com atividade enzimática 20% a 40 °C e eficiência de imobilização de 50%. A celite foi ativada com 3-aminopropiltriétoxissilano e glutaraldeído. Por último, foi avaliada a possibilidade de encapsulação da lipase utilizando o precursor tetraetilortossilicato (TEOS). Os resultados obtidos nesta última metodologia não se mostraram satisfatórios. Logo, com os dados obtidos, podemos dizer que uma boa manutenção da atividade catalítica depende do tipo de retenção (química ou física) e da força de interação entre a enzima e o suporte utilizado, força esta que pode, em alguns casos, causar distorções estruturais na proteína, levando a manutenção ou diminuição da atividade catalítica.

Palavras-chave: Enzimas, lipase, imobilização, aplicações, biocombustível.

ABSTRACT

Lipases, also known as glycerol ester hydrolases, are enzymes that belong to the group of serine hydrolases. The mode of action of lipases is very similar to esterase group, performing the hydrolysis of carboxylic esters of glycerides - forming fatty acids and glycerol. The enzymatic bioconversion processes have been widely used in manufacturing, processing and recovery of raw materials. Advances methodology for immobilization of enzyme have allowed the modification of the kinetic properties and stability of these molecules contributing to the increase in the potential applications of the same. The present work is aimed to study different methods of immobilization of lipases in silica supports, and the effects of this procedure to improve the functionality of enzymes. The immobilization methods chosen for the studies were: physical adsorption, covalent bonding and encapsulation process. The process of immobilization of lipase on Celite (by physical adsorption) was optimized taking into account several parameters such as: pH, the enzyme concentration:support and temperature for enzyme activity. Celite was also used as a support for the immobilization of lipase by covalent bond, where best results were obtained with 20% enzymatic activity at 40 ° C and immobilization efficiency of 50%. The celite was activated with 3-aminopropyltriethoxysilane and glutaraldehyde. Finally, we have studied the possibility of encapsulation of lipase using the precursor tetraethylorthosilicate (TEOS). The results of this last methodology were not satisfactory. These results show that to maintain a good catalytic activity depends on the type of immobilization chose (chemical or physical) and the strength of the interaction between the enzyme and support, which can cause structural distortions in the protein, leading maintenance or a decrease in catalytic activity.

Keywords: Enzyme, lipase, immobilization, applications, biodiesel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reação de transesterificação de triacilglicerol.....	25
Figura 2. Reações catalisadas pelas lipases	30
Figura 3. Mecanismo de influência de tensoativos sobre a atividade catalítica de lipases.....	32
Figura 4. Métodos de imobilização de enzimas.....	38
Figura 5. Tipos de imobilização por ligação covalente.....	43
Figura 6. Gráfico ilustrando porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de lipase adsorvida em celite, variando-se a proporção enzima:suporte.....	64
Figura 7. Gráfico ilustrando o efeito da temperatura na atividade enzimática e eficiência de imobilização da lipase adsorvida em celite.....	66
Figura 8. Gráfico ilustrando variação do pH na atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase adsorvida em celite.....	67
Figura 9. Gráfico ilustrando variação da atividade enzimática e eficiência de imobilização em função da concentração enzima:suporte na imobilização por ligação covalente.....	68
Figura 10. Gráfico ilustrando efeito da temperatura na atividade enzimática de lipase imobilizada por ligação covalente.....	71
Figura 11. Gráfico ilustrando efeito do pH na atividade enzimática na imobilização de lipase por ligação covalente.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oleagionosas utilizadas na produção de biodiesel e seus respectivos teores de óleo.....	22
Tabela 2. Especificações do biodiesel a ser utilizado no Brasil.....	24
Tabela 3. Aplicação de lipases em diferentes áreas industriais.....	31
Tabela 4. Fatores que influenciam o desempenho de um sistema de enzima imobilizada.....	48
Tabela 5. Exemplos de aplicações comerciais de enzimas imobilizadas.....	54
Tabela 6. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de lipase por adsorção em celite e cristais de sílica	63
Tabela 7: Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de lipase adsorvida em celite variando-se a proporção enzima:suporte.....	64
Tabela 8. Efeito da temperatura na atividade enzimática e na eficiência de imobilização da lipase adsorvida em celite.....	65
Tabela 9. Variação do pH na atividade enzimática e na eficiência de imobilização da lipase em celite.....	67
Tabela 10. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de lipase por adsorção em celite.....	68
Tabela 11. Variação da atividade enzimática e eficiência de imobilização em função da concentração enzima:suporte.....	69

Tabela 12. Efeito da temperatura na atividade enzimática e na eficiência de imobilização da lipase imobilizada por ligação covalente.....	70
Tabela 13. Efeito do pH na atividade enzimática na imobilização de lipase por ligação covalente.....	72
Tabela 14. Atividade enzimática e eficiência de imobilização da lipase encapsulada em suporte de sílica.....	74
Tabela 15. Atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase encapsulada em sílica com a presença do ativador PEG.....	74
Tabela 16. Atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase fúngica 1 FS encapsulada em suporte de sílica.....	74
Tabela 17. Atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase fúngica 13 FT encapsulada em suporte de sílica.....	75

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. HISTÓRIA DO BIODIESEL.....	16
3. BIODIESEL.....	18
3.1. Reação de Transesterificação.....	24
4. ENZIMAS.....	27
4.1. Lipases.....	29
5. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	33
5.1. Histórico de Imobilização de Enzimas.....	33
5.2. Definição.....	35
5.3. Tipos de Imobilização.....	37
5.3.1. Imobilização por Adsorção.....	39
5.3.2. Imobilização por Ligação Covalente.....	41
5.3.3. Imobilização por Ligação Cruzada ou Cross-linking.....	44
5.3.4. Imobilização por Agregados de Enzimas Reticulados	45
5.3.5. Imobilização por Encapsulamento.....	46
5.4. Propriedades das Enzimas Imobilizadas.....	47
5.5. Parâmetros para determinar o sucesso do processo de imobilização.....	51
6. APLICAÇÃO DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS.....	53
7. PERSPECTIVAS.....	55
8. OBJETIVOS.....	57
8.1. Objetivos Gerais.....	57
8.2. Objetivos Específicos.....	57
9. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
9.1. Obtenção de Lipase.....	58

9.2. Imobilização da Lipase por Adsorção.....	58
9.3.Imobilização por Ligação Covalente em Celite Ativada com GLU e GTPS.....	59
9.4. Imobilização por Encapsulação.....	61
9.5. Teste de Atividade	62
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
10.1. Imobilização de Lipase por Adsorção.....	63
10.2.Imobilização por Ligação Covalente em Celite Ativada com GLU e GTPS.....	68
10.3. Imobilização de Lipase por Encapsulação.....	73
11. CONCLUSÃO.....	76
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	78

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os ecossistemas têm sofrido consequências severas resultantes da extensa degradação ambiental, causada pela incontável busca da sociedade humana em suprir suas necessidades energéticas. Com exceção de hidrelétricas e da energia nuclear, a maior parte de toda a energia consumida no mundo vem do petróleo, carvão e gás natural. Como essas fontes são limitadas e deverão se esgotar no futuro, existe uma grande procura por uma alternativa energética viável ambientalmente. Por isso, a produção de biocombustíveis alternativos, provenientes de óleos vegetais brutos, tem sido tema de diversos estudos no setor energético.

Sabe-se que o setor petroquímico é um dos responsáveis por grandes danos ambientais. As mudanças climáticas; os derramamentos de óleo; a geração de resíduos tóxicos de difícil degradabilidade; a poluição do ar das grandes cidades e acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, intensificando o efeito estufa, são impactos visíveis e significativos, resultantes da produção e consumo dos combustíveis fósseis (PORTAL DO BIODIESEL, 2006, SHUHRDDT *et al.*, 1998). Logo, o momento demanda mudanças significativas na postura da sociedade em relação ao uso sustentável dos recursos ambientais, nos processos de produção de bens, bem como, na diminuição do consumo energético. Esta crescente preocupação com o meio ambiente, aliada à crise do petróleo e ao aumento da demanda por combustíveis, preconizou a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo.

Neste contexto, os óleos vegetais aparecem como alternativa para substituição dos combustíveis fósseis (NASCIMENTO *et al.*, 2001; KNOTHE, 2002; AKOH *et al.*, 2007; ANTCHAC *et al.*, 2009). A possibilidade de utilização de combustíveis de origem vegetal é altamente atrativa não só por ser uma fonte de energia renovável, trazendo contribuições na problemática ambiental (DORADO, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2001), mas também, pela redução da dependência de importação de petróleo (WU *et al.*, 1999).

Pela definição da National Biodiesel Board dos Estados Unidos da América, biodiesel é um derivado de mono-álquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (ADÃO *et al.*, 2005), produzido a partir da reação de transesterificação dos triacilglicerídeos presentes em óleos e gorduras (Ranganathan *et al.*, 2008; VASUDESAN E BRIGGS, 2008; ANTCHAC *et al.*, 2009).

Os óleos de origem vegetal são os mais utilizados para produção de biodiesel, porém, o combustível também pode ser produzido através de outras fontes renováveis como gordura animal (sebo bovino, banha suína), óleo microalgal e resíduos de óleos de indústrias e restaurantes (VASUDESAN E BRIGGS, 2008; ANTCZAC *et al.*, 2009). Nem todos os óleos vegetais e gorduras animais são indicados para utilização na produção de biodiesel. Alta viscosidade e grande número de insaturações na cadeia carbônica são características que tornam a matéria imprópria para constituição do biodiesel (KNOTHE, 2005). Com base em muitas pesquisas já realizadas, as oleaginosas de maior destaque para produção de biodiesel no Brasil são a soja, o girassol, a mamona, a colza, o babaçu, o buriti, o dendê, o amendoim e o pinhão manso (PARENTE, 2003).

A reação de transesterificação envolve a transformação de um éster carboxílico em outro, através da troca do grupo RO⁻ presente no éster original, por outro grupo semelhante proveniente de um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), originando glicerina e mono-alquil ésteres (DABDOUB E BRONZEL, 2009). Desta maneira, de um modo geral, pode-se dizer que a reação de transesterificação é um processo de cisão por intermédio de um álcool (alcoólise), em que um álcool desloca outro álcool, comportando-se como agente nucleófilo, tendo como resultado um mono-alquil ésteres. Os mono-alquil ésteres formados são menos viscosos, apresentam propriedades semelhantes ao diesel convencional e, atendendo a certos parâmetros de qualidade (BIODIESEL STANDART, 2002), podem ser empregados eficientemente como substitutos de combustíveis fósseis, com desempenho muito próximo e não exigindo modificações nos motores (ANTCZAC *et al.*, 2009).

Processos de bioconversão enzimática têm sido bastante utilizados na produção em larga escala do biodiesel. Avanços recentes na biocatálise possibilitam a imobilização enzimática, preservando as propriedades cinéticas e estabilidade estrutural da enzima. No presente trabalho, discute-se a importância da biocatálise no contexto da fabricação de produtos químicos e sustentáveis, enfatizando a necessidade de imobilização de enzimas como uma tecnologia chave para a área industrial.

Os métodos atuais de imobilização enzimática podem ser divididos em três categorias: interação química (adsorção, ligações iônicas, ligações covalentes), retenção física (entrapamento e encapsulação) e por ligação de cross-linking. Considerações gerais a respeito das vantagens da técnica de imobilização enzimática, em relação à enzima livre em

solução, estão relacionadas principalmente, a sua maior estabilidade e facilidade de remoção do meio reacional, trazendo reduções significativas nos custos da operação industrial.

Por outro lado, dependendo do suporte e da técnica utilizada, o processo de imobilização pode alterar as propriedades catalíticas da enzima como: atividade, especificidade e seletividade. Logo a redução da atividade catalítica da enzima devido a efeitos difusionais, conformacionais, microambientes e a dessorção das enzimas com o uso, são algumas desvantagens significativas que podem surgir com o procedimento de imobilização.

Para que a aplicação enzimática no setor industrial seja viável, é preciso obter um biocatalisador termoestável, que tenha suas propriedades preservadas durante o processo e que se possível, possa permitir a reutilização do mesmo. Surgindo como uma ferramenta estratégica na biocatálise, o desenvolvimento de técnicas de imobilização enzimática em suportes sólidos possibilitou a preservação das propriedades cinéticas e estabilidade estrutural da enzima, reduzindo sua inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, além de permitir o reaproveitamento da mesma, tornando o processo mais sustentável e rentável economicamente. A escolha criteriosa do método de imobilização, bem como do suporte a ser utilizado é de fundamental importância para manter a eficiência e o desempenho do complexo imobilizado (LÓPEZ-GALLEGO, 2005; GUISAN, 2006; MATEO *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008). Portanto é fundamental determinar e discutir parâmetros como: rendimento de imobilização, eficiência de imobilização, recuperação de atividade, carga de enzima (% em peso no biocatalisador), bem como algumas propriedades físicas da enzima imobilizada.

Utilizando-se suportes de origem orgânica e inorgânica a lipases têm sido imobilizadas através de diversos métodos de imobilização por: adsorção física, ligação covalente, reticulação e encapsulação (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Atualmente a adsorção física em suportes hidrofóbicos é o método mais empregado de imobilização de lipases no setor industrial. Este método é de fácil reprodutibilidade, baixo custo, além de permitir a reutilização do suporte, pois não ocorrem interações químicas entre a enzima e o suporte.

2. HISTÓRIA DO BIODIESEL

Durante o século XX e no início do século XXI, antes do uso dos derivados de petróleo, o carvão mineral e produtos da biomassa, principalmente a madeira e derivados agrícolas, eram as principais fontes de energia utilizada pela população (EMBRAPA/CNPQ, 2006).

Em 1838, Brandes realizou um dos primeiros experimentos de degradação de óleos vegetais, quando ao destilar óleo de coco obteve propenal, aldeído resultante da dupla desidratação do glicerol. Em 1853, anos antes do motor de ciclo a diesel ser criado, os pesquisadores E. Duffy e J. Patrick realizaram a condução do primeiro procedimento de transesterificação de óleos vegetais (GONZALES *et al.*, 2000).

Engler e Seidner, em 1888, em um procedimento completamente diferente da reação de transesterificação, a técnica de craqueamento térmico ou catalítico, constataram pela primeira vez, a formação de mistura de hidrocarbonetos pela degradação térmica de triglicerídeos de óleo de peixe (GONZALES *et al.*, 2000).

Em 1893, em Augsburg na Alemanha, foi criado por Rudolf Diesel o primeiro motor a diesel que funcionou de forma eficiente. O motor foi apresentado oficialmente na Feira de Automóveis Mundial de Paris, em 1898, utilizando o óleo de amendoim como combustível (SÁ FILHO *et al.*, 1979). Por volta de 1912, Rudolf Diesel afirma que o motor a diesel pode ser alimentado por óleos de origem vegetal, um combustível que, com o tempo, se tornaria tão importantes quanto o petróleo e o carvão, além de auxiliar o desenvolvimento agrário dos países que o utilizarem (STI/MIC, 1985).

Visando auxiliar a transformação de óleos vegetais em hidrocarbonetos, em 1921, Mailhe, na França e Bobayashi, no Japão, divulgam os primeiros trabalhos utilizando catalisadores essencialmente ácidos, entre eles, argilas naturais, alumina, cloreto de zinco e cloreto de alumínio (GONZALES *et al.*, 2000).

Em 1924, Wattermann realiza a síntese de hidrocarbonetos através da hidrogenação de carvão à alta pressão de H₂ ao óleo vegetal, obtendo uma conversão quase total destes hidrocarbonetos. Em 1930, Egloff realiza a primeira tentativa de industrialização do processo de obtenção de hidrocarbonetos através de óleos vegetais (GONZALES *et al.*, 2000).

Marco na história do biodiesel, em 1937 o pesquisador belga Charles George Chavanne, através da patente “Procédé de transformation d’huiles végétales en vue de leur utilisation comme carburants”, descreve a transformação de um óleo vegetal (palma africana) em ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, com catalisadores ácidos, visando a utilização dos mesmos como combustível para motores de combustão interna (CHAVANNE, 1938). Graças a este trabalho, em 1938 na Bélgica, na linha comercial entre as cidades de Louvain e Bruxelas, rodou o primeiro ônibus movido a biocombustível (CHAVANNE, 1943; KNOTHE *et al.*, 2005).

Durante as décadas de 40 e 50, diversos artigos e patentes registraram o desenvolvimento de reações de transesterificação de óleos vegetais com álcool (metanol ou etanol) sob catálise alcalina, destacando sua aplicação na produção de glicerina. A partir de então, uma série de inovações têm sido descritas em artigos e patentes visando oferecer técnicas alternativas, bem como trazer o melhoramento dos processos de produção de biocombustíveis.

A partir de 1973 o aumento de preço do petróleo, durante o período conhecido como Crise do Petróleo, propulsionou uma nova consciência mundial com relação à produção e ao consumo de energia, principalmente no que se diz respeito aos combustíveis fósseis, fontes energéticas não renováveis. Este ano representou um verdadeiro marco na história da energia mundial, pois o homem passou a valorizar as fontes energéticas, posicionando-as em destaque com relação aos bens de sua convivência (PARENTE, 2003).

No Brasil, em 1980, foi descrita a primeira patente de um processo de transesterificação, no documento “Processo de produção de combustíveis a partir de frutos ou sementes de oleaginosas” (PARENTE, 1980), com o objetivo de produzir um combustível com técnicas semelhantes às utilizadas por Chavanne, 43 anos mais cedo. Através da destilação sob vácuo, o trabalho descreve a possibilidade de separação dos ésteres do biodiesel obtido do óleo de amêndoas de babaçu. Os ésteres separam-se em frações leves e frações pesadas, onde a fração leve serviria como substituto do querosene de petróleo (bioquerosene), e a fração mais pesada como sucedâneo do óleo diesel de petróleo (biodiesel). Descreve-se ainda, na mesma patente, o uso de micro-ondas ou de ultrassom para tornar mais eficiente a extração do óleo vegetal.

Mesmo enfrentando sérias dificuldades para competir com o diesel de petróleo, o biodiesel vem sendo utilizado em um grande número de países, resultado de programas de subsídio e uso obrigatório nas misturas com o diesel (DABDOUB E BRONZEL, 2009).

O Brasil, pobre em reservas de combustíveis fósseis suficientes para atender sua própria demanda, passou a realizar estudos utilizando estas técnicas, visando à produção de fontes de energia alternativa que suprissem o consumo interno. Assim, o biodiesel passou a ser visto com mais atenção pelo país (LOPES E MARVULLE, 2004). Em janeiro de 2005, o Governo Federal promulgou a lei do Biodiesel, autorizando a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e fixando percentuais mínimos obrigatórios de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado. A lei determina que de 2008 a 2012, o percentual mínimo de biodiesel seja de 2%, atingindo 5% até 2013 (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2005). Atualmente, o potencial do uso do biodiesel como fonte energética “nova e renovável” é um dos assuntos mais discutidos no âmbito industrial e acadêmico.

3. BIODIESEL

Nas últimas décadas, os ecossistemas têm sofrido consequências severas resultantes da extensa degradação ambiental, causada pela incontável busca da sociedade humana em suprir suas necessidades econômicas, sociais e culturais.

O momento demanda mudanças significativas na postura da sociedade em relação ao uso sustentável dos recursos ambientais, nos processos de produção de bens, bem como, na diminuição do consumo energético. Esta crescente conscientização ecológica, aliada à crise do petróleo, ao aumento da demanda por combustível, bem como, ao esgotamento dos recursos fósseis, incentivou, no Brasil e no mundo, a busca por fontes de energia renovável (ANTCZAK *et al.*, 2009).

Contribuindo com a amenização do efeito estufa, através da redução da emissão de gás carbônico na atmosfera, fontes alternativas de energia como a biomassa vegetal, energia solar, energia eólica e até energia obtida por clivagem de radioisótopos, têm sido intensamente pesquisadas. Um dos grandes destaques da atualidade na área de fontes de energia alternativas é o interesse pelo uso de recursos naturais baseados em materiais lignocelulósicos (1-3) para a produção de etanol, ou por fontes produtoras de lipídeos usados para a produção de biodiesel.

No século XIX, Rudolph Diesel utilizou óleos vegetais diretamente como combustível (AKOH *et al.*, 2007; ANTCZAC *et al.*, 2009), porém, a longo prazo, esta prática mostrou-se insatisfatória. Estudos demonstraram que a utilização de óleos vegetais *in natura* como combustível, trás várias desvantagens, pois a alta viscosidade do óleo, a baixa volatilidade e a formação de ácidos graxos livres, resultam na formação de produtos indesejáveis, como goma de oxidação, polimerização e deposição de carbono na câmara de combustão, causando obstrução dos bicos injetores e dificuldade na injeção e combustão (MEHER *et al.*, 2006; RANGANATHAN *et al.*, 2008).

É preciso processar os óleos vegetais para que estes adquiram propriedades semelhantes a dos combustíveis fósseis, principalmente a viscosidade, característica fundamental para o aproveitamento do combustível formado. Os principais métodos empregados para processamento dos óleos vegetais são a pirólise, microemulsificação e transesterificação.

O processo de pirólise consiste na modificação química de óleos vegetais por craqueamento em altas temperaturas, reduzindo a viscosidade e melhorando o índice de cetano dos mesmos. Com a presença de um catalisador químico, óleos de soja, algodão e colza foram eficientemente craqueados obtendo um combustível de baixa viscosidade. Os produtos deste procedimento incluem alcanos, alcenos e ácidos carboxílicos, necessitando da realização de separação por destilação dos subprodutos formados. Este fato, aliado ao alto custo dos equipamentos, são as principais desvantagens deste procedimento (MA E HANNA, 1999).

Outra técnica de processamento dos óleos vegetais relatada é a microemulsificação, tendo como componentes óleo diesel, alcoóis, outros derivados de petróleo e surfactante em proporções ideais. Alcoóis como metanol, etanol e propanol são utilizados como aditivos para a redução da viscosidade; alcoóis superiores são utilizados como agentes tensoativos e alquil nitratos tem a função de aumentar o índice de cetano. Apesar da alteração na viscosidade e do índice de cetano da microemulsão, a utilização desta técnica trás algumas desvantagens como depósito de carbono por deposição indireta e entupimento de injetor (MA E HANNA, 1999).

O método mais utilizado para processamento de óleos e gorduras visando à obtenção de um biocombustível é a transesterificação. A reação de transesterificação envolve a transformação de um éster carboxílico em outro, através da troca do grupo RO⁻ presente no

éster original, por outro grupo semelhante proveniente de um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), originando uma mistura de glicerina e monoalquil ésteres (DABDOUB E BRONZEL, 2009). Desta maneira, de um modo geral, pode-se dizer que a reação de transesterificação também é uma reação de alcoólise, um processo de cisão por intermédio de um álcool, em que um álcool desloca outro álcool, comportando-se como agente nucleófilo, tendo como resultado, monoalquil ésteres. Os monoalquil ésteres formados, conhecidos como biodiesel, são menos viscosos, apresentam propriedades semelhantes ao diesel convencional e, atendendo a certos parâmetros de qualidade (BIODIESEL STANDART, 2002), podem ser empregados eficientemente como substitutos de combustíveis fósseis, com desempenho muito próximo e não exigindo modificações nos motores, além de serem renováveis, não tóxicos e biodegradáveis (ANTCZAC *et al.*, 2009; SCHRODER *et al.*, 1999).

Pela definição da National Biodiesel Board dos Estados Unidos da América, biodiesel é um derivado de mono-álquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (ADÃO *et al.*, 2005), produzido a partir da reação de transesterificação dos triacilglicerídeos presentes em óleos e gorduras (RANGANATHAN *et al.*, 2008; VASUDESAN E BRIGGS, 2008; ANTCZAC *et al.*, 2009).

Além das diversas vantagens ambientais, a utilização de óleos vegetais para produção de biodiesel tem sido priorizada por abrir grandes oportunidades para a agricultura familiar, desenvolvendo melhores condições de vida em regiões carentes e representando alternativas para minimização de alguns problemas econômicos e socioambientais de difícil solução (RAMOS, 2001). No entanto, o combustível também pode ser produzido através de outras fontes renováveis como gordura animal (sebo bovino, banha suína), óleo microalgal e resíduos de óleos de indústrias e restaurantes (VASUDESAN E BRIGGS, 2008; ANTCZAC *et al.*, 2009).

A composição e natureza dos ácidos graxos dos triacilglicerídeos diferem de acordo com a origem do óleo ou gordura. Sendo assim, óleos vegetais provenientes de diferentes espécies vegetais possuem composições diferentes e consequentemente, propriedades de ésteres também diferentes (KNOTHE, 2005). As propriedades físicas e químicas da matéria prima utilizada para a produção do biodiesel estão relacionadas diretamente com o rendimento do processo e com a qualidade final do produto (LANG *et al.*, 2001; BARNWAL E SHARMA, 2004). Desta maneira, nem todos os óleos vegetais e gorduras animais são

indicados para utilização na produção de biodiesel. Alta viscosidade e grande número de insaturações na cadeia carbônica são características que tornam a matéria imprópria para constituição do biodiesel (KNOTHE, 2005).

A disposição de matérias primas para atender a demanda de biodiesel satisfatoriamente, é um dos grandes desafios desta indústria. As consequências trazidas pelo aumento da produção de biocombustíveis têm sido muito questionadas por alguns países, como Cuba e Venezuela, preocupados com o uso de áreas anteriormente destinadas à produção de alimentos e um possível aumento de problemas sociais, como fome e miséria. Para ser uma fonte de energia sustentável cada vez mais rentável e competitiva com o diesel, é preciso que o biodiesel tenha matérias primas de baixo custo, e principalmente, que não traga impactos significativos na produção de alimentos (SUAREZ *et al.*, 2009).

Sendo um país tropical de extensas dimensões territoriais, o Brasil possui muitas alternativas viáveis para produção de óleos vegetais, constituindo uma das muitas vantagens e diferenciais na estruturação do programa de produção e uso do biodiesel no país. O maior desafio está, no entanto, no aproveitamento das potencialidades de cada oleaginosa em cada região (PORTAL DO BIODIESEL, 2006; RAMOS, 2001). Com base em muitas pesquisas já realizadas, as oleaginosas de maior destaque para produção de biodiesel no Brasil são a soja, o girassol, a mamona, a colza, o babaçu, o buriti, o dendê, o amendoim e o pinhão manso (PARENTE, 2003).

Atualmente a soja representa aproximadamente 90% da produção de óleos no Brasil, sendo a matéria prima preferencial na indústria do biodiesel, porém, por possuir baixa produtividade em lipídeos, requer enormes quantidades de terra para suprir este mercado. Desta maneira, o aumento na demanda por óleos para produção de biodiesel, dificilmente será suprido pela soja e outros cereais como o milho e a canola, pois exigiria uma larga extensão de terras cultiváveis (SUAREZ *et al.*, 2009).

Devido o seu alto teor de óleo e pela sua abundância no Nordeste Brasileiro, a mamona vem ganhando grande destaque não só na indústria do biodiesel, como também, no incentivo da agricultura familiar e desenvolvimento da qualidade de vida da região (AZEVEDO E LIMA, 2001).

As palmáceas, como palma, coco e babaçu, são consideradas por especialistas, as oleaginosas mais viáveis para atender programas de biodiesel em larga escala,

proporcionando melhor produtividade em óleos, além de trazer poucos impactos na produção de alimentos. Também merecendo grande destaque na indústria do biodiesel, estão as oleaginosas da família *Jatropha*, especialmente do gênero *Curcas*, conhecido como pinhão manso. Ainda pouco cultivada no Brasil, a planta é perene e bem adaptada a regiões semiáridas, sendo apontada como alternativa para produção de óleos no nordeste brasileiro através de agricultura familiar. Apesar de terem realizado poucas pesquisas em campo com o pinhão manso, vários pesquisadores afirmam que a planta possui uma alta produtividade de óleos (SUAREZ *et al.*, 2009).

Considerando o exposto, é fundamental que durante a escolha da matéria prima para produção do biodiesel, o teor de óleo seja levado em consideração, sendo que além das questões socioambientais que possam surgir, o custo benefício do processo poderá ser afetado. A Tabela 1, adaptada de Moretto e Fett (1998), lista algumas das principais oleaginosas utilizadas para produção de biodiesel, e seus respectivos teores de óleo.

Matéria Prima	Teor de óleo (%)
Copra	66-68
Babaçu	60-65
Gergelim	50-55
Polpa de palma (dendê)	45-50
Caroço de palma	45-50
Amendoim	45-50
Colza	40-45
Girassol	35-45
Açafrão	30-35
Oliva	25-30
Algodão	18-20
Soja	18-20

Tabela 1. Oleagionosas utilizadas na produção de biodiesel e seus respectivos teores de óleo.

A utilização do biodiesel trás vantagens muito significativas, principalmente no aspecto ambiental. Características como, baixa toxicidade, biodegradabilidade, baixa

liberação de gases poluentes, principalmente o monóxido e dióxido de carbono, ausência de enxofre e compostos aromáticos, são as que tornam o biodiesel um combustível ecologicamente sustentável. A ausência total de enxofre em sua composição química é uma grande vantagem, pois não há emissão de gases sulfatados, diferente dos combustíveis de origem fóssil. Já, a ausência de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em sua composição, torna o combustível muito mais seguro de utilizar, transportar e armazenar. Além destas propriedades, o CO₂ liberado na queima do combustível, é reciclado, sendo reabsorvido durante o crescimento da massa vegetal que será utilizada como matéria prima do biodiesel, trazendo um equilíbrio entre massa de carbono fixada e liberada. Sendo assim, a produção do biodiesel está inserida num processo de contribuição efetiva para a diminuição de alguns sérios problemas ambientais, como a chuva ácida, o efeito estufa, alterações no perfil de precipitações pluviométricas, aumento do nível dos oceanos, bem como, mudanças climáticas drásticas (VASUDESAN E BRIGGS, 2008).

Alternativa economicamente viável para substituição dos combustíveis fósseis e minimização dos problemas ambientais, a produção de biodiesel em larga escala é altamente incentivada por países como Brasil, Estados Unidos e alguns da Europa, através de programas de subsídio e uso obrigatório em misturas com outros combustíveis (SUAREZ *et al.*, 2009). O biodiesel já é misturado ao diesel convencional em proporções de 2% (B2), 5% (B5) ou 20% (B20), podendo também ser utilizado regularmente na sua forma pura (B100), sem causar qualquer alteração no motor dos automóveis movidos a diesel (MA E HANNA, 1999; HANGANATHAN *et al.*, 2008). Pelo baixo teor de enxofre em sua composição, o biodiesel também tem função lubrificante, trazendo aumento de vida útil aos motores por combustão. (VASUDESAN E BRIGGS, 2008).

Através da publicação da Resolução nº14/2012 da Agência Nacional de Petróleo (ANP), ficaram estabelecidas as especificações do biodiesel (B100) a ser utilizado no Brasil conforme exposto na Tabela 2.

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE
Aspecto	-	LII (1)
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850 a 900
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0 a 6,0
Teor de água, máx.	mg/kg	-2

Contaminação Total, máx.	mg/kg	24
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100
Teor de éster, mín	% massa	96,5
Resíduo de carbono, máx. (4)	% massa	0,05
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,02
Enxofre total, máx.	mg/kg	10
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5
Fósforo, máx.	mg/kg	10
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1
Número Cetano (5)	-	Anotar
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	-7
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,5
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02
Glicerol total, máx. (9)	% massa	0,25
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,8
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,2
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,2
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,2
Índice de Iodo	g/100g	Anotar
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (10)	h	6

Tabela 2. Especificações do biodiesel a ser utilizado no Brasil.

3.1. Reação de Transesterificação

Apesar de existirem outras técnicas, a mais utilizada para produção de biodiesel tem sido a transesterificação. Também chamada de alcoólise, o procedimento envolve a produção de ésteres a partir da reação de triacilglicerídeos obtidos de óleos vegetais ou gorduras animais com álcool (metanol ou etanol), na presença de um catalisador e gerando glicerina bruta como subproduto, conforme pode ser visualizado na Figura 1. Este processo tem sido amplamente utilizado para evitar a alta viscosidade dos triacilglicerídeos (MEHER *et al.* 2006).

A reação de transesterificação é reversível e ocorre essencialmente, pela mistura dos reagentes, sendo acelerada pela presença de um catalisador (MEHER *et al.* 2006). No início do processo, o álcool reage com o catalisador formando alcóxido, que, por sua vez, reage com qualquer tipo de óleo vegetal ou gordura, formando biodiesel e glicerol (RANGANATHAN *et*

al., 2008). Por ser mais denso, o glicerol se deposita na parte inferior do reator por decantação, permanecendo o biodiesel, na parte superior (RANGANATHAN *et al.*, 2008).

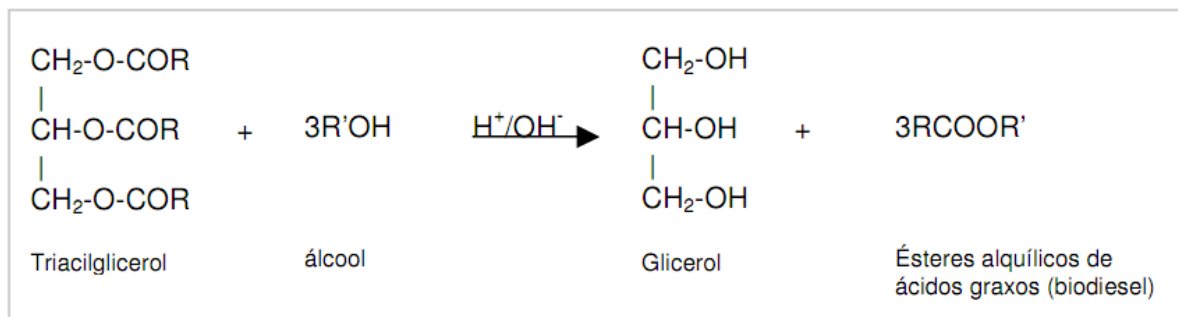


Figura 1. Reação de transesterificação de triacilglicerol (NETO, 2002).

R = Cadeia carbônica dos ácidos graxos (R = 12 – 24 C)

R' = Cadeia carbônica do álcool reagente (R' = 1 – 2 C)

Entre os alcoóis que podem ser utilizados na reação de transesterificação, o metanol e o etanol são os mais utilizados. Em virtude de suas características físicas e químicas vantajosas, como cadeia curta e polar, além do custo reduzido. Quando ocorre a utilização de metanol no processo, a reação passa a ser chamada de metanólise (FANGRUI E MILFORD, 1999). Pelo fato da reação ser reversível, o álcool é adicionado em excesso, para favorecer a formação dos produtos, os ésteres (MARCHETTI *et al.*, 2007).

Desta maneira, o rendimento da reação depende do deslocamento de equilíbrio em favor dos ésteres formados (MEHER *et al.*, 2006). Mesmo em baixas temperaturas (60°C) este é o processo mais eficiente para produção de biodiesel, alcançando rendimentos de reação próximos a 99% (NASSAREDDINE *et al.*, 2008). Buscando a otimização de parâmetros como a temperatura, a agitação, a concentração de catalisador com relação ao óleo, e principalmente, a razão molar álcool/óleo, pode-se obter rendimentos ainda maiores (NETO *et al.*, 1995).

Mesmo apresentando esta excelente produtividade, a produção mundial de biodiesel é relativamente limitada devido a alguns inconvenientes. Entre eles, pode-se citar a necessidade de utilização de óleos vegetais refinados, a dificuldade na recuperação do glicerol puro e, principalmente, a formação de subprodutos, como sabões, pigmentos, mono e diacilgliceróis, que podem deixar resíduos, prejudicando a qualidade do biodiesel (MARCHETTI *et al.*, 2007; RANGANATHAN *et al.*, 2008; ANTCZAC *et al.*, 2009). É importante, também, que os óleos vegetais utilizados na reação de transesterificação, tenham concentração reduzida de

ácidos graxos livres (AGLs), inferior a 0,5%, evitando assim, a formação de sabão e o comprometimento do rendimento de reação, bem como, da qualidade do produto final (MEHER *et al.*, 2006).

Após a finalização da reação de transesterificação e formação do produto de interesse, os monoálquil ésteres, algumas etapas ainda são necessárias para obtenção do biodiesel. A purificação do produto de interesse envolve etapas de neutralização e separação do catalisador, remoção do álcool que não reagiu, desodorização e remoção de pigmentos formados. A remoção do catalisador, particularmente, envolve muitas complicações e, para obter o biodiesel com o grau de pureza necessário, são requeridas repetidas lavagens (RANGANATHAN *et al.*, 2008).

A produção de biodiesel, através das reações de transesterificação, pode ocorrer por diferentes vias, empregando-se diferentes catalisadores para aceleração do processo (CANACKI, 2007; NARASSIMHARAO *et al.*, 2007). Geralmente utiliza-se catalisadores alcalinos, como o hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH), porém catalisadores ácidos, como o ácido sulfúrico e ácido sulfônico, catalisadores heterogêneos, bem como, enzimas, especificamente a lipase, também têm sido utilizados e descritos em literatura. Mais econômica e altamente eficiente, apenas a via alcalina é aplicada em escala industrial, normalmente em temperaturas superiores a 60°C. Os catalisadores ácidos tem produtividade de reação muito inferior e são altamente corrosivos, podendo causar danos aos equipamentos (MA e HANNA, 1999; MARCHETTI *et al.*, 2007; MEHER *et al.*, 2006; RANGANATHAN *et al.*, 2008; VASUDESAN E BRIGGS, 2008; ANTCZAC *et al.*, 2009).

A utilização de enzimas como catalisadores na produção de biodiesel, especificamente lipases, é uma estratégia promissora para eliminar algumas das desvantagens encontradas na via alcalina, além de trazer algumas vantagens significativas. As lipases utilizadas para produção de biodiesel podem ser obtidas de diferentes fontes, porém as lipases microbianas são as mais utilizadas pela facilidade de obtenção, custo reduzido de produção e facilidade em modificar suas propriedades visando sua imobilização (CASTRO *et al.*, 2004).

Ocorrendo geralmente em temperaturas mais amenas que a via alcalina, entre 20 a 60°C, a produção de biodiesel por transesterificação catalisada por lipase é aplicável aos óleos vegetais refinados e brutos, contendo ácidos graxos livres (AGLs), resíduos de gorduras, sebo e diversos alcoóis como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol.

(MARCHETTI *et al.*, 2007; SALIS *et al.*, 2008 ; DIZGE *et al.*, 2009). Catalisando reações de transesterificação e esterificação, a lipase facilmente converte gorduras contendo triacilglicerídeos e ácidos graxos livres, em biodiesel (MARCHETTI *et al.*, 2007).

Uma das grandes vantagens na utilização da via enzimática é a possibilidade de utilização do catalisador repetidas vezes no processo, juntamente com um pequeno excesso de álcool, trazendo altos rendimentos de reação e aumentando a produção de biodiesel (SALIS *et al.*, 2008 ; DIZGE *et al.*, 2009). Outra grande vantagem está na concentração de AGLs no óleo utilizado, que pode ser muito maior do que a permitida pela via alcalina, abrindo possibilidade de utilização de óleos anteriormente inviáveis. Além de todos esses avanços, na via enzimática, após o final do processo, a glicerina formada é simplesmente separada do biodiesel por decantação, não sendo necessárias, as etapas de neutralização e desodorização (RANGANATHAN *et al.*, 2008). A produção de biodiesel pela via alcalina ainda tem custos de produção mais baixos, porém, considerando as inúmeras vantagens que a rota enzimática trás ao processo, principalmente no que diz respeito à sustentabilidade e economia, as despesas são passíveis de comparação (RANGANATHAN *et al.*, 2008).

Permitindo a reutilização do biocatalisador, aumentando a estabilidade e manutenção da atividade enzimática frente à interação com o solvente, e, trazendo economias ao processo, além de inúmeras outras vantagens, a utilização de lipases na sua forma imobilizada, têm sido muito mais frequente nas reações de transesterificação de óleos e gorduras. Desta maneira, podendo ser utilizados para substituir os catalisadores químicos, a produção de biocatalisadores imobilizados visando à produção de biodiesel, tem se mostrado uma área extremamente promissora.

4. ENZIMAS

Enzimas são catalisadores que apresentam propriedades apropriadas para atuarem em uma grande variedade de processos químicos e podem ser encontrados em células animais, vegetais, bem como em microrganismos. (FABER, 1997). As enzimas são biocompatíveis, biodegradáveis e são derivadas a partir de recursos renováveis e os processos enzimáticos ocorrem em condições básicas de temperatura ambiente, pressão atmosférica e pH fisiológico, com altas taxas de seletividades. Além disso, a utilização de enzimas em geral proporciona

vias sintéticas que geram menos resíduos e que são mais eficientes do que a energia provida pela síntese orgânica convencional. Em suma, a utilização de reações enzimáticas é mais rentável e mais sustentável no processo industrial. Consequentemente, nas últimas duas décadas a biocatálise emergiu como uma tecnologia importante para atender à crescente demanda para a fabricação de produtos químicos verdes e sustentáveis, particularmente na síntese de produtos farmacêuticos, energia, fragrâncias, vitaminas e outros produtos de química fina (WOHLGEMUTH, 2010; SOLANO *et al.*, 2012).

A alta seletividade e especificidade combinada com uma alta atividade catalítica e alta eficiência em condições reacionais amenas são propriedades das enzimas que as tornam cada vez mais atrativas para utilização pelas indústrias. O alto poder catalítico das enzimas permite que estas acelerem reações químicas, aumentando sua velocidade por taxas de, pelo menos, um milhão de vezes maiores (STRYER, 1996).

As enzimas são específicas, tanto para as reações que catalisam, bem como para a interação com os substratos. Na maioria das vezes, uma enzima catalisa apenas uma reação química, ou um conjunto de reações intimamente relacionadas (FABER, 1997). A relação aos graus de especificidade e seletividade do substrato é geralmente alta. Grande parte do poder catalítico das enzimas está atribuído pela orientação favorável e disposição específica que ocorrem na ligação entre o complexo enzima-substrato. A atividade catalítica das enzimas pode ser controlada nesta fase. Os substratos se ligam a uma região específica da enzima, denominada sítio ativo, disposta em depressões ou fendas e que ocupa uma parte relativamente pequena do volume total de uma enzima (STRYER, 1996). Esta região contém os radicais de aminoácidos que participam diretamente do estabelecimento ou da ruptura de ligações, chamados de grupamentos catalíticos. A especificidade da ligação entre a enzima e o substrato, depende do arranjo dos átomos presentes no sítio ativo, o que influencia especificamente certas transformações oxidativas e conjugativas que ocorrem em altas velocidades catalíticas e com alta seletividade (STRYER, 1996; KOELLER & WONG, 2001; MARKOGLOU & WAINER, 2003).

Logo, devido a estas propriedades, enzimas têm sido utilizadas em várias aplicações nas indústrias alimentícia, têxtil, de papel e celulose e na agricultura para se obter reduções significativas nos custos de produção (HASAN *et al.*, 2006). A tecnologia de enzimas é multidisciplinar, e reconhecido pela Organização para a Cooperação Econômica e

Desenvolvimento (OCED) como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável de um país (VAN BEILEN, 2002).

4.1. Lipases

Enzimas hidrolíticas são as mais frequentemente utilizadas na química orgânica, (FABER, 1997) principalmente por sua ampla disponibilidade, baixo custo, facilidade de uso, sem necessidade do uso de cofatores, e alta especificidade para substratos (PANDEY *et al.*, 1999). As lipases, também chamadas de glicerol éster hidrolases, são enzimas que fazem parte do grupo das serina hidrolases, tendo como substrato, triglicerídeos. O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, e é frequentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo (BRADY *et al.*, 1990; CASTRO *et al.*, 2004).

O modo de ação das lipases assemelha-se ao das esterases, realizando a hidrólise das ligações ésteres-carboxílicas de acilgliceróis, formando ácidos graxos e glicerol. Além de clivar as ligações ésteres de triacilglicerídeos consumindo moléculas de água, as lipases também possuem capacidade de realizar a reação reversa em condições microaquosas, formando ligações ésteres a partir de álcool e ácido carboxílico (CASTRO *et al.*, 2004; GANDHI, 1997; YAHYA *et al.*, 1998). O deslocamento do equilíbrio da reação, no sentido direto, de hidrólise, ou inverso, de síntese, é controlado pela quantidade de água presente no meio reacional (GANDHI, 1997).

As lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização (esterificação intramolecular), conforme ilustrado na Figura 2.

Pela flexibilidade nas reações que catalisa e diferentes opções de substrato, esta enzima possui um potencial enorme de aplicações industriais (CASTRO *et al.*, 2004; GANDHI, 1997). O desenvolvimento de pesquisas envolvendo o uso de lipases em meios não convencionais, permitiu investigações de uma variedade de aplicações em potencial para meios não aquosos, trazendo grandes avanços na utilização industrial de lipases (CASTRO *et al.*, 2004). A Tabela 3 relaciona algumas das principais possibilidades de aplicações das lipases em diferentes ramos industriais. Recentemente, a utilização de lipases nos processos

de produção de biodiesel tem representado um campo de aplicação altamente promissor para estas enzimas (SHARMA *et al.*, 2001).

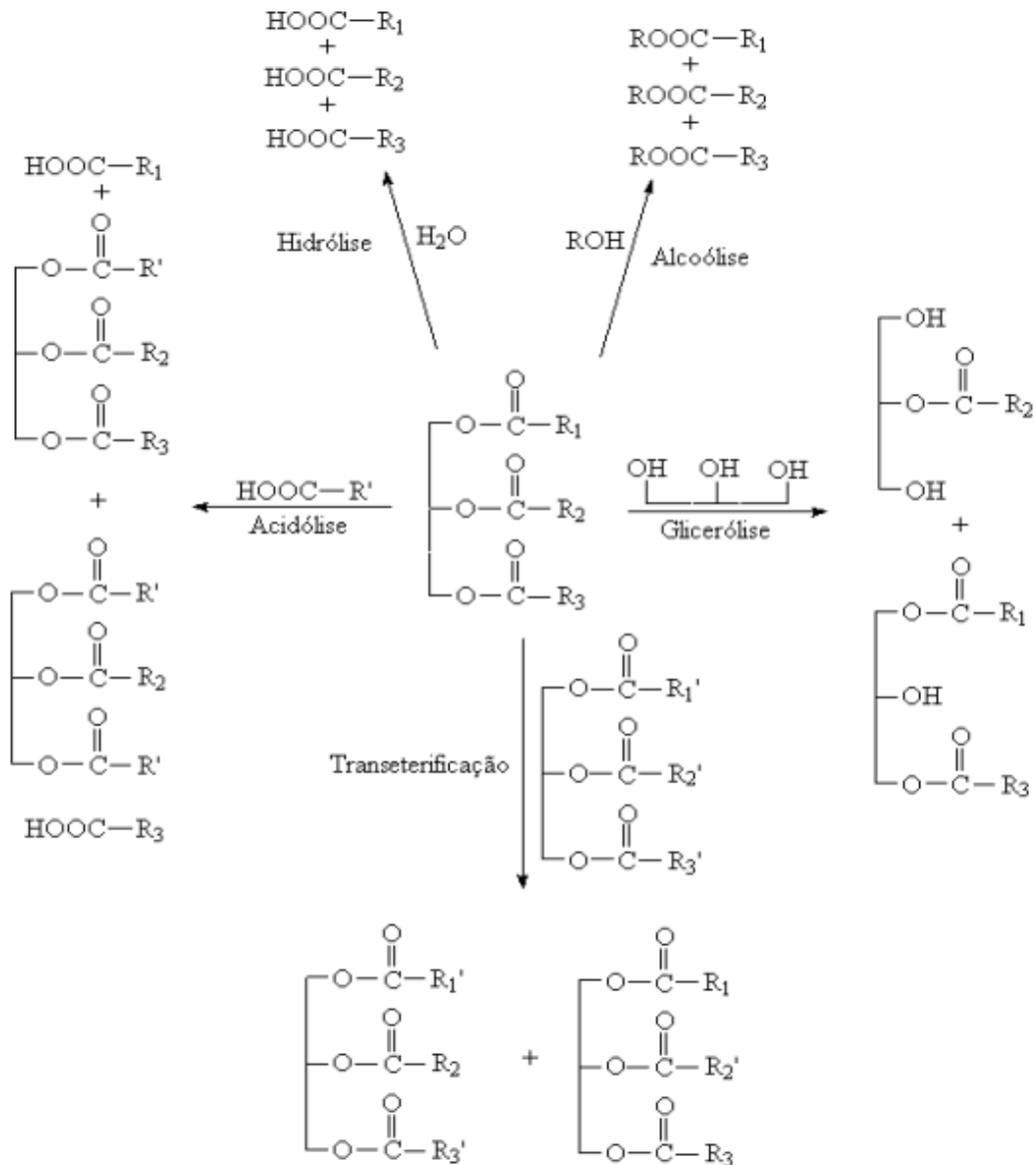


Figura 2. Reações catalisadas pelas lipases (CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases podem ser encontradas em células de tecidos animais, vegetais e também podem ser produzidas por fermentação de alguns micro-organismos, como fungos. Considerando o uso industrial e sob o foco econômico, as lipases produzidas por micro-organismos são mais favoráveis devido à facilidade de obtenção, baixo custo de isolamento e maior potencial de produção em grande escala (CASTRO, 1995; PASTORE *et al.*, 1997).

Indústria	Aplicação
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite
	Aumento do aroma, da qualidade e da vida de prateleira
Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração do processo fermentativo
Molhos e Condimentos	Aumento de propriedades funcionais da gema de ovo
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução no conteúdo de gorduras
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos – introdução de ácidos graxos de interesse em óleos e gorduras naturais
Química fina	Síntese de ésteres e resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Auxiliares de digestão
Médica	Determinação de lipídeos no sangue (biossensores)
Couro	Remoção de gordura da matéria-prima
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídeos de efluentes
Polpa e Papel	Remoção do “pitch”

Tabela 3. Aplicação de lipases em diferentes áreas industriais.

A grande maioria das enzimas produzidas por fermentação microbiana é extracelular, facilitando os processos de extração, purificação e garantindo maior estabilidade enzimática. O rápido crescimento celular, a facilidade em controlar as condições de cultivo, bem como avanços recentes na área de biotecnologia, possibilitaram o desenvolvimento de lipases microbianas em escala industrial, com alta atividade catalítica e custos reduzidos (JAEGER *et al.*, 1999; HASAN *et al.*, 2006).

De acordo com sua origem, algumas propriedades das lipases podem diferir. A massa molecular pode atingir de 20 a 75KDa, atividade em pH na faixa de 4 a 9, temperaturas variando desde ambiente até 70°C, o ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente ácidas e pI entre 4 e 5 (FERRER *et al.*, 2000; MAYORDOMO *et al.*, 2000). Lipases de diferentes fontes possuem o mesmo mecanismo de catálise das reações, porém, o desempenho sob mesmas condições reacionais pode diferir (YAHYA *et al.*, 1998).

Geralmente, as lipases são estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, e possuem atividade ideal na faixa de temperatura entre 30 a 40°C (VULFSON, 1994).

O método mais utilizado para determinar a atividade das lipases é a titulação dos ácidos graxos formados pela hidrólise do triacilglicerídeo, numa emulsão estabilizada com um agente tensoativo (FORESTI E FERREIRA, 2007; ANDREWES *et al.*, 2007). Apesar do efeito dos agentes emulsificantes em lipases não ter sido amplamente estudado, a goma arábica é o agente tensoativo mais utilizado, conduzindo elevada atividade lipolítica (VERGER, 1997).

Na ausência de tensoativos, a lipase se encontra numa conformação fechada, sem acesso ao sítio ativo, como ilustrado na Figura 3 (FÉRNANDEZ – LORENTE *et al.*, 2007).

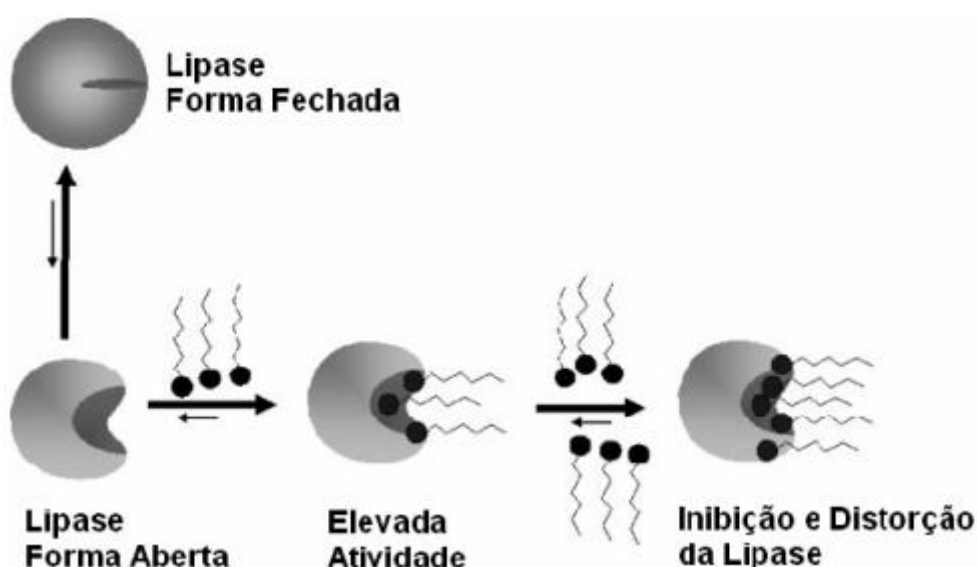


Figura 3. Mecanismo de influência de tensoativos sobre a atividade catalítica de lipases (FÉRNANDEZ – LORENTE *et al.*, 2007).

Com a adição de tensoativo, o equilíbrio é deslocado para a conformação aberta, expondo o sítio ativo e atingindo máxima atividade catalítica. No entanto, uma concentração elevada de agente tensoativo, pode inibir a atividade da enzima através da forte interação entre o sítio ativo e o agente tensoativo. Sendo assim, dependendo da concentração utilizada, um agente tensoativo pode modificar o equilíbrio da conformação da lipase para aberto, promovendo o aumento da velocidade máxima da enzima; ou causar a inativação enzimática,

pela inibição competitiva do sítio ativo, e até, possíveis distorções estruturais no sítio ativo, causando a redução da afinidade da enzima pelo substrato (FÉRNANDEZ – LORENTE *et al.*, 2007).

5. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

5.1. Histórico de Imobilização de Enzimas

O processo de imobilização de enzimas começou a ser estudado no início do século XX, em 1916, com os trabalhos de Nelson e Griffin, ao se observar que a invertase (*beta-frutofuranosidase*) adsorvida em carvão catalisava a hidrólise da sacarose. Em 1926, o Prof. James Sumner (Universidade de Cornell) isolou e cristalizou a primeira enzima, urease, que catalisa a hidrólise da uréia em NH_3 e CO_2 . Este trabalho proporcionou ao pesquisador o prêmio Nobel em 1946. Após estas descobertas iniciais sobre imobilização de enzimas em suportes insolúveis, o assunto só foi retomado novamente após a Segunda Guerra Mundial (CHIBATA, 1978).

Em 1954, pesquisadores alemães demonstraram que poderiam utilizar polímeros sintéticos, resina diazotada de poliaminoestireno, para imobilização de proteínas com a permanência da atividade biológica. Neste estudo foram utilizadas as enzimas pepsina, diastase, ribonuclease e carboxipeptidase (BON *et al.*, 2008). No mesmo período também foram publicados os resultados sobre a imobilização da catalase por ligação iônica em DEAE-celulose, e, da tripsina, papaína, amilase, ribonuclease em gel de poliacrilamida. Neste estudo, foi demonstrado pela primeira vez o método de ligações cruzadas, com o uso da carboxipeptidase com glutaraldeído (CHIBATA, 1978).

O grande avanço na tecnologia de imobilização de enzimas aconteceu a partir de 1960, quando houve aumento significativo no número de publicações sobre o assunto, principalmente pelo grande potencial e vantagens econômicas que a técnica de imobilização poderia oferecer à indústria. A primeira aplicação industrial de enzima imobilizada ocorreu em 1969, quando Chibata e colaboradores da companhia Japonesa Tanabe Seiyaku Co., desenvolveram um procedimento de imobilização da enzima fúngica aminoacilase num suporte chamado de DEAE-Sefadex por ligação iônica. Eles queriam produzir a hidrólise

estéreo seletiva de *N*-acil-*D,L*-aminoácidos com a finalidade de se obter *L*-aminoácidos e *N*-acil-*D*-aminoácidos (CHIBATA, 1978). No mesmo período, quase que simultaneamente, iniciou-se o processo de produção de xarope de frutose a partir de amido de milho, com a utilização de glicose isomerase imobilizada sobre DEAE-Sefadex (GERHARTZ, 1987).

Até metade da década de 1960, a grande maioria dos estudos realizados com enzimas imobilizadas era realizada por pesquisadores de áreas básicas, que notaram a grande eficiência e especificidade que poderiam obter com a utilização destes sistemas na área de biocatalisadores industriais. Assim, surgiu também, uma grande preocupação em buscar suportes que apresentassem boa resistência química e mecânica, visando prolongar o uso do biocatalisador (VIETH, 1994). Desta maneira, as técnicas de imobilização de enzimas ficaram mais conhecidas a partir dos anos 60 (BORZANI *et al.*, 2001), e métodos e combinações de procedimentos passaram a ser estudados, observando-se que as propriedades catalíticas das enzimas poderiam ser alteradas em função do procedimento e/ou suporte utilizados (VIETH, 1994).

Com estes avanços, finalmente tiveram início estudos de aplicação de enzimas imobilizadas em biorreatores contínuos, considerado o marco da contribuição dos engenheiros químicos para projeto de biorreatores, conforme expõe Vieth (1994). Mundialmente reconhecida, a importância da utilização de enzimas imobilizadas em processos industriais resultou na realização da primeira Conferência em Engenharia Enzimática, em 1971, onde se estabeleceu o uso do termo “enzima imobilizada”, empregado por Katchalski-Katzir, para biocatalisadores ligados a suportes insolúveis ou confinados a espaços definidos (HARTMEIER, 1988). Desde então diferentes técnicas em imobilização de enzimas vem sendo cada vez mais estudadas. A imobilização também pode ser aplicada em microrganismos, facilitando sua utilização em processos de fermentação contínua (ROBLE *et al.*, 2000). Logo o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de imobilização de enzimas levam a novos e promissores campos de atuação para a biocatálise, o que pode implicar em grandes avanços tecnológicos e redução de custos dos processos industriais.

5.2. Definição

Possibilitando a manutenção de suas atividades catalíticas e aumento da estabilidade, a imobilização de enzimas caracteriza-se pelo confinamento ou localização física desta macromolécula em determinada região de espaço definido, permitindo sua utilização repetidamente e continuamente devido à facilidade de sua separação do meio reacional e aumentando a rapidez e exatidão do processo (GUISAN, 2006).

Do ponto de vista comercial, em relação às enzimas livres, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são: aproveitamento da atividade catalítica da enzima por um maior período de tempo; operar de forma contínua; facilidade em separar a enzima imobilizada do meio reacional; atividade enzimática superior por unidade de volume e maior estabilidade em condições reacionais extremas como altas temperaturas e variações de pH.

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso em processos industriais. Para prevenir sua inativação e garantir a eficiência da atividade catalítica enzimática em determinado processo, é necessário proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é feita a reação, bem como, das variações de condições da reação, como temperatura e pH. As diferentes técnicas de imobilização desenvolvidas recentemente têm sido de grande importância para contornar este problema (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Esses efeitos adversos podem ser evitados ou diminuídos pela escolha criteriosa do suporte, ou pelas condições de utilização da enzima no meio reacional. Para melhor aproveitamento da técnica, recomenda-se o uso de elevadas concentrações de enzima com relação ao suporte (MARKOGLU E WAINER, 2003). De acordo com Markoglou e Wainer (1976), alguns aspectos como estabilidade, propriedades cinéticas, especificidade, bem como atividade catalítica da enzima, devem ser também avaliados e considerados como pontos a serem discutidos, para que os efeitos da imobilização sobre a enzima não sejam desvantajosos. Estudos apontam que várias estratégias podem ser utilizadas para aumentar a estabilidade de enzimas imobilizadas.

Enzimas são materiais de alto custo, e o processo de imobilização possibilita o aumento do potencial e da estabilidade dessas macromoléculas, como catalisador em escala industrial, bem como proporciona o reaproveitamento da mesma (BORZANI *et al.*, 2001;

CASTRO; ANDERSON, 1995; GOODENOUGH; LAW, 1991; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; LIM *et al.*, 2003; MALCATA *et al.*, 1990; OLSON; RICHARDSON, 1974; ROBLE *et al.*, 2000).

A principal razão para isolar enzimas, está na facilidade de isolamento do produto da reação para sua reutilização, além do aumento do tempo de vida da enzima em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação de pH, sem perda considerável da atividade catalítica (ZANGH *et al.*, 1998; GIRELLI *et al.*, 2007). A imobilização, também auxilia a dispersão homogênea da enzima no meio reacional, essencial para a condução eficiente de reações enzimáticas (CASTRO e ANDERSON, 1995; VILLENEUVE *et al.* 2000). Logo a aplicação da tecnologia de imobilização enzimática no setor industrial resulta num maior rendimento do processo, reduzindo, conseqüentemente, os custos da operação, além da redução na quantidade de resíduos gerados (CASTRO *et al.*, 2004; KRAJEWSKA, 2004; HASAN *et al.*, 2006). Por outro lado, a redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais, conformacionais, microambientais, aleatoriedade da ligação enzima/suporte e a dessorção das enzimas com o uso, são desvantagens significativas que podem surgir com a imobilização de enzimas (BORZANI *et al.*, 2001; REGULY, 2000).

A atividade catalítica da enzima imobilizada em um determinado suporte pode ser alterada devido à fragmentação do suporte pela interação com o sistema de agitação. Assim, durante a reação, a enzima pode ser removida do suporte devido a essa interação, promovendo perda de atividade devido à lixiviação, e não por inativação da enzima. Em contrapartida, se essa lixiviação não ocorrer e a enzima permanecer ligada ao suporte, o aumento da área de superfície de contato poderá ajudar no aumento da transferência de massa, aumentando conseqüentemente a eficiência da enzima como catalisador (BOSLEY, 1997; YADAV, 2005; HURTADO, 2006; RAMPIN, 2007). Todavia, para a imobilização ser um procedimento vantajoso no processo industrial, há necessidade de que a estabilidade da preparação final da enzima seja suficientemente alta para permitir seu reuso (MATEO *et al.*, 2007).

Estudos nesta área têm mostrado significativos avanços e novas técnicas de imobilização e isolamento têm sido desenvolvidas, possibilitando modificação das propriedades cinéticas e da estabilidade destas moléculas, facilitando sua recuperação e reutilização, e contribuindo com o aumento no seu potencial de aplicações e na viabilidade

econômica dos procedimentos (MARCONI, 1989; CASTRO *et al.*, 2004; GUISAN, 2006; MATEO *ET AL.*, 2007).

Após seu uso, a enzima imobilizada é inativada e torna-se resíduo para as indústrias, assim como o suporte utilizado. A maioria dos suportes utilizados nos processos de imobilização tem custo elevado, desta maneira, processos de imobilização que permitam a dessorção da enzima após a sua inativação e reaproveitamento do suporte são muito atrativos industrialmente. Métodos de imobilização que envolvem interações mais fracas entre a enzima e o suporte, possibilitam a dessorção do biocatalisador e reaproveitamento do suporte (TORRES *et al.*, 2005).

5.3. Tipos de Imobilização

De forma geral, de acordo com Buchholz *et al.*, (2005), os métodos de imobilização enzimática podem ser agrupados em três grandes categorias, baseadas na interação física (adsorção), interação química (ligações iônicas, ligações covalentes e ligação de cross-linking) e na retenção física da mesma (entrapamento e encapsulação), porém para cada aplicação é necessário escolher o procedimento mais adequado, como ilustrado na Figura 4. A atividade catalítica e outras características das enzimas podem mudar dependendo do tipo de retenção (química ou física) e da força da interação entre a enzima e o suporte utilizado, podendo, em alguns casos, causar distorções estruturais na proteína, levando a um aumento da ineficiência da técnica (MARKOGLOU, 1976; MARCONI, 1989; BALCAO *ET AL.*, 2001; MARKOGLOU, 2003).

Baseada na interação física, a primeira categoria envolve as interações que ocorrem entre a enzima e um suporte externo, classificadas como ligações hidrofóbicas e de Van Der Waals. A interação física é a mais fraca para manter a enzima fixada a um suporte sob rigorosas condições industriais.

A segunda categoria é baseada nas ligações químicas estabelecidas entre a enzima e o suporte, podendo estas, serem iônicas, covalentes ou covalentes cruzadas. A ligação iônica é geralmente mais forte do que a interação física e em geral evita o processo de lixiviação. Ligações covalentes possuem boa adesão da enzima ao suporte, porém têm a desvantagem de ser uma reação irreversível, podendo levar a uma desativação enzimática, inutilizando ambos.

Suportes típicos utilizados para a imobilização de enzimas são: resinas sintéticas, biopolímeros, sólidos inorgânicos e zeólitos.

Nos procedimentos que envolvem ligação cruzada (cross-linking) de enzimas, utiliza-se um reagente bifuncional para preparar macropartículas que carregaram a enzima. Normalmente esta técnica utiliza a formação de cristais (macropartículas) preparados por pulverização. A adição de agentes precipitantes tais como acetona, sulfato de amônio, etanol ou 1,2-dimetoxietano é seguida por um agente de ligação cruzada como glutaraldeído.

O grupo de procedimentos representado pelo processo de retenção física da enzima (encapsulamento ou entrapamento) envolve a inclusão da enzima em uma rede polimérica, sol de sílica-gel, membrana ou microcápsula. As restrições físicas são geralmente muito fracas, porém para se evitar o processo de lixiviação, muitas vezes se utiliza componentes químicos para a formação de ligação covalente adicional.

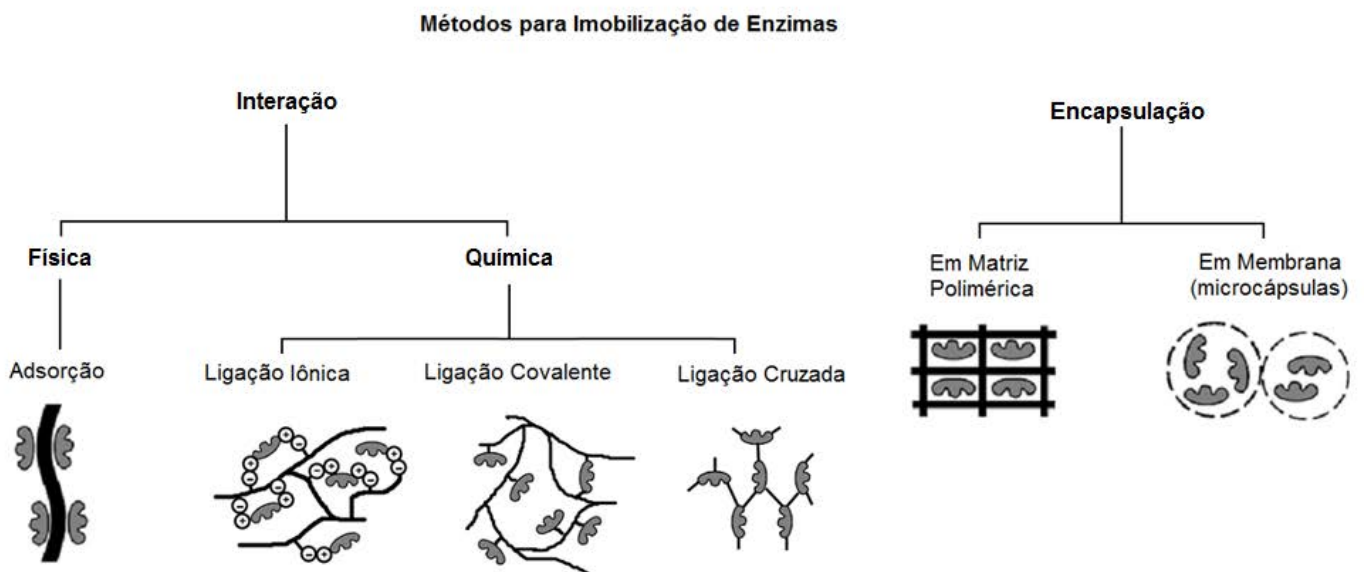


Figura 4. Métodos de imobilização de enzimas.

Muitos pesquisadores não entendem a diferença entre os métodos de encapsulamento, interação ou ligação a um suporte. Para esclarecer, pode-se dizer que a interação ou ligação enzimática a um suporte pré-fabricado, independentemente do fato de a enzima estar situada sobre a superfície externa ou interna do mesmo, considera-se ligação a um suporte. Já, o encapsulamento requer a síntese do futuro suporte na presença da enzima.

5.3.1. Imobilização por Adsorção

Dentre os métodos empregados para imobilizar enzimas, a adsorção é o método mais utilizado, pois é o método mais simples, de menor custo e que menos influencia a atividade catalítica da enzima. As interações envolvidas são eletrostáticas, como forças de Van Der Waals, ligação iônica, ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica. Estas interações são relativamente fracas quando comparadas as ligações covalentes, porém se coexistirem em um grande número pode resultar em uma boa eficiência de imobilização (PAIVA *et al.*, 2000). As vantagens da técnica de imobilização por adsorção estão relacionadas, principalmente, ao fato do procedimento não causar praticamente nenhum, ou apenas pequenos danos à enzima. Adicionalmente, não ocorre modificação química do suporte ou da enzima, pois não são utilizados reagentes tóxicos, permitindo a reutilização do suporte, além do fato de ser uma metodologia simples, rápida e barata. Como desvantagens pode-se citar a perda do material adsorvido durante a reação, formação de ligação não específica entre a enzima e o suporte, e sobrecarga do suporte e impedimento estérico (BICKERSTAFF, 1997).

O procedimento consiste basicamente em misturar por um tempo determinado, o material a ser adsorvido e o suporte, sob condições adequadas de pH, força iônica e temperatura. Em seguida, o material deve ser coletado e lavado, com a finalidade de remover as enzimas que não foram adsorvidas ao suporte, restando apenas o material imobilizado ao suporte. (PAIVA *et al.*, 2000). Além da condução e realização adequada do procedimento, Villeneuve *et al.* (2000) acredita que o sucesso e a eficiência da adsorção física da enzima ao suporte dependem de variáveis que envolvem características e parâmetros da enzima, do suporte e do meio reacional, como: tamanho e concentração da enzima, polaridade da enzima, temperatura do meio, agitação, ligação iônica estabelecida entre a enzima e o suporte, área superficial do suporte (porosidade e tamanho dos poros), bem como, estabilidade química e física, resistência mecânica e natureza hidrofóbica e hidrofílica do suporte.

Em algumas situações, durante a preparação, uma enzima fortemente adsorvida a um suporte pode ter sua conformação alterada e ser dessorvida. A ligação da enzima com o substrato, ligação da enzima com contaminantes presentes no substrato, mudança do meio reacional devido à formação de produto, são exemplos de situações que podem alterar a conformação da enzima provocando a dessorção. Fatores físicos como fluxo, agitação e

aumento da temperatura também podem provocar a dessorção (BICKERSTAFF, 1997). Na maioria das vezes, a dessorção é uma grande desvantagem durante a utilização da metodologia de imobilização por adsorção, porém este processo pode ser positivo quando se deseja remover do suporte, uma enzima com atividade diminuída e adsorver uma nova (BICKERSTAFF, 1997).

A maioria das metodologias desenvolvidas por adsorção envolve a utilização de suportes inorgânicos como: sílica, (PETRI *et al.*, 2005), zeólitos (DIAZ & BALKUS, 1996) e sílicas mesoporosas (ZHOU & HARTMANN, 2012). Também se pode citar a tecnologia de granulação para imobilizar enzimas em grânulos de sílica (KIRK & CHRISTENSEN, 2002). Estes granulados são adequados apenas para utilização em meios orgânicos. Num meio aquoso, a enzima sofre o processo de dessorção, desintegrando-se lentamente da partícula. No entanto, os grânulos de sílica podem ser utilizados diretamente numa síntese de ésteres, se a água for removida por evaporação a vácuo, aplicando os grânulos em reatores para minimizar o tempo de contato com a água. Este procedimento tem a intenção de manter a estabilidade num ambiente aquoso para que a enzima estabeleça ligação covalente com a sílica funcionalizada.

Sílicas mesoporosas muitas vezes referidas como nanosílicas, apresentam várias vantagens como suportes. Elas têm um diâmetro de poro uniformes (2-40 nm), as áreas de superfície muito elevada ($300-1500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), volumes de poro (*ca.* 1 g ml^{-1}) sendo estáveis a temperaturas elevadas. Além destas características, a superfície pode ser facilmente funcionalizada. Os poros dilatados destes materiais podem acomodar relativamente pequenas enzimas. Se a enzima estiver situada no interior dos poros ou sobre a superfície externa pode-se determinar, por comparação, a imobilização em material calcinado e não calcinado. Se estes valores forem aproximadamente os mesmos, então a maior parte da enzima está na superfície exterior, enquanto que, quando o material calcinado adsorve muito mais enzima, isso indica que a maior parte da enzima está nos poros.

Polímeros polissacáridos insolúveis em água, tais como celulose, amido, agarose e quitosano e proteínas como gelatina e albumina, também têm sido amplamente utilizados como suportes para a imobilização de enzimas (KRAJEWSKA, 2004). Outro tipo de suporte são as resinas acrílicas porosas. Recentemente, a enzima *C. antarctica* Lipase B , (KIRK & CHRISTENSEN, 2002) foi imobilizada sobre o suporte Novozym 435, resultando numa

imobilização por adsorção sobre uma resina macroporosa. Porém uma desvantagem dessa técnica é que sem a formação de ligações covalente, a enzima pode sofrer processo de lixiviação num meio aquoso, na presença de substratos, e/ou produtos surfactantes. Em outro artigo, a fim de suprimir o problema da lixiviação utilizou-se Eupergit C que possui ligações covalentes à superfície das resinas (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000). Eupergit C é um composto altamente hidrofílico, estável quimicamente e mecanicamente, que pode ser utilizado entre os pH 0-14, não sofrendo problemas de expansão ou encolhimento, o que pode ocasionar perda da enzima depositada. A ligação a proteínas envolve a reação de oxirano, presentes na superfície do suporte, com os grupos amino livres da enzima para formar ligações covalentes, que proporciona uma alta estabilidade mesmo em pH 1 a 12.

5.3.2. Imobilização por Ligação Covalente

Este método de imobilização envolve a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte, estabelecida por meio de grupos funcionais presentes na superfície do suporte. De acordo com Perez *et al.* (2007), a imobilização por ligação covalente vem sendo bastante estudada pois a ligação formada entre enzima e suporte é a mais estável dentre todas as interações possíveis nos processos de imobilização. Sendo assim, Kim *et al.* (2006), considera que esta metodologia é extremamente eficiente, trazendo melhoria da estabilidade da enzima. Conforme Girelli e Mattei (2005), dentre as vantagens encontradas, a metodologia de imobilização por ligação covalente evita o fenômeno de dessorção, além de aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica da enzima, diminuindo a velocidade de desativação espontânea enzimática. As ligações covalentes promovem rigidez na estrutura da enzima, limitando seu movimento quando submetida às altas temperaturas ou mudanças de pH. Contudo, a principal desvantagem deste método de imobilização está na facilidade em ocorrer alteração na estrutura terciária nativa da enzima, com subsequente redução da atividade catalítica enzimática. De acordo com Chibata (1978), em alguns casos, a ligação covalente altera a estrutura conformacional e/ou centro ativo da enzima, podendo resultar em uma diminuição da atividade catalítica e/ou mudança da especificidade enzimática pelo substrato, apresentando então um resultado desvantajoso para o processo.

No processo de imobilização por ligação covalente é imprescindível considerar os aminoácidos presentes na enzima e seus respectivos grupos funcionais, por meio dos quais a enzima pode ser ligada ao suporte, bem como, avaliar as características físicas e químicas do suporte, as quais possibilitarão sua ligação com a enzima. Existem 20 aminoácidos distintos que podem fazer parte da estrutura de uma enzima. Por consequência de sua estabilidade química, apenas alguns grupos funcionais de aminoácidos podem participar da ligação covalente com o suporte, sendo fundamental que os mesmos não estejam envolvidos com a função de atividade catalítica da enzima. Dentre estes grupos temos: NH_2 terminal de todas as proteínas; grupos amino (NH_2) da lisina e arginina; grupos carboxílicos (COOH) do ácido aspártico e glutâmico; hidroxilas (OH) da serina e treonina; e os grupos sulfidrílicos (SH) da cisteína. (MORENO *et al.*, 1997; PEREZ *et al.*, 2007). Grande parte das enzimas possuem em sua superfície, diversos resíduos de lisina que geralmente não estão envolvidos com o sítio ativo e são altamente reativos com diversos grupos funcionais como aldeídos, epóxi, ciano brometo e outros, não necessitando de nenhum processo prévio de ativação. Sendo assim, o NH_2 -terminal das proteínas e o grupo amino da lisina são os grupamentos mais utilizados na imobilização por ligação covalente (MATEO *et al.*, 2005). Em contrapartida, algumas enzimas não possuem grupos funcionais livres suficientes, necessitando de um processo conhecido como ativação química, onde os grupos funcionais são modificados por meio de reações químicas e ficam disponíveis para reagir com o suporte.

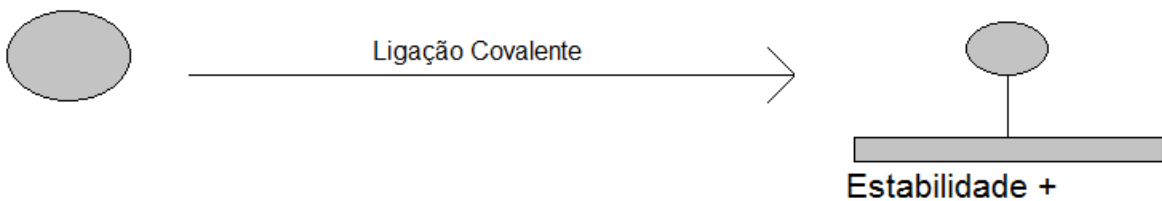
Com relação à quantidade de ligações covalentes existentes no complexo enzima/suporte, pode-se classificar a interação enzima/suporte como monopontual, quando há somente uma ligação covalente entre enzima e suporte, ou multipontual, quando a enzima se liga ao suporte por meio de várias ligações covalentes (GUISÁN, 1988).

A imobilização multipontual tem como principal vantagem, uma maior resistência da enzima às modificações estruturais frente a meios adversos como temperatura, pH extremos e presença de solventes orgânicos, resultando em maior estabilidade enzimática (GUISÁN, 1988). Com relação às desvantagens presentes na imobilização multipontual, a mais relevante está relacionada à diminuição do potencial catalítico da enzima imobilizada, em virtude da participação de aminoácidos fundamentais para a atividade catalítica, nas ligações covalentes. De acordo com Guisán (1988), outra desvantagem é o impedimento estérico, que é provocado com a proximidade dos átomos, o qual pode ser amenizado com o uso de agentes que

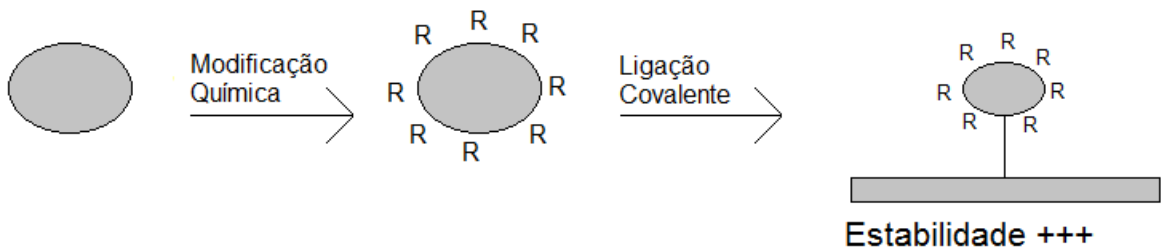
funcionam como braços espaçadores, permitindo maior mobilidade enzimática sem diminuir a eficiência da imobilização.

A Figura 5 esquematiza os diferentes tipos de ligação covalente entre enzima e suporte, bem como representa a estabilidade enzimática resultante de cada procedimento de imobilização.

Imobilização por ligação covalente monopontual entre enzima e suporte



Imobilização pontual de enzima modificada quimicamente



Imobilização multipontual de enzima modificada quimicamente

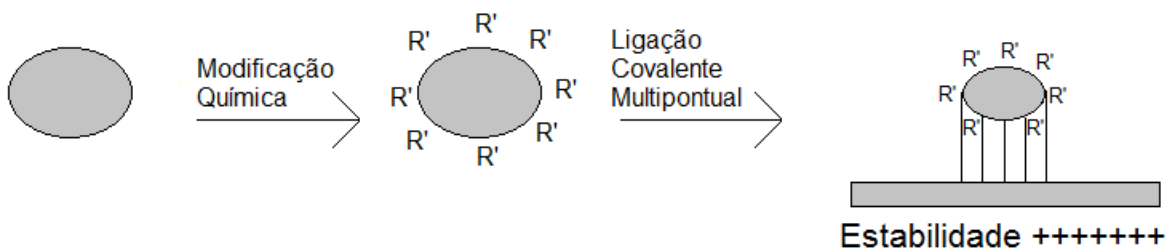


Figura 5. Tipos de imobilização por ligação covalente.

Conforme já mencionado, a imobilização por ligações covalentes ocorre por meio de ligações químicas entre grupos funcionais da enzima, que não são essenciais para a atividade catalítica, e grupos reativos do suporte. Todavia, de acordo com Bickerstaff (1997), poucos suportes contêm naturalmente esses grupos reativos que permitem a ligação direta da enzima. Desta maneira, em grande parte das vezes, os suportes necessitam ser submetidos a um processo conhecido como ativação, no qual estes são modificados por meio de reações

químicas, introduzindo grupamentos reativos na sua superfície. Pode-se dizer então, que duas etapas são fundamentalmente necessárias no procedimento de imobilização por ligação covalente. Primeiramente, por meio do uso de reagentes específicos, é feita a ativação dos grupos funcionais do suporte e, em seguida, a enzima é adicionada para formar a ligação covalente com o suporte ativado.

5.3.3. Imobilização por Ligação Cruzada ou Cross-linking

No início dos anos 1960, estudos de química de proteínas em fase sólida levaram à descoberta de que a reação dos grupos NH_2 superficiais de enzimas dissolvidas com um produto químico bifuncional de reticulação formavam ligações cruzadas, originando enzimas insolúveis reticuladas. A insolubilização de enzimas por este método envolve a formação de ligação covalente entre moléculas de enzima e reagentes bifuncionais de baixa massa molar, formando agregados unidos por ligações intermoleculares. No entanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens como: baixa retenção de atividade, falta de reprodutibilidade, baixa estabilidade mecânica, e dificuldades em lidar com estruturas gelatinosas. A estabilidade mecânica e facilidade de manuseamento puderam ser melhoradas, através da reticulação da enzima numa matriz de gel, mas isto conduziu a uma diminuição da atividade enzimática.

Considerando estudos sobre imobilização e por conta dessas desvantagens, no final de 1960 passou-se o foco para a utilização de agentes cross-linking, que se tornou a metodologia mais utilizada para a imobilização de enzimas durante as próximas três décadas. Vários meios distintos estão disponíveis para o preparo de derivados insolúveis de enzimas por ligação cruzada, usando reagentes bifuncionais de baixa massa molar. O sucesso da reação depende das condições experimentais e varia de acordo com a enzima e o reagente escolhido. (YANG *et al.*, 1995; BILLIAR *et al.*, 2001). Dentre os diversos reagentes bifuncionais existentes, destaca-se o glutaraldeído como reagente mais utilizado nos dias atuais, em função de sua rápida reação com grupos amino superficiais na molécula da enzima (WADA *et al.*, 1993; BASSO *et al.*, 2003). Outro reagente muito utilizado é a carbodiimida em função de sua fácil reação com grupos carboxilas (DIJKSTRA *et al.*, 2001; PALMISANO *et al.*, 2001). O caráter reversível ou não das reações de imobilização por ligação cruzada e, portanto, a

estabilidade da ligação obtida, depende do tipo de reagente bifuncional (NAHAR *et al.*, 2001).

Um aspecto importante a ser ressaltado é o fato de que o método de ligação cruzada não envolve a associação da enzima com um suporte sólido. O produto da ligação de várias moléculas de enzimas por meio de reagentes bifuncionais é que se torna insolúvel e precipita, sem causar a desnaturação, formando um agregado sólido cataliticamente ativo, mantidos unidas por ligação não-covalente. (FERNANDES *et al.*, 2010).

5.3.4. Imobilização por Agregados de Enzimas Reticulados

A partir da metodologia de imobilização por agregação enzimática por retículos, desenvolveu-se uma nova tecnologia para a imobilização de enzimas, os chamados agregados de enzimas reticulados (CLEA). Uma vez que a precipitação a partir de um meio aquoso, através da adição de sulfato de amônio ou polietilenoglicol, é frequentemente utilizada para purificar as enzimas, a metodologia CLEA essencialmente combina a purificação e imobilização em uma única operação e não exige enzimas de elevada pureza. A CLEA pode ser empregada para imobilização direta de enzimas a partir de um caldo de fermentação em bruto.

Outros estudos que envolvem esta técnica abordam aprisionamento da enzima em solução de sílica gel, preparada por polimerização hidrolítica de tetraetoxisilano. Porém até agora, géis derivados de silano modificados com ácido láurico em 1-octanol têm demonstrado atividades enzimáticas muito baixas (REETZ *et al.*, 1995). Em contraste, quando se prepara sol-gel a partir de uma mistura de Si (OMe)₄ e RSi (OMe)₃, produz-se uma matriz mais hidrofóbica apresentando melhorias na atividade enzimática, em comparação com o pó liofilizado correspondente. Este método tem sido amplamente utilizado para a imobilização de enzimas (PIERRE, 2004).

Uma modificação interessante tem sido a adição de suportes porosos, tais como celite, durante o processo sol-gel, para ligar os géis contendo a enzima. Esta "dupla imobilização" proporciona materiais com maior estabilidade térmica e altas taxas de atividade enzimática (REETZ *et al.*, 1996). Lipases de *Burkholderia cepacia* e *Candida antarctica* foram aprisionados em aerogel de sílica, preparados a partir de misturas de Si (OMe)₄ e MeSi

(OMe)₃ e reforçados com fibra de quartzo de sílica, onde obteve-se ótimas propriedades mecânicas (ORÇAIRE, 2006).

5.3.5. Imobilização por Encapsulamento

A imobilização de enzimas por encapsulamento em matrizes ou cápsulas poliméricas é outra técnica bastante difundida. O procedimento consiste em confinar a enzima em um polímero insolúvel, poroso. Envolvendo o material biológico em membranas semipermeáveis, a enzima fica livre no meio reacional, mas restrita a um espaço físico (SCHONS, 2012). A principal vantagem deste procedimento está no fato da enzima ter sua estabilidade mantida, pois interações físicas ou ligações químicas não são estabelecidas entre a enzima e o suporte. Além disto, a disponibilização de grande área superficial para o contato entre o substrato e a enzima no interior de um volume relativamente pequeno, aumenta a atividade catalítica da enzima. A possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa, também é uma grande vantagem oferecida pela utilização deste método de imobilização (VILLENEUVE, 2000).

Proteínas com elevadas massas molares não conseguem penetrar no interior de uma cápsula, contudo substratos e produtos de menor massa molar podem passar livremente pela membrana semipermeável. Consequentemente, somente substratos de baixa massa molar podem ser empregados com este tipo de enzima imobilizada, e esta é uma das principais desvantagens deste tipo de imobilização. A possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização, a necessidade de uma alta concentração enzimática necessária para garantir a encapsulação, bem como os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substratos no interior da matriz porosa, também são desvantagens significativas na utilização desta técnica. Outra grande desvantagem é a limitação difusional, que pode levar à ruptura da membrana e liberação da enzima (ROSEVEAR *et al.*, 1987; SCHONS, 2012).

De acordo com Rosevear *et al.* (1987), os métodos de imobilização por encapsulamento incluem encapsulação em gel, encapsulação em fibras e microencapsulação. O método de encapsulação em gel envolve a retenção da enzima no interior de uma matriz polimérica insolúvel no meio reacional. A maior parte dos métodos baseia-se na mistura da enzima com um fluido precursor do gel e subsequente gelificação por polimerização ou

precipitação, ficando a enzima distribuída no interior da matriz. As matrizes mais utilizadas são normalmente as hidrogel, que podem ser obtidas nas mais variadas formas.

De acordo com Fernandes e Cabral (2006), a preparação de enzimas imobilizadas no interior de fibras pode ser feita pela dissolução de polímeros, como o acetato de celulose, em um solvente orgânico imiscível em água, seguida da emulsificação da solução formada com a solução aquosa que contém a enzima. Após esta etapa, usa-se a emulsão em um líquido coagulante (tolueno ou éter de petróleo) para precipitar o polímero na forma de filamentos. No interior do polímero são retidas as microgotas da solução contendo a enzima.

5.4. Propriedades das Enzimas Imobilizadas

De modo geral, o processo de imobilização enzimática tem efeito benéfico na sua estabilidade. As propriedades físicas e químicas da enzima imobilizada são influenciadas pelas características da enzima e do material do suporte, e podem sofrer modificações após o processo de imobilização, promovendo o aumento ou diminuição da atividade enzimática. De acordo com Tischer e Kasche (1999), a interação entre estes dois componentes resulta em complexo com propriedades químicas, biológicas, mecânicas e cinéticas específicas.

Efeitos adversos podem ser evitados ou diminuídos pela escolha criteriosa do suporte, ou pelas condições de operação da enzima no meio reacional. Para melhor aproveitamento da técnica, recomenda-se o uso de elevadas concentrações de enzima com relação ao suporte (MARKOGLOU E WAINER, 2003).

A escolha do método empregado e do tipo de suporte utilizado, está relacionada a vários fatores. Entre eles podemos destacar: características particulares da biomolécula, incluindo ligações químicas e físicas entre a biomolécula e o suporte, condições de uso do sistema imobilizado, manutenção da atividade catalítica da enzima, facilidade na separação do produto final, e maior custo/benefício. (CORCORAN, 1985; VITOLO, 1988; VILLENEUVE, 2000; DALLA-VECCHIA, 2004; LOPEZ-GALLEGO, 2005a; HANEFELD, 2009).

Dentre os vários parâmetros moleculares individuais, que devem ser considerados na escolha da enzima e do suporte, os mais importantes, incluindo pH, temperatura, pressão, agitação, liberação de cofatores e outros, são apresentados na Tabela 4, adaptada de Tischer e Kasche (1999).

<i>Enzima</i>	Propriedades Bioquímicas: Massa molar, grupos funcionais presentes na superfície protéica, pureza
	Características cinéticas: Atividade específica, perfil de pH e temperatura, parâmetros cinéticos para a ativação e inibição, estabilidade térmica, pH, solventes, contaminantes e impurezas
<i>Suporte</i>	Características Químicas: Composição e base química, grupos funcionais, estabilidade química, propriedades da superfície do suporte (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor, presença de íons metálicos)
	Características Mecânicas: Diâmetro do poro, comportamento de compressão, tamanho da partícula, área superficial, volume acessível da matriz, resistência à compactação em operações em altas vazões para reatores de leito fixo; abrasão para reatores agitados e velocidade de sedimentação para leitos fluidizados
	Características Morfológicas: Suportes não porosos (baixa área superficial), porosos (grande área superficial), estrutura de gel
<i>Enzima Imobilizada</i>	Método de Imobilização: Fixação de proteína, eficiência da enzima ativa, parâmetros cinéticos intrínsecos
	Efeitos de transferência de massa: Partição (diferente concentração do soluto dentro e fora das partículas do catalisador), difusão interna (poros) e externa
	Estabilidade: Operacional (expressa em tempo de meia-vida sob condições operacionais), estabilidade de estocagem
	Desempenho: Produtividade (produto formado por unidade de atividade ou massa de enzima), consumo de enzima (e.g. unidades por kg de produto)

Tabela 4. Fatores que influenciam o desempenho de um sistema de enzima imobilizada.

Estes fatores influenciam o desempenho do suporte, a conformação da enzima, a velocidade da reação e, portanto, afetam o comportamento da enzima imobilizada.

Dependendo do suporte utilizado e do protocolo de realização do procedimento, o processo de imobilização pode alterar as propriedades da enzima (PALOMO *et al.*, 2003).

De acordo com Markoglou e Wainer (1976), alguns aspectos como a estabilidade, as propriedades cinéticas, a especificidade, bem como a atividade catalítica da enzima, devem ser avaliados e considerados como características a serem preservadas, para que os efeitos da imobilização sobre a enzima não sejam desvantajosos.

Estudos apontam que várias estratégias podem ser utilizadas para evitar efeitos indesejáveis, aumentando a estabilidade de enzimas imobilizadas. O grande desenvolvimento e elevado interesse industrial na tecnologia de imobilização de enzimas mostra que, de um modo geral, as vantagens obtidas com a técnica, superam as limitações.

Um dos principais fatores que pode alterar a eficiência do processo de imobilização é a inativação enzimática durante o procedimento. A perda da atividade da enzima pode ocorrer em consequência de diversas situações. A mais comum advém de transformações conformacionais na estrutura terciária enzimática, trazendo alterações na conformação do sítio ativo e consequentemente, reduzindo a atividade catalítica enzimática (BALCÃO *et al.*, 2001).

Durante o processo de imobilização é fundamental que não aconteçam mudanças na estrutura conformacional da enzima, bem como a desnaturação do sítio enzimático, fato este que pode alterar a atividade catalítica da enzima. (KLIBANOV, 1983; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005b).

A estrutura terciária das enzimas é formada por meio de interações intermoleculares, como ligações hidrogênio, pontes de dissulfeto e interações eletrostáticas. Conforme exposto por Marconi (1989), estas interações são muito sensíveis ao pH do ambiente e mudanças nesse pH podem resultar em mudanças no padrão de cargas e, consequentemente, em mudanças na estrutura terciária da enzima.

De acordo com Mateo *et al.* (2000), estratégia eficiente para evitar a modificação da estrutura tridimensional da enzima, seria a escolha pela imobilização multipontual, que promove o aumento da rigidez da molécula da enzima tornando-a mais resistente às mudanças conformacionais.

Conforme já mencionado, visando evitar a perda de atividade catalítica, deve-se assegurar também, que o sítio ativo das enzimas não esteja envolvido no processo de imobilização.

Na tentativa de solucionar esses impasses, busca-se a proteção do sítio ativo da enzima durante o processo de imobilização. De acordo com Chaplin e Bucke (1990), este procedimento pode ser feito utilizando, em concentrações de saturação, inibidor competitivo de sítio ativo. Nestes casos, a substância protetora deve ter facilidade em ser removida do meio ao final do processo de imobilização.

Outra alternativa, seria realizar o processo de imobilização na presença do substrato da enzima ou do produto da reação catalítica. Estes procedimentos reduzem a percentagem de enzima imobilizada em conformação não catalítica.

Outro fator complicador, bastante comum de ocorrer, são efeitos difusionais ou de transferência de massa. Durante o processo de imobilização, a enzima pode sofrer modificações na orientação e posição a qual será ligada ao suporte, podendo alterar a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima, resultando em menor atividade ou redução da especificidade pelo substrato, provocada por estas restrições difusionais.

Conforme exposto por Mateo *et al.* (2000), estratégia eficiente neste caso é a introdução de espaçadores, que promovem um maior distanciamento entre a enzima e suporte e consequentemente, maior mobilidade enzimática, reduzindo assim, a ocorrência de impedimentos estéricos.

Efeitos microambientais, também são prejudiciais para atividade da enzima imobilizada. Resultantes do método de imobilização utilizado, da natureza (hidrofóbica ou hidrofílica) e presença do suporte nas proximidades da enzima, pode ocorrer acúmulo de produto na proximidade do sítio ativo, afetando a cinética reacional, pela redução da velocidade da reação ou alteração do pH no microambiente da enzima.

De maneira geral, o aumento da estabilidade pode ocorrer em função da estabilização da estrutura da proteína ou pelo simples fato da enzima imobilizada estar menos acessível a agentes desnaturantes ou à microorganismos. Essa estabilidade é regida pelo número e natureza das ligações formadas entre a enzima e o suporte, pelo grau de confinamento da enzima ao suporte, pelo microambiente formado entre a enzima e o suporte e pelas condições de imobilização (MARCONI, 1989).

5.5. Parâmetros para Determinar o Sucesso do Processo de Imobilização

A terminologia de imobilização é muitas vezes inconsistente e/ou confusa. Os três parâmetros mais frequentemente utilizados para determinar o sucesso da imobilização enzimática são o rendimento de imobilização, a eficiência da imobilização e da recuperação da atividade.

O rendimento de imobilização deve ser utilizado para descrever a percentagem da atividade total da enzima, comparando a solução de enzima livre com a imobilizada:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{atividade imobilizada} / \text{atividade inicial})$$

A atividade da enzima que é imobilizada somente pode ser determinada pela medição da atividade de enzima total residual que permanece na solução depois da imobilização da enzima, subtraindo esta atividade a partir da atividade inicial. Em alguns casos, um ensaio em branco pode ser realizado paralelamente, para compensar a desativação da enzima livre sob as condições de imobilização. Muitas vezes, medições de proteínas são usadas para determinar o rendimento de imobilização. A utilização deste parâmetro pode não ser confiável, especialmente quando uma mistura de proteínas em bruto é utilizada para a imobilização, pois as diferentes proteínas podem ter diferentes rendimentos de imobilização. Todavia, pode ser útil para controlar a atividade da enzima e da concentração de proteína no sobrenadante, para excluir qualquer desativação de enzima livre e para determinar a proteína e/ou percentagem enzimática de carga (em peso) do biocatalisador imobilizado.

O segundo termo frequentemente utilizado para descrever o sucesso de imobilização é a eficiência da imobilização, que descreve a porcentagem de atividade de enzima ligada ao suporte:

$$\text{Eficiência (\%)} = 100 \times (\text{atividade observada} / \text{atividade imobilizada})$$

Em teoria, pode-se ter uma eficiência de imobilização de 100% e um rendimento de imobilização de 0%, quando todas as enzimas em solução são imobilizadas, mas nenhuma

atividade é encontrada no suporte porque a enzima foi desativada ou ficou inacessível por algum motivo, mediante imobilização.

O terceiro parâmetro utilizado para descrever o sucesso de imobilização é a recuperação da atividade. Recuperação da atividade é a produção de imobilização multiplicada pela eficiência de imobilização, onde o resultado dá uma ideia do sucesso do processo de imobilização total. Com a recuperação de atividade, a atividade do material imobilizado é comparada com a atividade a partir do total de enzima livre:

Recuperação da atividade (%) = (atividade observada / atividade de partida)

A atividade observada na imobilização em relação à atividade da enzima livre (eficiência de imobilização e rendimento de imobilização) pode ser altamente dependente do ensaio de atividade utilizado (ou seja, tipo de substrato, concentração de substrato, pH e temperatura) e sobre as propriedades físicas do biocatalisador imobilizado (tamanho da partícula, a hidrofobicidade, hidrofiliicidade e tamanho de poro). Esta dependência é mais frequentemente causada por limitações do substrato e / ou produto na matriz de imobilização de transferência de massa, levando a diferentes rendimentos imobilização e recuperações de atividade.

Por exemplo, uma enzima imobilizada numa matriz densa polar terá um maior rendimento de imobilização e recuperação de atividade quando o ensaio de atividade é realizado com um pequeno substrato polar em concentração elevada, do que quando um grande substrato apolar em baixa concentração é utilizado, assumindo que a enzima livre original é igualmente ativa em ambos os compostos.

Embora a diferença no exemplo acima, seja bastante evidente, menores diferenças menos evidentes podem ter uma grande influência nos resultados. Definir estes valores tão próximo quanto possível é, portanto, essencial para a economia do processo de imobilização, para a concepção do biocatalisador imobilizado, para uma aplicação específica, para a realização de ensaios de atividade, bem como, para a aplicação final em que a enzima imobilizada será utilizada.

Para utilização em solventes orgânicos, o cálculo de recuperação de atividade torna-se mais complicado, uma vez que a comparação das suspensões de um pó de enzima livre e da

enzima na forma imobilizada num solvente orgânico, não é sempre fácil. Em geral, é de se esperar que uma enzima imobilizada tenha resultados elevados de recuperação de atividade, devido a uma melhor acessibilidade das moléculas de enzima individuais, em comparação com grandes quantidades de pó da enzima livre que, muitas vezes contém aditivos, como (poli) sacarídeos. Comparações diretas de atividades nesses casos, muitas vezes levam à taxas de recuperação da atividade superiores a 100%.

Em suma, é preciso distinguir entre a perda intrínseca da atividade de desativação e (aparente) perda de atividade devido à inacessibilidade de uma fração das moléculas de enzima não imobilizadas. Isto pode ser determinado por meio de titulação do sítio ativo. Esta última técnica permite uma medição da quantidade de enzima ativa, com a utilização de compostos que se ligam ao sítio ativo e inibem irreversivelmente a enzima, induzindo também, a liberação de substâncias que podem ser facilmente detectadas.

Ter conhecimento sobre a quantidade de enzima ativa disponível num biocatalisador imobilizado é muito útil para compreender o processo de imobilização, as limitações de difusão e, como a enzima responde a um determinado material. Estes dados podem ser usados, por exemplo, para determinar a atividade catalítica inerente de uma alteração enzimática, resultado de alterações conformacionais provocadas pela interação com o suporte, como por exemplo, o fenômeno chamado "hiper ativação" observado nas lipases.

6. APLICAÇÃO DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

As enzimas imobilizadas têm características vantajosas que as tornam mais promissoras para aplicação industrial em relação às enzimas solúveis. Muitas pesquisas e livros apresentam e discutem o uso de enzimas imobilizadas nos campos industrial, analítico, médico, químico entre outros, conforme exposto na Tabela 5 (CHIBATA, 1978; CHEETHAM, 1985; ROSEVEAR *et al.*, 1987; TANAKA *et al.*, 1993; VELIK & MACLEAN, 1994; CABRAL *et al.*, 1994; FERNANDES & CABRAL, 2006).

Dentre as mais bem sucedidas aplicações industriais em larga escala de enzimas imobilizadas, pode-se citar a produção de xarope de glicose e frutose a partir de amido de milho, a produção de ácido 6-amino penicilínico, penicilina semi sintética com o uso da enzima penicilina-G ou L-acilase, produção de acrilamida empregando células imobilizadas,

produção de aspartame com a termolisina imobilizadas, bem como, utilização de enzimas imobilizadas para a produção de vários L-aminoácidos (como a L-alanina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano e L-valina), usados com finalidade de aumentar o valor nutricional de alimentos industrializados e para hidrólise da lactose presente no soro do queijo (BON *et al.*, 2008; CABRAL *et al.*, 1994).

Enzima	Substrato	Produto
<i>Glicose isomerasase (5.3.1.5)</i>	Glicose	Xarope de frutose
<i>Beta-galactosidade (5.3.1.5)</i>	Lactose	Glicose e galactose
<i>Lipase (3.1.1.3)</i>	Triglicerídeos	Análogos de manteiga de cacau
<i>Nitrila hidratase (4.2.1.84)</i>	D,L Aminoácidos	Acilamida
<i>Amilocilase (3.5.1.14)</i>	D,L Aminoácidos	L-aminoácidos (alanina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano e valina)
<i>Rafinase (3.2.1.22)</i>	Rafinose	Soluções de galactose e sacarose
<i>Invertase (3.2.1.26)</i>	Sacarose	Glicose e frutose
<i>Aspartame amônialiase (4.3.1.1)</i>	Amônia e Ácido Fumárico	L-ácido aspártico (usado na síntese do aspartame)
<i>Termolisina (3.4.1.1)</i>	Peptídeos	Aspartame
<i>Glicoamilase (3.2.1.3)</i>	Amido	D-glicose
<i>Papaína (3.4.22.2)</i>	Proteínas	Remoção da turbidez em cervejas
<i>Penicilina amidase (3.5.1.11)</i>	Penicilina G e V	Ácido 6-aminopenicilânico (precursor das penicilinas semi-sintéticas)
<i>Beta-tirosinase</i>	Pirocatenol	Ácido L-DOPA

Tabela 5. Exemplos de aplicações comerciais de enzimas imobilizadas (CASTRO *et al.*, 2010).

Tão importante quanto, enzimas imobilizadas também têm sido utilizadas na produção de biossensores, garantindo aplicações na área industrial de metodologias analíticas (BON *et al.*, 2008). Em virtude da possibilidade de integrar a seletividade e especificidade das enzimas, com a simplicidade dos transdutores eletroquímicos, o uso de biossensores enzimáticos tem sido cada vez mais promissor para aplicações analíticas (FERRAZ *et al.*, 2006). De acordo com Newman e Setford (2006), atualmente, o mercado de biossensores é dominado pelos

biossensores de glicose, eletrodos enzimáticos com finalidade de diagnosticar rapidamente os níveis de glicose sanguínea, facilitando o acompanhamento de diabéticos. Gupta e Chaudhury (2007) afirmam que enzimas imobilizadas utilizadas para aplicações eletroanalíticas é uma área de pesquisa relativamente recente e que tende a crescer.

De acordo com Bon *et al.* (2008), a produção de substâncias de alto valor agregado por bioconversão regioespecífica ou estereoespecífica são as mais recentes aplicações da tecnologia de imobilização enzimática. Como exemplo, cita-se o tratamento seletivo de poluentes específicos auxiliando na resolução de problemas ambientais, seletiva e específica análise contínua de compostos de interesse, conversão de energia em sistemas biológicos, bem como, na área médica, produção de órgãos artificiais e formulação de fármacos à base de enzimas.

7. PERSPECTIVAS

Apesar da grande quantidade de trabalhos e pesquisas publicados na área de imobilização de enzimas, os processos de aplicação destas técnicas em escala industrial ainda são poucos. Este fato acontece principalmente pelos seguintes fatores: altos preços do suporte e reagentes utilizados no processo de imobilização; baixa eficiência dos métodos de imobilização; relativamente baixa estabilidade operacional da enzima imobilizada; baixa versatilidade e alta sofisticação dos equipamentos requeridos para operações em fluxo contínuo; baixa eficiência das enzimas imobilizadas para produtos de alto peso molecular; bem como, pequena demanda dos produtos que utilizam a tecnologia de imobilização enzimática, desincentivando a produção em larga escala (BON *et al.*, 2008).

Visando viabilização da aplicação industrial de enzimas imobilizadas, é fundamental que ocorra a otimização de alguns fatores, entre eles: custo do processo de imobilização; retenção da atividade enzimática; estabilidade enzimática às variações de temperatura e pH; estabilidade operacional; projeto do biorreator; e principalmente, obtenção de suportes mais resistentes e de baixo custo.

De acordo com Moskovitz e Srebnik (2005), o avanço estratégico na aplicação industrial da tecnologia de imobilização enzimática, depende principalmente, de pesquisas científicas nas áreas relacionadas com a estabilização enzimática, como exemplo,

investigação do uso de proteínas de proteção, como as chaperonas. Aplicação de modelos de inativação enzimática, modificação química das enzimas, bem como estabilização com uso de aditivos e solutos compatíveis, são outras estratégias que têm sido abordadas com êxito. A engenharia de proteínas é a área de maior destaque neste sentido e vem contribuindo decisivamente no desenvolvimento de novas técnicas de estabilização enzimática (O'FAGAIN, 2003; SÁ-PEREIRA *et al.*, 2004).

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da utilização de diferentes técnicas e suportes para a imobilização de lipase, visando encontrar um sistema que obtenha uma maior atividade enzimática e maior eficiência de imobilização da enzima.

8.2 Objetivos Específicos

- Estudar a imobilização de lipase empregando técnicas de adsorção, ligação covalente e encapsulação em diferentes suportes;
- Otimizar o processo de imobilização de lipase que se mostrar mais adequado;
- Caracterizar a enzima imobilizada e livre quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade e estabilidade, atividade da enzima frente a inibidores.

9. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biomateriais e Técnicas Eletroquímicas e no Laboratório de Bioquímica de Proteínas, ambos localizados no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Júlio de Mesquita Filho - UNESP, câmpus de Botucatu.

Os equipamentos utilizados nos experimentos foram: centrífuga (Beckman Coulter, Allegra TM X-22R Centrifuge), espectrofotômetro (Beckman Coulter DU640), liofilizador L101 (Liotop), agitador orbital (Edison), estufa de secagem (FANEM).

Os reagentes empregados nos processos de imobilização da enzima foram: tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4; 3-glycidyloxypropil trimetoxissilano (GTPS), glutaraldeído, água destilada, etanol, celite in natura, tetraetilortossilicato (TEOS), NaOH 3 mol L⁻¹ e o ativador polietilenoglicol (PEG). Os reagentes empregados nas determinações analíticas foram: goma arábica, azeite de oliva, solução paralisadora, fenolftaleína.

9.1. Obtenção de Lipase

As lipases utilizadas nos experimentos foram:

- Lipase de Pâncreas Suíno (LPP), adquirida comercialmente do fornecedor Sigma-Aldrich.
- Lipases Fúngicas 13 FT, 1 FS e Nova 129, obtidas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas.
- Lipases Vegetais, de trigo e soja, obtidas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas.

A metodologia para obtenção das lipases fúngicas e vegetais utilizadas no experimento não podem ser divulgadas, pois as mesmas foram submetidas a análise de patentes.

9.2. Imobilização da Lipase por Adsorção

A imobilização da lipase por adsorção foi testada de acordo com a metodologia descrita por Sharma, Agarwal e Saxena (2008), utilizando como suporte celite in natura e cristais de sílica. A imobilização da enzima, foi feita por contato, utilizando-se 500 mg do suporte e 5 mL de suspensão enzimática (1 mg/mL em água destilada). O suporte e a enzima

foram colocados em Becker e permaneceram sob agitação a 200 rpm por 2h a 20°C. Durante o período de agitação, a amostra permaneceu coberta com papel alumínio. Após este período o material foi separado por filtração em papel de filtro Whatman nº1. As respectivas amostras, com diferentes suportes, foram lavados por três vezes, empregando em cada uma das lavagens 5 mL de água ultrapura a temperatura de 10°C. O material retido no papel de filtro contendo a enzima imobilizada foi armazenado aberto em placa de petri, sob refrigeração de aproximadamente 7°C a fim de evaporar a água remanescente. Em seguida, o material foi dissolvido em 7 ml de tampão fosfato, pH 7,4 (0,01 mol L⁻¹), e mantido em temperatura de 10°C para realização do teste de atividade enzimática residual e eficiência de imobilização, descritos no item 9.5. As três águas de lavagem também foram mantidas congeladas para realização do mesmo teste.

Após este experimento selecionou-se o suporte para imobilização da lipase que resultou em maior atividade enzimática e maior eficiência de imobilização, para estudar o efeito de diferentes proporções entre enzima/suporte. As proporções estudadas foram 1:1, 1:4, 1:5, 1:10 e 1:100, empregando o mesmo processo de imobilização da lipase descrito acima.

Em seguida, foram realizados os testes de avaliação da atividade enzimática e eficiência de imobilização como descrito no item 9.5, respectivamente. Para a proporção que apresentou melhores resultados, foi testado ainda, a atividade e eficiência de imobilização para determinação de temperatura e pH ótimos para imobilização.

O mesmo método foi utilizado ainda, para testar a eficiência de lipases de outras origens, como a lipase fúngica nova 129, lipase F13 da soja e lipase F13 do trigo.

9.3. Imobilização por Ligação Covalente em Celite Ativada com GLU e GTPS

Este processo de imobilização consiste em ligar covalentemente a enzima ao suporte, após ativação do mesmo com 3–glycidyloxypropil trimetoxissilano (GTPS) e glutaraldeído (GLU). A primeira etapa é chamada de silanização e refere-se à formação de ligação covalente por meio da reação entre grupamentos hidroxila do suporte com o GTPS, gerando uma terminação amina. A segunda etapa da ativação consiste em ligar o grupamento amina formado na reação de silanização ao glutaraldeído, originando aldeídos livres que poderão

ligar-se aos grupamentos amina da enzima por ligação covalente (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1999).

Primeiramente a celite foi submetida a uma etapa de limpeza, sendo aquecida em mufla a 300 °C por 3h. Em seguida os suportes foram lavados com solução de ácido sulfúrico 10% (v/v) à temperatura ambiente, na razão de 30 mL g⁻¹ de suporte e posteriormente foram lavados em abundância com água destilada e secos a 40°C durante 3h. Os suportes limpos foram silanizados com solução de GTPS 0,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹, pH 7,4 sob agitação de 100 rpm durante 3 horas, na razão de 3 mL g⁻¹ de solução por suporte. Após a silanização, repetiu-se a etapa de lavagem com água destilada e secagem como descrito anteriormente. O suporte silanizado foi ativado com solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) em tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹, pH 7,4 a 100 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. Utilizou-se a razão de 3 mL g⁻¹ de solução por suporte. Após a ativação, os suportes foram lavados exaustivamente com água destilada. Para o processo de imobilização, adicionou-se 5mL de solução de lipase (1mg de lipase em 10mL de solução de tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹, pH 7,4) em 1,25 g de celite ativada. A imobilização foi feita a 20°C por 2 horas, sob agitação de 100 rpm (MELO *et al.*, 2005).

Para este experimento, foram estudadas diferentes proporções entre a enzima e o suporte, a fim de encontrar, com os testes de atividade enzimática, qual a concentração resulta numa maior atividade enzimática e eficiência de imobilização. As proporções estudadas foram 1:1, 1:2,5 , 1:5, 1:7,5, 1:10 e 1:15.

Desta maneira, após a imobilização o material foi separado por filtração em papel de filtro Whatman nº1. As respectivas amostras, com diferentes concentrações, foram lavadas por três vezes, empregando em cada uma das lavagens, 5 mL de água destilada refrigerada a 10°C. O material retido no papel de filtro contendo a enzima imobilizada foi armazenado aberto em placa de petri, sob refrigeração de aproximadamente 7 °C a fim de evaporar a água remanescente. Em seguida, o material foi dissolvido em 7 mL de tampão fosfato, pH 7, e mantido congelado para realização do teste de atividade enzimática residual e eficiência de imobilização, descritos no item 9.5. As três águas de lavagem também foram mantidas congeladas para realização do mesmo teste. Para a proporção que apresentou melhores resultados, foi testado ainda, a atividade e eficiência de imobilização para determinação de temperatura e pH ótimos para imobilização.

9.4. Imobilização por Encapsulação

Este procedimento consiste em aprisionar a enzima em um suporte de sílica gel (TEOS). Foram testados dois procedimentos distintos, visando avaliar qual resulta numa maior atividade enzimática e eficiência de imobilização.

O primeiro procedimento consistiu em realizar a mistura de 1 mL de TEOS, 4 mL de água destilada, 10 uL de HCl concentrado e 3 mL de etanol, mantidos sob agitação a 200 rpm, durante 2 horas a temperatura controlada de 60°C. Após agitação, a amostra foi resfriada até atingir a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C). Em seguida, adicionou-se NaOH 3 mol L⁻¹ até atingir um pH próximo de 7, condição que ocorre a cristalização da sílica. Um pouco antes de ocorrer a gelatinização, adicionou-se 2 mL de suspensão enzimática [50 mg mL⁻¹]. A amostra foi filtrada, lavada e, em seguida, conservada em geladeira até ser realizado o teste de atividade enzimática. Antes da realização do teste de atividade enzimática, as enzimas já encapsuladas foram suspensas em 5 mL de solução tampão por pelo menos 15 min.

No segundo método de imobilização por encapsulação empregado neste experimento, utiliza-se o ativador polietilenoglicol (PEG) para auxiliar na imobilização da lipase. Primeiramente, diluiu-se 73,33 uL de HCl em 1,66 mL de água destilada e em seguida, adicionou-se a solução em um béquer contendo 10 mL de TEOS diluído em 12 mL de etanol. Manteve-se a mistura sob agitação a 200 rpm, durante 90 minutos à temperatura de 35°C. Após agitação, verificou-se o pH e adicionou-se lentamente 330 uL de NH₄OH [50 mg mL⁻¹] em 2 mL de etanol. Em seguida, adicionou-se 3,30 mL de lipase [50 mg mL⁻¹] com 2,60 mL de PEG [5 mg/mL]. Essa amostra foi mantida em equilíbrio por 24 horas. Em seguida, foi lavada com solução tampão e seca a vácuo por aproximadamente 4 horas. Após, foram realizados os testes de atividade, para determinar a atividade enzimática e eficiência de imobilização conforme consta no item 9.5. Para este experimento, foram estudadas também, variações nas proporções entre a enzima e o suporte, o ativador e o pH, além da utilização de lipases de diferentes origens (lipase de pâncreas suíno e lipases fúngicas), a fim de encontrar, com os testes de atividade enzimática, qual a concentração resulta numa maior atividade enzimática e eficiência de imobilização.

9.5. Teste de Atividade

A atividade da lipase foi determinada em um sistema composto por 5 mL de emulsão de óleo de oliva extra virgem e goma arábica 7% na proporção de 25% de óleo para 75% de goma; 2 mL de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e 1 mL de solução enzimática. O sistema foi incubado a 40°C por 30 minutos em banho termostatzado com agitação de 130 oscilações por minuto. Após o período de agitação, a reação foi paralisada com a adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1, v/v) e os ácidos graxos liberados titulados contra solução de NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando fenolftaleína como indicador, acompanhado pela medição do pH. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 mmol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1. Imobilização de Lipase por Adsorção

A primeira parte desse projeto começou com o desenvolvimento de uma metodologia para imobilização da lipase pelo processo de adsorção em suportes sólidos (celite e cristais de sílica). Os resultados da porcentagem de atividade enzimática e da porcentagem da eficiência de imobilização encontram-se na Tabela 6. Dentre os suportes estudados para a imobilização de lipase por adsorção apresentados na Tabela 6, a celite resultou em maior porcentagem de atividade enzimática de lipase. Os cristais de sílica utilizados apresetaram uma baixa atividade enzimática em todos os experimentos realizados. Podemos notar que enquanto a eficiência de imobilização da lipase sobre a celite foi de 30,15%, para cristais de sílica foi de apenas 12,0%. Logo passou-se a utilizar nos experimentos seguintes apenas celite para imobilização de lipase sobre um suporte sólido.

Suporte	Atividade enzimática (%)	Eficiência de Imobilização (%)
Celite	$5,94 \pm 1,7$	$30,1 \pm 2,7$
Cristais de sílica	0,21	$12,0 \pm 2,0$

Tabela 6. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de lipase por adsorção em celite e cristais de sílica (proporção enzima:suporte 1:4).

A partir destes estudos preliminares, foram testadas diferentes proporções entre a enzima:suporte para melhor otimização do sistema. Os resultados encontram-se na Tabela 7 e ilustrados na Figura 6. Podemos notar que conforme era aumentada a proporção entre a quantidade de suporte e enzima, aumentava-se, também, tanto a atividade como a eficiência de imobilização. A proporção 1:10 resultou nos melhores valores obtidos tanto de atividade enzimática (15,97%) como de eficiência de imobilização (35,0%). Estes resultados sugerem que com o aumento do suporte criaram-se maiores espaços físicos para a imobilização das enzimas. Já quando diminuimos a quantidade de suporte, provocamos a formação de agregados enzimáticos, levando a formação de reações de competição por espaços na superfície do suporte, resultando em interações fracas entre a enzima e o suporte. Segundo

Villeneuve *et al.*, (2000) o sucesso e a eficiência para adsorção de uma enzima a um suporte, dependem de alguns parâmetros como, tamanho da proteína, porosidade e tamanho dos poros do suporte a ser utilizado e, principalmente, área superficial a ser adsorvida.

Proporção enzima:suporte	Atividade enzimática (%)	Eficiência de Imobilização (%)
1:1	$2,98 \pm 0,2$	$17,23 \pm 2,3$
1:4	$5,41 \pm 0,3$	$31,27 \pm 3,2$
1:5	$5,52 \pm 0,6$	$31,9 \pm 4,1$
1:10	$15,97 \pm 0,8$	$35,0 \pm 3,7$

Tabela 7: Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de lipase adsorvida em celite variando-se a proporção enzima:suporte.

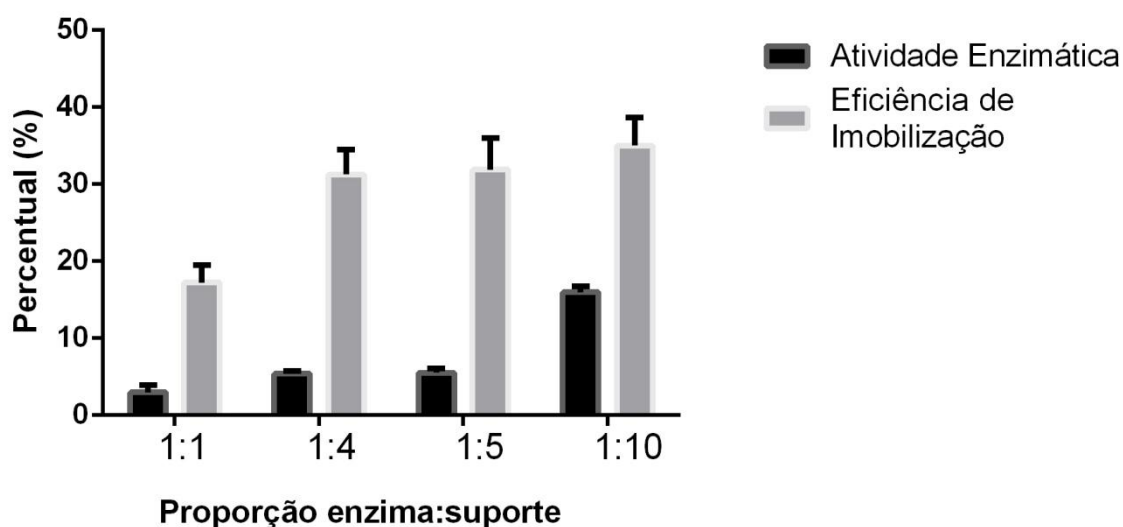


Figura 6. Gráfico ilustrando porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de lipase adsorvida em celite, variando-se a proporção enzima:suporte.

Tanto para a porcentagem de atividade enzimática (%AE) quanto para a porcentagem de eficiência de imobilização (%EI), observa-se nos resultados obtidos que até uma determinada concentração, quanto maior quantidade de suporte empregado em relação à enzima, melhores são os resultados de imobilização. Bai *et al.* 2006 reportou que aumentado a

concentração de enzima em relação a proporção de suporte, pode ocorrer o processo de impedimento estérico, o que dificulta a ligação da enzima ao substrato. Logo baixas concentrações enzimáticas resultam num menor efeito de inativação da enzima imobilizada devido a possível alteração conformacional, já que há uma maior disponibilidade de área superficial para haver a interação enzima:suporte. Adriano *et al.* 2005, estudaram a imobilização de penicilina G em quitosana ativada com glutaraldeído e constataram que quando houve aumento da proporção suporte:enzima, consequentemente houve também, uma maior atividade catalítica, bem como, maior eficiência de imobilização.

Encontrada uma boa correlação suporte:enzima, foi feita a otimização de outros parâmetros como pH e temperatura.

A maioria das reações químicas se processa em uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Um aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas dos reagentes, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. A dependência da temperatura na atividade enzimática foi investigada e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8 e Figura 7. Nota-se que a atividade máxima da lipase imobilizada ocorreu a 35 °C. A partir dessa temperatura, a imobilização parece conferir não proteção à enzima, uma vez que a lipase imobilizada apresentou menor atividade relativa a maiores temperaturas.

Temperatura	Atividade enzimática (%)
25°C	15,97 ± 2,8
30°C	12,84 ± 2,1
35°C	16,40 ± 2,1
40°C	16,08 ± 2,3
45°C	14,91 ± 3,2
50°C	12,31 ± 3,1
60°C	9,50 ± 1,8

Tabela 8. Efeito da temperatura na atividade enzimática e na eficiência de imobilização da lipase adsorvida em celite.

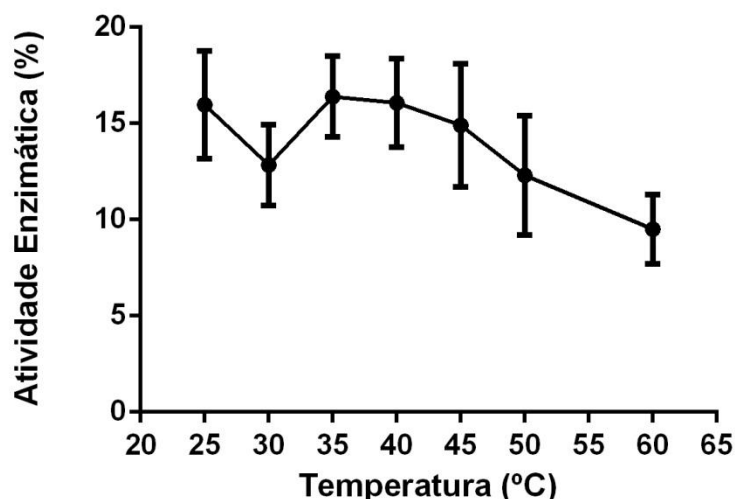


Figura 7. Gráfico ilustrando o efeito da temperatura na atividade enzimática e eficiência de imobilização da lipase adsorvida em celite.

A determinação do pH ótimo da lipase imobilizada em celite foi realizada pela variação do valor do pH do substrato numa faixa de 3,0 a 9,0, a 35 °C. De acordo com Zanin e Moraes (2004), o pH ótimo para melhor atividade da lipase livre é 7,0. Com os resultados encontrados, expostos na Tabela 9 e Figura 8, verifica-se que a faixa de pH ótimo para a lipase imobilizada por adsorção física é 9,0. Sendo assim, podemos afirmar que o processo de imobilização utilizado deslocou o pH ótimo da enzima livre (pH=7,0), para um valor de pH mais básico (pH=9,0). Este resultado sugere a ocorrência de possíveis mudanças conformacionais na estrutura da enzima ou alterações de concentração entre as espécies carregadas, substrato, produto, íons hidrogênio, íons hidroxilas, tanto no microambiente da enzima imobilizada quanto no meio reacional.

Todavia, o aumento do pH ótimo encontrado nos experimentos está de acordo com a literatura, que diz que a atuação da lipase modifica-se parcialmente para pH mais alcalino, tendo em vista que o ataque nucleofílico da serina é auxiliado pelo comportamento básico da histidina (Balcão, 1996). Logo, se o pH se desloca para meios ácidos, estes grupos ficam protonados e o ataque nucleofílico da serina no grupo carbonílico do substrato (triglicerídeo) poderia comprometer a formação do complexo substrato-enzima. De acordo com Gomes *et al.*, 2006, os grupos hidroxilas (–OH) presentes na estrutura do suporte possuem afinidade pelos hidrogênios ionizáveis (H^+) disponíveis no meio reacional, ocasionando um acúmulo

desses íons, o que poderia afetar o microambiente da lipase e, conseqüentemente, alterar sua faixa de pH ótimo de atuação.

pH	Atividade enzimática (%)
3	$3,07 \pm 1,2$
4	$12,04 \pm 2,0$
5	$13,54 \pm 1,3$
6	$17,67 \pm 1,5$
7	$16,82 \pm 2,1$
8	$13,64 \pm 1,4$
9	$18,52 \pm 2,2$

Tabela 9. Variação do pH na atividade enzimática e na eficiência de imobilização da lipase em celite.

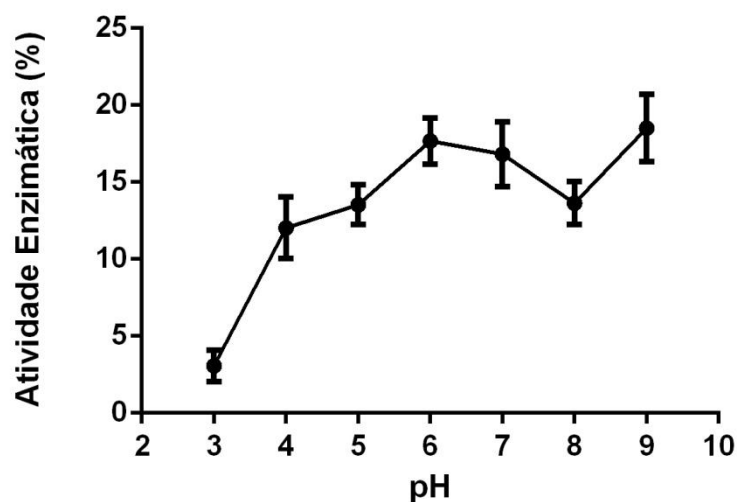


Figura 8. Gráfico ilustrando variação do pH na atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase adsorvida em celite.

Para o mesmo método de imobilização, foram testadas também a eficiência de lipases de outras linhagens, como as lipases vegetais F13 soja e trigo 13. Os resultados encontram-se na Tabela 10. Podemos notar que utilizando as lipases vegetais, houve um aumento na eficiência de imobilização, quando comparado a lipase de suíno. Porém, verificou-se grande

diminuição da atividade enzimática para as lipases de origem vegetal imobilizadas por adsorção. Esta diminuição pode ter sido ocasionada por uma modificação conformacional da enzima durante a etapa de fixação ao suporte, alterando a estrutura tridimensional do sítio ativo da enzima e tornando certas partes da molécula enzimática inacessíveis ao substrato.

Enzima:Suporte		Atividade enzimática (%)	Eficiência de Imobilização (%)
1:2	Trigo	1,8	29,8
	Soja	2,22	35,46
1:4	Trigo	4,51	37,28
	Soja	2,44	28,04
1:100	Trigo	1,16	68,63
	Soja	1,06	76,81

Tabela 10. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de lipase por adsorção em celite.

10.2. Imobilização por Ligação Covalente em Celite Ativada com GLU e GTPS

Realizou-se estudo de imobilização de lipase ligada covalentemente a um suporte de celite ativado com 3 glycidyloxypropil trimetoxissilano (GTPS) e glutaraldeído (GLU). A Tabela 11 e a Figura 9 ilustram os resultados obtidos quanto à atividade enzimática e eficiência de imobilização para lipase imobilizada por este método.

Podemos notar uma grande diferença dos valores obtidos para atividade enzimática utilizando a metodologia de imobilização por ligação covalente quando comparados à por adsorção. Na imobilização por ligação covalente, mesmo com o aumento da concentração de suporte com relação à enzima, não houve aumento da atividade enzimática. Este resultado pode estar associado à rigidez estrutural do suporte, conferida pelo processo de ativação do mesmo, promovendo limitações relacionadas à transferência de massa e impedimento estérico da enzima. Contudo, os resultados também sugerem que a formação de ligações covalentes leva a uma melhor distribuição enzimática sobre o suporte.

Proporção enzima:suporte	Atividade enzimática (%)	Eficiência de Imobilização (%)
1:1	17,84±3,0	3,86±1,2
1:2,5	15,97±2,5	15,60±1,9
1:5	18,84±2,3	33,2±1,8
1:7,5	15,87±1,8	47,82±2,1
1:10	16,50±2,0	49,81±2,0
1:12	17,67±3,0	26,99±2,0
1:15	18,84±3,1	32,11±3,1

Tabela 11. Variação da atividade enzimática e eficiência de imobilização em função da concentração enzima:suporte.

O melhor resultado obtido pela eficiência de imobilização, 49,81%, foi alcançado com a proporção de 1:10 de enzima para suporte. A redução nos valores de conversão pode estar relacionada com interações desfavoráveis entre os resíduos laterais de aminoácidos destas lipases com o glutaraldeído, alterando a estrutura tridimensional, ou dificultando o acesso dos substratos ao sítio catalítico das mesmas.

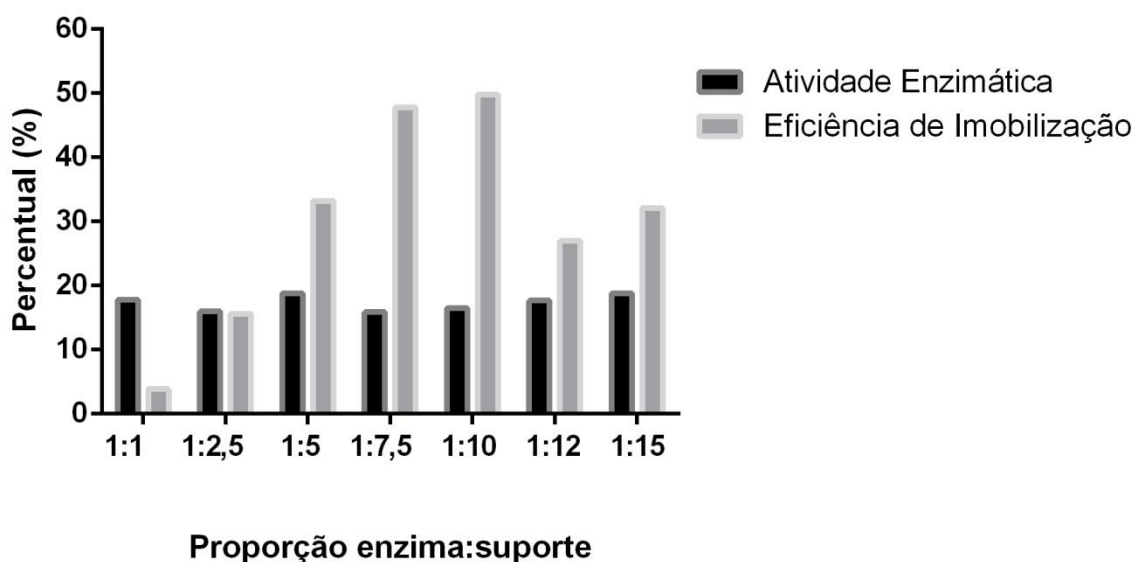


Figura 9. Gráfico ilustrando variação da atividade enzimática e eficiência de imobilização em função da concentração enzima:suporte na imobilização por ligação covalente.

Palomo *et al.* (2003) por meio de dados obtidos de estudo da imobilização de lipase de *Mucor miehei* empregando distintos suportes e diferentes ativadores, afirmam que as propriedades cinéticas das enzimas imobilizadas estão intimamente associadas aos protocolos de imobilização utilizados. Estudo similar foi realizado por Bevilaqua (2005), no qual os autores constataram que a enzima lipase de *Candida rugosa* (CRL) apresentou alterações importantes em suas propriedades catalíticas (atividade, especificidade e enantioseletividade) quando esta foi imobilizada através de adsorção em suporte hidrofóbico ativado com polietilenoimina e glutaraldeído. A lipase imobilizada no suporte por adsorção interfacial mostrou-se mais ativa na hidrólise de substratos mais simples como etil butirato, enquanto que a lipase imobilizada ao suporte ativado com polietilenoimina mostrou-se mais ativa na hidrólise de substratos iônicos (ácido 2-fenil-2-butirolacético em pH 7,0) ou metil mandelato.

Relatos indicam que a imobilização de enzimas promovem alterações na sua estrutura conformacional, levando a redução ou até, perda de sua atividade catalítica. Esta alteração conformacional também pode estar associada com modificações na atividade enzimática, características bioquímicas, afinidade com o substrato, enantioseletividade, entre outras (PESSELA *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2007).

A proporção 1:10 de enzima para suporte apresentou os resultados mais satisfatórios, desta maneira, foi realizado um estudo para otimizar as faixas ótimas de pH e temperatura para este procedimento de imobilização. Os resultados encontram-se nas Tabelas 12 e 13 e Figuras 10 e 11.

Temperatura	Atividade enzimática (%)
25°C	13,32
30°C	13,64
35°C	15,33
40°C	19,05
45°C	15,92
50°C	14,01
60°C	10,40

Tabela 12. Efeito da temperatura na atividade enzimática e na eficiência de imobilização da lipase imobilizada por ligação covalente.

Pode-se observar que a temperatura que atingiu melhor atividade foi de 40°C. Os valores variaram de 13 a 18%, na faixa de temperatura estudada. Estes resultados são também concordantes com os valores citados para as temperaturas ótimas destas lipases (Abas e Comeau, 2003). Embora boas conversões tenham sido obtidas acima de 40 °C com a lipase, não é recomendada sua utilização nestas condições, pois pode ocorrer desnaturação da mesma.

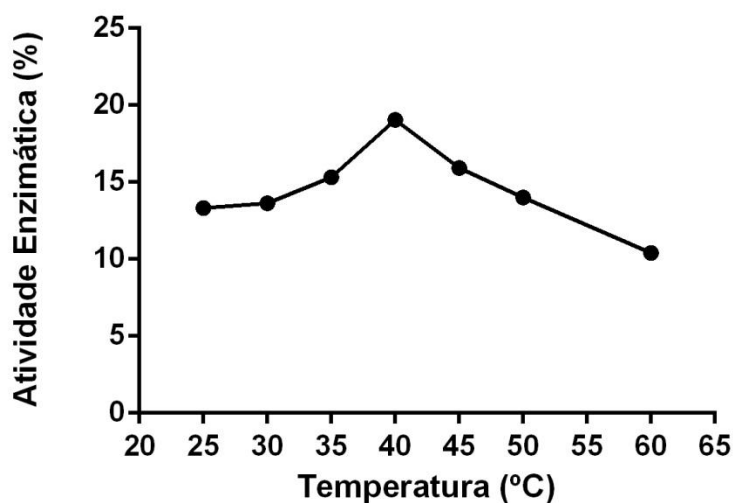


Figura 10. Gráfico ilustrando efeito da temperatura na atividade enzimática de lipase imobilizada por ligação covalente.

Também se investigou a variação do pH de trabalho. O pH que obteve-se a melhor atividade enzimática foi o 7,0. Observa-se também que a enzima imobilizada por ligação covalente apresentou quase a mesma atividade relativa à atividade da lipase imobilizada por adsorção física na faixa de pH abaixo de 7,0. Alterações no pH ótimo de lipases após a imobilização também já foram verificadas por outros pesquisadores. Chiou e Wu relataram uma mudança do pH ótimo de 8,0 para 9,0 após imobilização da lipase em quitosana, empregando ligação covalente (Chiou e Wu, 2004). Perez *et al.* verificaram um aumento do pH ótimo de 7,0 para 8,5 após a imobilização da mesma lipase em celulignina ativada com metaperiodato de sódio.

pH	Atividade Enzimática (%)
3	2,76 ± 1,1
4	9,4±2,1
5	12,6±2,5
6	10,4±2,4
7	15,45±2,8
8	13,27±2,1

Tabela 13. Efeito do pH na atividade enzimática na imobilização de lipase por ligação covalente.

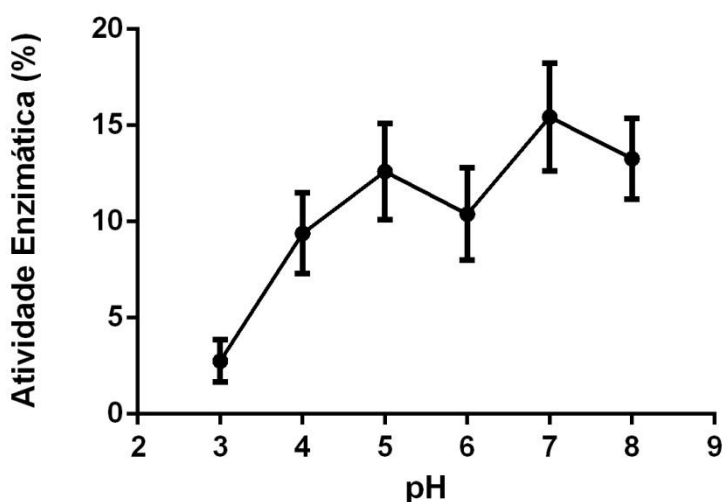


Figura 11. Gráfico ilustrando efeito do pH na atividade enzimática na imobilização de lipase por ligação covalente.

Segundo Mateo *et al.* (2005) a eficiência de imobilização enzimática depende da ativação do suporte e principalmente dos grupos funcionais reativos da enzima. Desta maneira, pode-se concluir que enzimas devem ser imobilizadas pelo grupo funcional que se encontram em maior quantidade, geralmente grupos lisina. Estas características individuais das enzimas são as responsáveis por tornar o processo de imobilização e as respostas obtidas tão distintas. Segundo Fernandez-Lorente *et al.* (2001) muitas enzimas são sensíveis e podem perder a atividade catalítica quando se utiliza glutaraldeído. Entretanto, a efetividade da

imobilização depende das condições experimentais em que o procedimento é realizado, devido à multiplicidade de estruturas químicas possíveis em cada situação.

De acordo com Freire (1988) o processo de imobilização normalmente ocasiona modificações nas propriedades físico-químicas da enzima com consequente alteração na estabilidade e nas propriedades cinéticas. Desta forma, a redução da atividade catalítica pode ter ocorrido devido a mudanças na estrutura da enzima e/ou alteração no sítio ativo da mesma. Esse comportamento também se deve a menor transferência de massa do meio reacional para o sistema imobilizado, pois o processo da imobilização reduz a difusão do substrato para o interior do suporte (MATEO *et al.*, 2000).

Estudo semelhante foi desenvolvido por Ivanov e Schneider (1997) que avaliaram a capacidade de síntese de ésteres e reuso de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada nos seguintes suportes: celite 545, octilsílica, Eupergit C250L, sílica ativada com 3-aminopropiltriethoxisilano e sílica ativada com 3-aminopropiltriethoxisilano e glutaraldeído. Os pesquisadores constataram que a lipase imobilizada nos suportes citados acima foi capaz de sintetizar ésteres, contudo, os resultados obtidos com a celite foram bem superiores aos demais. Já, no estudo avaliando o reuso da enzima imobilizada, obtiveram melhores resultados com a lipase imobilizada em Eupergit C250L, a qual reteve 30% da sua atividade após 11 ciclos.

10.3. Imobilização de Lipase por Encapsulação

Para avaliar a metodologia de imobilização por encapsulação, foram realizados dois estudos de encapsulação de lipase em suporte de sílica gel (TEOS). O primeiro consistiu no aprisionamento da lipase no suporte, e o segundo, utilizou o ativador PEG para auxiliar no processo de imobilização.

A Tabela 14 apresenta os resultados do experimento que utiliza o TEOS como suporte para imobilizar a lipase, sem a presença do ativador. A atividade enzimática do complexo imobilizado, bem como, a eficiência de imobilização, não apresentaram resultados satisfatórios para este experimento. Este resultado pode estar associado à rigidez da estrutura da matriz conferida pelo encapsulamento, que promoveu limitações relacionadas à transferência de massa e impedimento da ligação enzima/substrato.

Amostras	Atividade	Eficiência de Imobilização
Livre	100	-
Imobilizada	$5,95 \pm 1,2$	$21 \pm 1,8$

Tabela 14. Atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase encapsulada em suporte de sílica.

Na tabela 15, observa-se os resultados do experimento que utiliza o PEG como ativador para auxiliar na imobilização. A atividade enzimática e eficiência de imobilização para este experimento, tiveram resultados ainda mais insatisfatórios do que o experimento anterior

Amostras	Atividade	Eficiência de Imobilização
Livre	100	-
Imobilizada	$0,73 \pm$	-

Tabela 15. Atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase encapsulada em sílica com a presença do ativador PEG.

O mesmo experimento foi realizado utilizando lipases de origem fúngica (1 FS e 13 FT) e os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 16 e 17. Pode-se notar que ambas lipases também tiveram uma grande redução na atividade enzimática pós encapsulação. A eficiência de imobilização também não apresentou resultados satisfatórios para ambas as enzimas.

Lipase Fúngica 1 FS	Atividade	Eficiência de Imobilização
Livre	100	-
Imobilizada	$15,21 \pm 2,3$	$38,0 \pm 1,6$

Tabela 16. Atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase fúngica 1 FS encapsulada em suporte de sílica.

Lipase Fúngica 13 FT	Atividade	Eficiência de Imobilização
Livre	100	-

Imobilizada	3,75 ±	23,0 ± 2,1
-------------	--------	------------

Tabela 17. Atividade enzimática e eficiência de imobilização de lipase fúngica 13 FT encapsulada em suporte de sílica.

Paula *et al.* (2008), testaram diferentes técnicas de imobilização para lipase de *Candida rugosa* e obtiveram resultados semelhantes. Os métodos de imobilização por adsorção e ligação covalente obtiveram resultados satisfatórios na atividade e no rendimento de imobilização. Por outro lado, quando foi empregada a técnica de encapsulação, não houve expressão de atividade do sistema resultante. Este resultado pode estar associado à rigidez da estrutura da matriz conferida pelo suporte, que promoveu limitações relacionadas à transferência de massa da enzima. Além disso, o sistema imobilizado apresentou aspecto quebradiço sendo considerado totalmente inadequado para o uso proposto, uma vez que um dos fatores que contribuem para a eficiência do processo de encapsulação é a natureza porosa da membrana utilizada para o confinamento da enzima (SOARES *et al.*, 2004).

Com estes resultados obtidos, os experimentos com lipases encapsuladas em suporte de sílica não tiveram continuidade no presente trabalho. Sendo assim, para efeito de comparação do desempenho das diferentes metodologias e suportes para imobilização da lipase, foram considerados apenas os sistemas imobilizados obtidos pelas técnicas de adsorção física e de ligação covalente.

11. CONCLUSÃO

Este trabalho descreve o estudo comparativo de diferentes técnicas de imobilização de lipase em substrato de sílica. Primeiramente foi estudada a imobilização de lipase em celite e cristais de sílica, por adsorção física. Foram analisados diversos parâmetros como, temperatura, porcentagem da concentração enzima:suporte, pH e atividade residual da água de lavagem. Os resultados mostraram que a eficiência de imobilização da lipase sobre a celite foi de 30,15%, e sobre os cristais de sílica, foi de apenas de 12,0%. Logo, optou-se por continuar os experimentos utilizando celite como suporte. A melhor proporção encontrada entre a concentração de enzima e suporte (m/m) foi de 1:10, resultando em atividade enzimática de 15,97% e eficiência de imobilização de 35,0%. Estes resultados sugerem que com o aumento da quantidade de suporte, criou-se maiores espaços físicos para a imobilização das enzimas. Outro parâmetro avaliado foi a temperatura, e as melhores taxas de atividade enzimática encontradas ocorreram a 35 °C. A partir dessa temperatura, a imobilização parece não proteger a estrutura enzimática, uma vez que os resultados obtidos a maiores temperaturas apresentaram menor atividade relativa. A determinação do pH ótimo de lipase imobilizada em celite foi realizada pela variação do valor do pH do substrato numa faixa de 3,0 a 9,0, a 35 °C. Verificou-se que, para a lipase imobilizada obtida por adsorção física, o pH ótimo é 9,0.

A segunda etapa do projeto foi a imobilização da lipase em Celite utilizando ligações covalentes. Os mesmos parâmetros acima foram variados. A melhor proporção de concentração entre enzima e suporte foi de 1:10 (m/m), onde obteve-se 16,5% de atividade enzimática e eficiência de imobilização de 49,8%. Com este resultado foi realizado a determinação da faixa de pH e temperatura ótimas para este procedimento de imobilização. A melhor resposta de atividade enzimática foi encontrada no pH = 7,0. Podemos notar que houve uma diminuição do pH de trabalho quando comparado ao resultado obtido por adsorção em Celite (pH =9,0). Na faixa de pH superior a 7,0, foi reduzida a capacidade do glutaraldeído de fixar a lipase, causando uma redução da atividade da lipase.

Por último foi estudada a metodologia de encapsulação da lipase utilizando TEOS como precursor. A atividade enzimática pós-imobilização, bem como, a eficiência de imobilização, não apresentaram resultados satisfatórios para este experimento mesmo na presença de ativadores enzimáticos (PEG).

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tecnologia de imobilização de enzimas envolve e integra conhecimentos de diversas áreas: química, bioquímica, biologia molecular e celular, como também, física e engenharia, buscando sempre a ampliação e aperfeiçoamento das aplicações das enzimas em processos de conversão de matéria prima em produtos de maior valor agregado. A diversidade nas maneiras de aplicação e uso da tecnologia de imobilização enzimática confirmam essa relação e utilidade nas mais variadas áreas da ciência. Sendo assim, o processo de imobilização de enzimas vem sendo utilizado não apenas com a finalidade de atender demandas especificamente científicas, mas principalmente visando à aplicação industrial em processos contínuos.

Desta maneira, mesmo considerando os significativos avanços científicos nesta área, novas metodologias e aplicações da tecnologia de imobilização enzimática, ainda precisam ser mais exploradas, principalmente no sentido de aumentar a estabilidade, atividade e aproveitamento enzimático em processos de fluxo contínuo.

BIBLIOGRAFIA

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzym. Microb. Technol.**, v. 32, p. 58, 2003.

ADÃO, D. C.; TAROZO, R.; VECCHI, C. C. C.; PINTO, J. P.; FRACCIONE, M.; GUEDES, C. L. B. Avaliação da Degradação Ambiental do Biodiesel (B100) do Óleo de soja através de processos oxidativos. In: **II Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**, Varginha/MG, 2005.

ADRIANO, W.S.; COSTA FILHO, E.H.; SILVA, J.A.; GONÇALVES, L.R.B. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 04, p. 529 - 538, 2005.

AKOH, C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **J. Agric. Food Chem.** v. 55, p. 8995-9005, 2007.

ANDREWES, P.; BALDWIN, A.; BROOME, A.; HILL, B.; HOLLAND, R.; MILLS, O.; NEWSTEAD, D. Detection of lipase in skin and whole milk powders using triheptanoin as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 587-595, 2007.
Annu. Rev. Microbiol., v. 53, p. 315, 1999.

ANP. Agência Nacional De Petróleo. Resolução ANP Nº 14 de 11 de maio de 2012 – **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mai. 2012.

ANTCZAK, M.S., KUBIAK, A., ANTCZAK, T., BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**. v. 34, p. 1185-1194, 2009.

AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 350p. 2001.

BAI, Y. X.; LI, Y. F.; YANG, Y.; YI, L. X. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized novel mesoporous silica supports. **J Biotechnol.**, v. 125, p. 574– 582, 2006.

BALCAO, V. M.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MALCATA, F. X.; GUIBAN, J. M. Structural and functional stabilization of L-asparaginase upon immobilization onto highly activated supports. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 3, p. 537-542, 2001.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with lipases: State of the art. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, p. 392, 1996.

BAMWAL B.K. and M.P. Sharma. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 9; 363-378, 2005.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 1 ed. Campinas: EDUNICAMP, 1995.

BASSO, A.; DE MARTIN, L.; EBERT, C.; GARDOSI, L.; LINDA, P.; SIBILLA, F. Organically modified xerogels as novel tailor-made supports for covalent immobilisation of enzymes (penicillin G acylase). **Tetrahedron Let.**, 44, 5889-5891, 2003.

BEVILAQUA, J. V. **Estudo da catálise em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005. 35 p. Tese (Doutorado) – Programa de pós Graduação de Engenharia, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells; **Methods in Biotechnology 1**; Human Press, New Jersey; 367 pp.; 1997.

BILLIAR, K.; MURRAY, J.; LAUDE, D.; ABRAHAM, G.; BACHRACH, N.; Effects of carbodiimide crosslinking conditions on the physical properties of laminated intestinal submucosa. **Journal of Biomedical Materials Research**, 56, 101-108, 2001.

BIODIESEL STANDARD; **ASTM D6751**, USA, 2002.

BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado**. Interciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 5.

BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 2.

BOSLEY, J. A.; PEILOW, A. D.; J. Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n.2, p. 107-111, 1997.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767, 1990.

BRASIL. **Lei nº 11.097**, de 13 de janeiro de 2005.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. **Biocatalysts and enzyme Technology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, 448 p.

CABRAL, J.M.S. *et al.* **Applied Biocatalysis**. Chur: Harwood Academic Publishers, 1994.

CANACKI, M. The potential of restaurant waste lipids as Biodiesel feedstocks. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 183, 2007.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Capítulo 6, In: Bon, E. P. S.; Pereira Jr., N.; Gottschalk, L. M. F.; Sá-Pereira, P.; Roseiro, J. C.; Ferrara, M. A.

Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado. 3. ed. Interciência: Rio de Janeiro, 2010.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme technology.** Cambridge University Press: Cambridge, 1990.

CHAVANNE, C. G. **pat. BE 422,877**, Belgica, 1938.

CHAVANNE, C. G.; Sur on mode, d'utilisation possible de l'huile de palma à la fabrication d'un carburant lourd. **Bull. Soc. Chim.** v. 10, p. 52, 1943.

CHEETHAM, P. S. J. Principles of industrial enzymology basis of utilization of soluble and immobilized enzymes in industrial processes. In: CHICHESTER. (ed.). **Handbook of enzyme biotechnology** . 2nd. John Wiley & Sons, 1985.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes.** 1 ed. Tokyo, Kodansha Scientific Books, 284p. 1978.

CHIOU, S. H.; WU, W. T. Immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, p. 197, 2004.

CORCORAN, E. **The production and use of immobilized living microbial cells.** In: Wiseman, A. Topics in enzyme and fermentation biotechnology, v.10, p. 12-50, England/ELLIS Horwood, 1985.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Quim. Nova**, v. 32, p. 776, 2009.

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

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. **Imobilização de enzimas e sua estabilização**, Em Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado; Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L.; Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A.; Alencastro, R. B.; Coelho, R. R. R., eds; Interciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 6.

DIAZ, J. F.; BALKUS JR, K. J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 2, p. 115-126, 1996.

DIJKSTRA, P. J.; ZEEMAN, R.; FEIJEN, J. Crosslinking of porcine aortic leaflets with butane-1,4-diol diglycidyl ether. **Macromolecular Symposia**, 172, 11-20, 2001.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1274, 2008.

DORADO, M. P.; BALLESTEROS, E. S., DE ALMEIDA, J. A.; SCHELLERT, P.; LOHRLEIN, C. H.; KRAUSE, R. An alkali-catalysed transesterification process for high free fatty acid waste oils. **Trans ASAE**. v, 45, p. 525-529, 2002.

EMBRAPA/CNPDIA – **Agroenergia: óleos vegetais, o substituto do biodiesel**, 2005. Disponível em: <http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=282&pg=2&n=2> Acesso em 17 de outubro de 2012.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, New York: Springer-Verlag, 1997.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, jan/jun, 53-58, 2010.

FERNANDES, P.; CABRAL, J.M.S. Biotransformation. In **Basic Biotechnology**. 3rd ed. Cambridge University Press, Edited by Colin Ratledge, Borj Kristiansen, 577-626, 2006.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; MATEO, C., et al. Strategies for the stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Mol. Catal. B:Enzyme**, v. 7(9), p. 181-189, 1999.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; TERRENI, M.; MATEO, C.; BASTIDA, A; FERNANDEZ-LAFUENTE R, DALMASES P, HUGUET J, GUISAN JM. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized pseudomonas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**., v. 28, p. 389–396, 2001.

FERRAZ,R.M.; VERA,A.; ARÍS,A.; VILLAVERDE, A. Insertional protein engineering for analytical molecular sensing. **Microbial Cell Factories**, v. 5 (15), 2006.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A.; Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 75, p. 569, 2000.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme Microb Tech.** v. 3, p. 769–777, 2007.

FREIRE, D.M.G. **Imobilização de amiloglicosidase em quitina – caracterização e testes em reatores contínuos de leito expandido**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, 1988.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 74, p. 621, 1997.

GERHARTZ, W. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry** – vol. A9, 5a ed. VHC: Alemanha, 1987.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E.; MESSINA, A.; Immobilized tyrosinase reactor for on-line HPLC application: Development and characterization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 121, 515-521, 2007.

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technology Biomedical Life Science**, v. 819, 3-16, 2005.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V. ; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F. Assessment of catalytic properties in aqueous and organic media of lipase from *Candida rugosa* immobilized on wood cellulignin activated with carbonyldiimidazole. **Quím. Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

GONZALEZ, W.A., NUNES, P.P., FERREIRA, M.S. *et al.* Biodiesel a partir de óleos vegetais. In **Proceedings of the 3. Encontro de Energia no Meio Rural**, 2000, Campinas - SP, 2003.

GOODENOUGH, P.; LAW, B. Enzymes for food biotechnology. **BFE**, v. 8, n. 12, p. 22-24, 1991.

GUISAN, J. M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century begins: An already solved problem or still an exciting challenge, In: Guisan J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**, 2. ed. Humana Press: Totowa, 2006.

GUISÁN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.375-382, 1988.

GUPTA, R.; CHAUDHURY, N. K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in bio- sensor: Problems and future prospects . **Biosensor Bioelectronics**, v. 22 (11), p.2387-2399, 2007.

H. F. CASTRO, A. A. MENDES, AND J. C. SANTOS, Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding Enzyme Immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HARTMEIER, W. **Immobilized Biocatalysts – An Introduction** . Trad. J. Wieser, Berlin, Springer-Verlag, 1988.

HASAN, F.; ALI SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n.2, p. 235-25, 2006.

HILL, J. *et al.* Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 103, p. 11206 – 11210, 2006.

HURTADO, C. R. **Obtenção de ésteres etílico a partir de diferentes óleos vegetais utilizando lipase imobilizada de Candida Antarctica (NOVOZYM 435)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 10, 157–176, 2000.

KIM, M.I.; HAM, O.H.; OH, S.; PARK, H.G.; CHANG, H.N.; CHOI, S. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized sílica nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p.62-68, 2006.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research and Development**, 6, 446–451, 2002.

KLIBANOV, A.M., 1983. Immobilized enzymes against thermal inactivation. **Advanced Applied Microbiology**, v.29, p.1–28. 1983.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Process Technol.** v. 86, p. 1059–1070, 2005.

KNOTHE, G. Structure Indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 79, p. 847-854, 2002.

KOELLER, K. M.; WONG, C. H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, p. 232-240, 2001.

KOURKOUTAS, Y. *et al.* Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377-397, 2004.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, 35, 126–139, 2004.

LANG, X., DALAI, A. K., BAKHSHI, N. N., REANEY, M. J., HERTZ, P. B., Preparation and characterization of bio-diesel from various bio-oils. **Bioresource Technol.**, 80, 53-62, 2001.

LIM, H. L.; MACDONALD, D. G.; HILL, G. A. Hydrolysis of starch particles using immobilized barley α -amylase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1, p. 53-62, 2003.

LOPES, E. M.; MARVULLE, V., Especificação Brasileira de Biodiesel: aspectos críticos e sua avaliação, In: **Anais do 1º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos Vegetais e Biodiesel**, Varginha - MG, julho/2004.

LÓPEZ-GALLEGO, F. *et al* Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal Biotechnology**, v.119, p.70–75, 2005.

LOPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1-2, p. 1-10, 2005.

MA, F.; HANNA, M. A.; Biodiesel production: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MALCATA, F. X. *et al.* Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.E. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MARCONI, W.; Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. **Reactive Polymers**, v.11, p. 1-19, 1989.

MARKOGLU, N.; WAINER, I. W. Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography, In Wilson, I. D. **Handbook of Analytical Separations**, 1 ed., Amsterdam: Elsevier Science, 2003.

MARKOGLOU, N.; WAINER, I. W. **Methods em enzymology immobilized enzymes**, Academic Press: New York, vol. XLIV, 1976.

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M. et al. Some special features of glyoxyl support to immobilize proteins. **Enzyme Microb Technol.**, v.39, p-274-280, 2005.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Reverse enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support polyethylenimine composites. **Biotechnol Bioeng**, v. 68 (1), p. 98-105, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, G.; GUIBA, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbial Technology**, v.40, n. 6, p. 1451-1463 , 2007.

MATEO, C; ABIAN, O. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p. 509-515; 2000.

MAYORDOMO, I.; RANDEZ, G. F.; PRIETO, J. A.; Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. **J. Agric. Food Chem.** v. 48, p. 105, 2000.

MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10(3), p. 248–268, 2006.

MELO, L.L.M.M.; PASTORE, G.M.; MACEDO, G.A. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3181-3185, 2005.

MORENO, J.M. *et al.* Covalent immobilization of pure lipases A and B from *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.2, p.177-184, 1997.

MORETTO, E. FETT, R. **Óleos e Gorduras Vegetais: Processamento e Análises**. 2a. ed. Editora da UFSC; Florianópolis; 179 p.;1998.

MOSKOVITZ, Y.; SREBNIK, S. Mean-field model of immobilized enzymes embedded in a grafted polymer layer . **Biophysical Journal**, v. 89 (1), p. 22-31, 2005.

MUNOZ SOLANO, D.; HOYOS, P.; HERNAIZ, M. J.; ALCANTARA, A. R.; SANCHEZ-MONTERO, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresourse Technology**, 115, 196-207, 2012.

NAHAR, P.; WALI, N. M.; GANDHI, R. P. Light-Induced Activation of an Inert Surface for Covalent Immobilization of a Protein Ligand. **Analytical Biochemistry**, 294, 148-153, 2001.

NARASIMHARAO, K.; LEE, A.; WILSON, K. Catalysts in Production of Biodiesel: A Review. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 1, p. 19, 2007.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. Biotransformação de Óleos e Gorduras; **BIO-TECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento**; ano III n.19; 28-31; 2001.

NASSREDDINE, S.; KAROUT, A.; CHRIST, M.; PIERRE, A. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. **Applied Catalysis A: General**, v. 344, p. 70–77, 2008.

NETO, P. R. C. **Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. 2002. 133 f. Dissertação (Curso de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, 2002.

NEWMAN, J. D.; SETFORD, S. Enzymatic biosensors. **Molecular Biotechnology**, v. 32 (3), p. 249-268, 2006.

O'FAGAIN, C. Enzyme stabilization - recent experimental progress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 137-149, 2003.

OLSON, N. F.; RICHARDSON, T. Immobilized enzymes in food processing and analysis. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 3, p. 653-659, 1974.

ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A. C. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 42, 106–113, 2006.

PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v.27, p.187-204, 2000.

PALMISANO, F.; QUINTO, M.; RIZZI, R.; ZAMBONIN, P. G. Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. **Analyst**, 126, 866-870, 2001.

PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4(1), p. 1-6, 2003.

PALOMO, J.M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FUENTES, M.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epóxi resins hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21, p.201-210, 2003.

PANDEY, A. BENJAMIN, S. SOCCOL, C. R. *et. al.* The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 29, p. 119 -131, 1999.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Unigráfica, 2003

PARENTE, E. J. S. **BR Pat. PI 8007957**, Brasil, 1980.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B., 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Vol. 23, No. 2, pp. 135-140.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Quím. Nova**, v.31, n.1, 2008.

PEREZ, V.H.; SILVA, G.S.; GOMES, F.M.; CASTRO, H.F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.13-19, 2007.

PESELA, B. C. C.; MATEO, C.; FILHO, M.; CARRASCOSA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: Purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic α and β -galactosidases. **Enzyme Microb Technol.** v. 40, p. 242-248, 2007.

PETRI, A; MARCONCINI, P; SALVADORI, P. Efficient immobilization of epoxide hydrolase onto silica gel and use in the enantioselective hydrolysis of racemic par-nitrostyrene oxide. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 219-224, 2005.

PIERRE, A. C. The Sol-Gel Encapsulation of Enzymes. **Biocatalysis and Biotransformation**, 22, 145–170, 2004.

PORTAL DO BIODIESEL, **Eco-óleo**, disponível em <http://www.biodieseleooleo.com.br/biodiesel/biodiesel.htm>. Acesso em 03 de fevereiro de 2006.

RAMOS, L. P.; ZANGONEL, G. F. Produção de biocombustíveis ao óleo diesel através da transesterificação de óleos vegetais. **Revista de Química Industrial**. v. 717, p 17-26, 2001.

RAMPIN, M. A. **Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona e soja utilizando a lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v.99, n.10, p. 3975-3981, 2008.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Effiziente heterogene Biokatalysatoren durch den Einschluß von Lipasen in hydrophoben Sol-gel-Materialien. **Angewandete Chemie**, 107, 373–376, 1995.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J.; KÖNEN, W. In situ fixation of lipase-containing hydrophobic sol-gel materials on sintered glass-highly efficient heterogeneous biocatalysts. **Chemical Communications**, 11, 1397–1398, 1996.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. 1 ed. Pelotas: EDUFPel, 2000. v. 3.

ROBLE, N. D.; OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. A novel circulation loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrical*) sponge for the bioconversion of raw cassava starch to ethanol. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 671-678, 2000.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. **Immobilized enzymes and cells**. Bristol: Adam Hilger, 1987.

SÁ FILHO, H. L. de; ROTEMBERG, B.; ALBUQUERQUE, S. F. de; MENDONÇA, M. C. de; MEDEIROS, P. R. da S. Diagnóstico da viabilidade técnica de utilização dos óleos vegetais brasileiros como combustíveis e lubrificantes. **Informativo INT**, v. 12, n. 22, 1979.

SALIS, A.; PISANO, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; SANJUST, E. Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. **J Molec Catal B**, v. 58:175, p. 80, 2009.

SÁ-PEREIRA, P.; CARVALHO, A.S.L.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M.R. Thermostabilization of *Bacillus subtilis* CCM 966 xylanases with trehalose. Study of deactivation kinetics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 278-282, 2004.

SCHNEIDER, M. Phospholipids. In Gunstone, F. D. and Padley, F. B. (Eds). **Lipid Technologies and Applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.

SCHRODER, O.; KRAHI, J.; MUNACK, A.; BUNGER, J. Environmental and health effects caused by the use of biodiesel. **SAE Tec. Pap. Ser**, 1999.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. B. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **J. Braz. Chem. Soc.** vol.9 no.3 São Paulo May/may, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterization and Applications of lipases. Research review paper. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. **Bioresource Technol**, v. 99, p. 2544-2551, 2008.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Studies on immobilized lipase in hydrophobic sol-gel. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 307, p. 113-116, 2004.

STI – MIC, **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais (CETEG, MG)**, Série Documentos, n. 16, 1985.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, A.L.F.; RODRIGUES, J.P.; ALVES, M.B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, p. 768-775, 2009.

TANAKA, A.; TOSA, T.; KOBAYASHI, T. **Industrial Application of immobilized of biocatalysts**. New York: Marcel Dekker, 1993.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends Biotechnology**, 17, 326-335, 1999.

TORRES, R.; PESSELA, B.; FUENTES, M.; MUNILLA, R.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint attachment via reversible immobilization on phenylboronic activated supports. **Journal of Biotechnology**, v.120, p.396-401, 2005.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: An overview. **Current Opinion in Biotechnonoly**, 13, 338-344, 2002.

VASUDEVAN, P.T.; BRIGGS, M. Biodiesel production - current state of the art and challenges. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35:421-430, 2008.

VELIK, I.A.; MCLEAN, R.J.C. **Immobilized biosystems– Theory and practical applications**. London: Blac-kie Academic & Professional, 1994.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: Facts and Artifacts. **Trends Biotechnol**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VIETH,W.R. **Bioprocess Engineering– Kinetic, mass transport, reactors and gene expression**. New York: John Wiley & Sons, 1994.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v.9, p.113-148, 2000.

VITOLO, M. Imobilização de células e enzimas. **Biotecnologia**, n.11, p.2, 1988.

VULFSON, E. N. Industrial applications of lipases In: Wooley, P.; Petersen, S. B. (eds).; **Lipase: Their Struture, Biochemistry and Application**, Cambridge University Press, Great Britain, p. 271-288, 1994.

WADA, S.; ICHIKAWA, H.; TATSUMI, K. Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. **Biotechnology and Bioengineering**, 42, 854-858, 1993.

WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis — key to sustainable industrial chemistry. **Curent Opinion in Biotechnology**, 21, 713-724, 2010.

WU, W. H.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N.; PHILIPS, J. G.; **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 76, p. 517, 1999.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of Reusable Lipases by Immobilization on Hexagonal Mesoporous Silica and Encapsulation in Calcium Alginate: Transesterification in Non Aqueous Medium, **Microporous Mesoporous Mater**, n. 86, p. 215-222 , 2005.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme Microb.Technol.**, v. 23, p. 438, 1998.

YANG, Z.; WILLIAMS, D.; RUSSELL, A. Synthesis of protein-containing polymers in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, 45, 10-17, 1995.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Em **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**; SAIAD, S.; PIETRO, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, cap. 4.

ZHANG, Y.; XIAO, Y.; KELLAR, K. J.; WAINER, I. W.; Immobilized Nicotinic Receptor Stationary Phase for On-Line Liquid Chromatographic Determination of Drug–Receptor Affinities. **Analytical Biochemistry**, 264, 22-25, 1998.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Recent Progress in Biocatalysis with Enzymes Immobilized on Mesoporous Hosts. **Topics in Catalysis**, 55, 1081–1100, 2012.